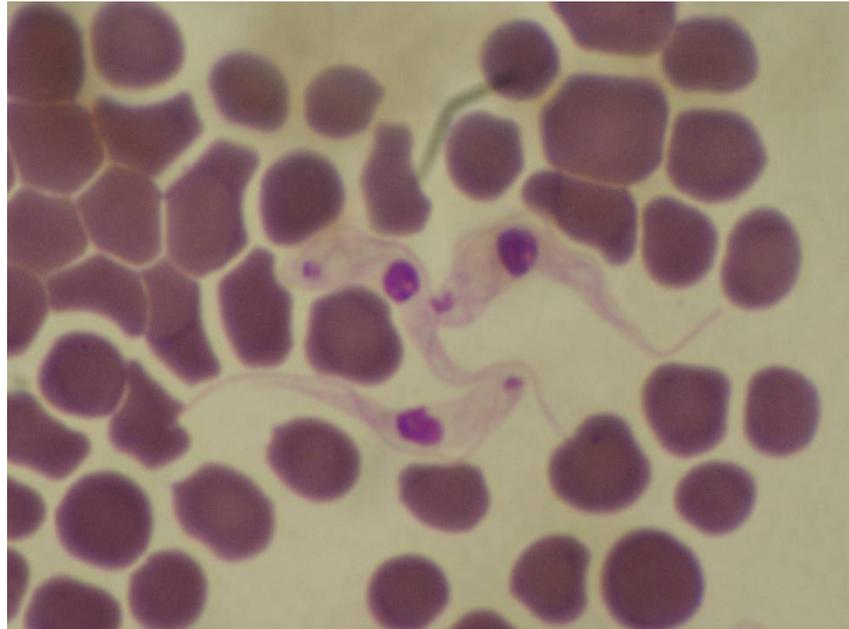




UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN CLÍNICA, PATOLÓGICA Y
PROTEÓMICA DE DOS AISLADOS
VENEZOLANOS DE *Trypanosoma vivax*

Roger Antonio Ramírez Barrios

Córdoba 2015

TITULO: *Evaluación Clínica, patológica y proteómica de dos aislados venezolanos de Trypanosoma vivax.*

AUTOR: *Roger Antonio Ramírez Barrios*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN CLÍNICA, PATOLÓGICA Y
PROTEÓMICA DE DOS AISLADOS
VENEZOLANOS DE *Trypanosoma vivax***

Roger Antonio Ramírez Barrios

Córdoba, Marzo de 2015



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN CLÍNICA, PATOLÓGICA Y
PROTEÓMICA DE DOS AISLADOS
VENEZOLANOS DE *Trypanosoma vivax***

V°B° Director

Armando Reyna Bello

V°B° Director

Álvaro Martínez Moreno



TÍTULO DE LA TESIS: EVALUACIÓN CLÍNICA, PATOLÓGICA Y PROTEÓMICA DE DOS AISLADOS VENEZOLANOS DE *Trypanosoma vivax*

DOCTORANDO: ROGER ANTONIO RAMIREZ BARRIOS

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

El estudio realizado por el estudiante graduado Roger Ramírez, en el marco de su tesis doctoral cumplida gracias al programa de doctorado conjunto en Medicina y Sanidad Animal de la Universidad de Zulia con la Universidad de Córdoba, tuvo como objetivo la evaluación clínica patológica y proteómica de dos aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*).

Para ello, se realizaron inoculaciones experimentales en ovinos con dos aislados de *T. vivax* (TvLIEM176 y TvMT1) para evaluar inicialmente los aspectos clínicos de temperatura, hematocrito, proteínas totales y otros. En este primer ensayo, se determinó como más patogénico el aislado TvMT1 causando mayores cambios en los valores clínicos y más virulentos, el aislado TvLIEM176 al evidenciar mayores parasitemias.

Por otra parte, estos aislados fueron purificados y sometidos a su separación proteica por 2D-DIGE encontrando 17 “spots” con expresión diferencial, los cuales fueron posteriormente identificados por espectrometría de masa. Esta identificación de péptidos de expresión diferencial permite sugerir que las proteínas asociadas a la virulencia pudieran ser GRP78, Par3, alfa tubulina, beta tubulina, HSP70, arginina quinasa, proteína del Complejo T 1 y TCP10, en cambio aquellas asociadas a la patogenicidad pudieran ser PFR1, piruvato quinasa, ATP sintetasa vacuolar, TCP1 α , glicerol quinasa y IMPDH.

En conclusión fueron estudiadas a profundidad dos cepas de *T. vivax*, encontrando que una es más virulenta y otra más patogénica, además, se lograron identificar los péptidos que hacen estas diferencias, abriendo el campo para posibles evaluaciones de tratamientos, inmunizaciones y diagnóstico de este parásito tan relevante en las ganaderías de África y Latinoamérica.

Los resultados del trabajo han dado lugar, hasta el momento, a dos publicaciones científicas en la “Revista Científica FCV-LUZ”, indexada en el JCR en el tercer tercil del área de Ciencias Veterinarias :

Ramirez-Barrios, R., Valera, Z., Parra, O., Chacin. E., Tavares-Marques, L., Holzmuller, P., Martínez-Moreno, A., Reyna-Bello, A. Immunoreactive proteins of Trypanosoma vivax. Revista Científica FCV-LUZ. Vol XXV, Núm 4. Pág: 311-316.

Ramirez-Barrios, R., Angulo-Cubillán, F., Gil, M., Parra, O., Tavares-Marques, L., Holzmuller, P., Martínez-Moreno, A., Reyna-Bello, A. Respuesta inmunitaria de ovinos (Ovis aries) frente a dos aislados venezolanos de Trypanosoma vivax. Revista Científica FCV-LUZ. Vol XXV, Núm 5. Pág: 361-367.

Se está preparando una tercera publicación, titulada "Different virulence and pathogenicity patterns of two Trypanosoma vivax isolates", para ser enviada a la revista Parasitology International (JCR, IF 1,8, Q2) y se han presentado varias comunicaciones a Congresos Científicos.

Para concluir este informe, indicar que el doctorando ha mostrado una gran constancia y resolución para completar el trabajo, afrontando diversas situaciones y circunstancias complicadas y mostrando una notable capacidad para resolver los problemas que se fueron presentando de una forma decidida.

El estudio conducido por el doctorando Roger Ramírez, reúne todos los requisitos necesarios para ser presentado y defendido ante el tribunal para optar al Grado de Doctor en Veterinaria por la Universidad de Córdoba. Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 15 de Octubre de 2015



Fdo.: **M.V. M. Sc. Dr. Armando Reyna**



Fdo.: **Dr. Álvaro Martínez Moreno**

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a los Dres. Armando Reyna Bello y Álvaro Martínez Moreno, directores de la Tesis y al Dr. Philippe Holzmüller, asesor directo de la misma, quienes me orientaron y me ayudaron en la realización y culminación de la investigación, además de brindarme su apoyo y amistad.

Un agradecimiento especial a mi familia y amigos por los ánimos recibidos.

ÍNDICE

1.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	23
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	30
2.1.- Tripanosomosis Bovina	30
2.1.1.- Etiología	30
2.1.2.- Reseña Histórica.....	30
2.1.3.- Transmisión de <i>T. vivax</i>	32
2.1.4.- Impacto económico de la tripanosomosis	33
2.1.5.- Aspectos fisiopatológicos y clínicos de la tripanosomosis	36
2.1.6.- Aspectos inmunológicos de la tripanosomosis	40
2.1.7.- Inmunodiagnóstico en la tripanosomosis	45
2.1.8.- Situación actual.....	49
2.2.- Proteómica	51
2.2.1.- Preparación de las muestras	54
2.2.2.- Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)	55
2.2.3.- Segunda dimensión o SDS-PAGE.....	56
2.2.4.- Visualización y tinción de geles bidimensionales	57
2.2.5.- Adquisición de la imagen y análisis de geles bidimensionales	59
2.3. Proteómica de Tripanosomas	61
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	78
3.1.- Obtención y expansión de los aislados de <i>T. vivax</i>	78
3.1.1.- Aislados de <i>T. vivax</i>	78
3.1.2.- Expansión de los aislados de <i>T. vivax</i>	78
3.2.- Determinación de los patrones de virulencia y patogenicidad de cada aislado de <i>T. vivax</i>	80
3.2.1.- Animales experimentales	81
3.2.2.- Evaluación clínica	82
3.2.3.- Evaluación hematológica	82
3.2.4.- Evaluación serológica	83
3.2.5.- Estudio histopatológico	85
3.2.6.- Análisis estadístico para los parámetros clínicos, hematológicos y serológicos	85
3.3.- Análisis proteómico de los aislados de <i>T. vivax</i>	86
3.3.1.- Purificación de los tripanosomas y obtención del proteoma.....	87
3.3.2.- Eliminación de sales contaminantes	88
3.3.3.- Hidratación del sedimento de proteínas	90

3.3.4.- Cuantificación de la concentración de proteínas	90
3.4.- Electroforesis diferencial en doble dimensión (2D-DIGE)	91
3.4.1.- Preparación de muestras para Isoelectroenfoque (IEF)	91
3.4.2.- Isoelectroenfoque	95
3.4.3.- Equilibrio de geles de isoelectroenfoque	96
3.4.4.- Electroforesis SDS-PAGE	97
3.4.5.- Software de análisis	97
3.5.- Identificación de proteínas expresadas diferencialmente entre los dos aislados de <i>T. vivax</i>	98
3.5.1.- Coloración de los geles de acrilamida	98
3.5.2.- Selección y digestión de proteínas de interés	99
3.5.3.- Análisis por espectrometría de masas para la identificación de las proteínas (LC-MS/MS)	100
4.- RESULTADOS	104
4.1.- Determinación de los patrones de virulencia y patogenicidad de cada aislado de <i>T. vivax</i>	104
4.1.1.- Evaluación clínica	105
4.1.1.1.- Temperatura corporal	105
4.1.1.2.- Frecuencia cardíaca	109
4.1.1.3.- Frecuencia respiratoria	113
4.1.1.4.- Otros signos clínicos	116
4.1.2.- Evaluación Hematológica	117
4.1.2.1.- Parasitemia	117
4.1.2.2.- Hematocrito	122
4.1.2.3.- Hemoglobina	126
4.1.2.4.- Número Total de Leucocitos (NTL)	129
4.1.2.5.- Contaje diferencial de leucocitos	132
4.1.2.6.- Proteínas Totales (PT)	140
4.1.3 Estudio histopatológico	143
4.1.4.- Evaluación serológica	144
4.1.4.1.- Anticuerpos anti <i>T. vivax</i>	144
4.2.- Estudio proteómico de los aislados de <i>T. vivax</i>	149
4.2.1.- Análisis de los geles 2D DIGE	150
4.2.1.1.- Spots específicos para <i>T. vivax</i>	154
4.2.1.2.- Spots específicos para aislado TvMT1	157
4.2.1.3.- Spots específicos para aislado TvLIEM176	160

4.2.2.- Espectrofotometría de masas	161
4.2.3.- Funcionalidad protéica y correlación entre aislados	164
5.- DISCUSIÓN	170
5.1.- Determinación de los patrones de virulencia y patogenicidad de los aislados de <i>T. vivax</i>	170
5.2.- Estudio proteómico de los dos aislados de <i>T. vivax</i> con diferente virulencia y patogenicidad	193
5.2.1.- Proteínas de choque térmico	198
5.2.2.- Proteínas de la barra paraflagelar (Rod paraflagelar)	205
5.2.3.- Tubulina	208
5.2.4.- Arginina Quinasa	211
5.2.5.- Proteínas asociadas al metabolismo energético	212
6.- CONCLUSIONES.....	217
7.- RESUMEN	221
8.- SUMMARY	225
9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	228
10.- ANEXOS	257

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de los aislados de <i>T. vivax</i> utilizados en la presente investigación	78
Tabla 2. Esquema del protocolo utilizado para el marcaje de las muestras y la realización del 2D-DIGE	93
Tabla 3. Valores promedios de la temperatura corporal (°C) en ovinos infectados experimentalmente con <i>T. vivax</i> (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección	106
Tabla 4. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable temperatura corporal (°C)	109
Tabla 5. Valores promedios de frecuencia cardiaca (latidos/minuto) en ovinos infectados experimentalmente con <i>T. vivax</i> (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección	110
Tabla 6. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable frecuencia cardiaca (latidos/min)	113
Tabla 7. Valores promedios de frecuencia respiratoria (respiraciones/minuto) en ovinos infectados experimentalmente con <i>T. vivax</i> (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección.....	114
Tabla 8. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable frecuencia respiratoria (respiraciones/min)	116
Tabla 9. Variación de los valores de la parasitemia (tripanosomas/ml) en ovinos infectados experimentalmente con <i>T. vivax</i> (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección	118
Tabla 10. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable parasitemia (tripanosomas/ml)	122
Tabla 11. Variación de hematocrito (%) en ovinos infectados experimentalmente con <i>T. vivax</i> (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección.....	123
Tabla 12. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable hematocrito (%)	126
Tabla 13. Variación de la hemoglobina (gr/dl) en ovinos infectados experimentalmente con <i>T. vivax</i> (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección.....	127
Tabla 14. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable hemoglobina (gr/dl)	129

Tabla 15. Variación del número total de leucocitos (cel/ μ l) en ovinos infectados experimentalmente con <i>T. vivax</i> (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 16. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable número total de leucocitos (cel/ μ l).....	132
Tabla 17. Variación del número total de linfocitos (cel/ μ l) en ovinos infectados experimentalmente con <i>T. vivax</i> (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección	133
Tabla 18. Variación del número total de neutrófilos segmentados (cel/ μ l) en ovinos infectados experimentalmente con <i>T. vivax</i> (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección.....	135
Tabla 19. Variación del número total de monocitos (cel/ μ l) en ovinos infectados experimentalmente con <i>T. vivax</i> (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección	137
Tabla 20. Variación del número total de eosinófilos (cel/ μ l) en ovinos infectados experimentalmente con <i>T. vivax</i> (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección	139
Tabla 21. Variación de las proteínas totales (gr/dl) en ovinos infectados experimentalmente con <i>T. vivax</i> (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección.....	141
Tabla 22. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable proteínas totales (gr/dl)	143
Tabla 23. Variación de la densidad óptica (DO405) a través de la técnica de ELISA en ovinos infectados experimentalmente con <i>T. vivax</i> (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección.....	145
Tabla 24. Concentración de proteínas obtenida de los purificados de <i>T. vivax</i> (aislados TvMT1 y TvLIEM176)	150
Tabla 25. Media de valores normalizados de los 17 spots seleccionados mostrando su nivel de intensidad diferencial entre los aislados	153
Tabla 26. Proteínas identificadas por espectrometría de masa en los proteomas de los dos aislados de <i>Trypanosoma vivax</i>	162
Tabla 27. Resumen de las proteínas identificadas en los proteomas de los dos aislados de <i>Trypanosoma vivax</i> , indicando el nivel de expresión en cada uno de los aislados.	165

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de marcaje de las muestras proteicas para DIGE. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 2.** Valores promedios de la temperatura corporal (°C) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 3.** Valores promedios de la frecuencia cardiaca (latidos/minuto) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.** Valores promedios de la frecuencia respiratoria (respiraciones/minuto) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 5.** Valores promedios de la parasitemia (tripanosomas/ml) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 6.** Comparación de los valores promedio de la parasitemia (tripanosomas/ml) y temperatura corporal (°C) en los ovinos infectados con el aislado TvLIEM176 de *T. vivax*..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 7.** Comparación de los valores promedio de la parasitemia (tripanosomas/ml) y temperatura corporal (°C) en los ovinos infectados con el aislado TvMT1 de *T. vivax* **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 8.** Valores promedios del hematocrito (%) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 9.** Valores promedios de la hemoglobina (gr/dl) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 10.** Valores promedios del número total de leucocitos (cel/μl) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 11.** Valores promedios del número total de linfocitos (cel/μl) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 12. Valores promedios del número total de neutrófilos segmentados (cel/ μ l) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 13. Valores promedios del número total de monocitos (cel/ μ l) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 14. Valores promedios del número total de eosinófilos (cel/ μ l) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 15. Valores promedios de las proteínas totales (gr/dl) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 16. Variación de la densidad óptica (DO₄₀₅) a través de la técnica de ELISA en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 17. Comparación de los valores promedio de parasitemia x 10⁶ (tripanosomas/ml) y niveles de anticuerpos (DO₄₀₅) medidos a través de la técnica de ELISA en los ovinos infectados experimentalmente con el aislado TvLIEM176, durante el período pre y post-infección..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 18. Comparación de los valores promedio de parasitemia x 10⁶ (tripanosomas/ml) y niveles de anticuerpos (DO₄₀₅) medidos a través de la técnica de ELISA en los ovinos infectados experimentalmente con el aislado TvMT1, durante el período pre y post-infección..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 19. Mapa bidimensional del contenido proteico del proteoma de los 3 purificados de *T. vivax* (Liem 1, Liem 2, Monagas) y del purificado de *T. evansi* (El Frío) a través de la técnica de 2D DIGE, mostrando los 109 spots resultantes en el primer análisis computarizado. La imagen es la superposición automática de los 4 geles mostrando las coincidencias entre proteínas comunes con diferencias en su expresión **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 20. Mapa bidimensional del contenido proteico del proteoma de los 3 purificados de *T. vivax* (Liem 1, Liem 2, Monagas) y del purificado de *T. evansi* (El Frío) a través de la técnica de 2D DIGE, mostrando los 17 spots que corresponden a proteínas comunes pero con expresión diferencial entre los purificados de *T. vivax*. La imagen es la superposición automática de los 4 geles mostrando las coincidencias entre proteínas comunes con diferencias en su expresión... **¡Error! Marcador no definido.**

- Figura 21.** Volumen normalizado de la intensidad de expresión de los spots seleccionados **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 22.** (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1552. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1552..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 23.** (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1099. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1099..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 24.** (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 985. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 985..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 25.** Figura 25. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 602. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 602 **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 26.** (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 845. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 845..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 27.** (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1928. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1928..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 28.** (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1969. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1969..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 29.** (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 758. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 758..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 30.** (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 793. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 793..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 31.** (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1912. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1912..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 32.** (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1909. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1909..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 33.** (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1903. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1903..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 34.** (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1906. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1906..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 35.** (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1919. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1919..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 36.** (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1979. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1979..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 37. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1986. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1986..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 38. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 559. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 559..... **¡Error! Marcador no definido.**

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

A través del tiempo, la ganadería bovina ha tenido que evolucionar, intentando compensar el aumento de la población humana y de esta manera tratando de aumentar la oferta de productos de origen animal (principalmente leche y carne) para el consumo humano. En Venezuela, esto se ha podido realizar a través de la ganadería de doble propósito, la cual hoy en día es fundamental para lograr la tan ansiada soberanía y seguridad alimentaria. Sin embargo, el mejoramiento genético de la ganadería nativa a través de cruzamientos sistemáticos con razas exóticas de mayor productividad ha traído como consecuencia la inserción de algunos genotipos susceptibles a enfermedades, que se convierten en un serio obstáculo para el desarrollo de la ganadería (Callow, 1983; Toro, 1990).

En este contexto, las hemoparasitosis constituyen unas de las principales enfermedades endémicas de la ganadería en zonas tropicales y subtropicales, causando un impacto negativo en la salud de los rebaños de países en desarrollo (Guglielmone, 1995). En Venezuela, la ganadería de doble propósito no escapa a esta realidad y, hoy en día, las hemoparasitosis se han convertido en uno de los principales diagnósticos a considerar cuando de brotes epidémicos de enfermedades sistémicas se trata (Guillén y col., 2001).

Dentro de las hemoparasitosis que afectan a los animales domésticos, principalmente a rumiantes, está la tripanosomosis, causada por *Trypanosoma (Duttonella) vivax* Ziemann, 1905, el cual afecta a bovinos, ovinos, caprinos y búfalos (Dávila y Silva, 2000; Desquesnes, 2004)

Este protozoario está ampliamente distribuido en África, Centro América y Suramérica (Dávila y Silva, 2000; Morlais y col., 2001; Ventura y col., 2001). En Venezuela, diversos estudios han evidenciado la presencia de *T. vivax* causando la tripanosomosis en los rebaños bovinos considerándose esta enfermedad de carácter endémico (Toro y col., 1980; Toro, 1990; Duno, 1992; Rivera, 1996; Contreras, 2000, Suárez y col., 2009), particularmente en los estados ganaderos: Zulia, Apure, Barinas, Guárico, Portuguesa y Falcón, donde se han detectado prevalencias relativamente altas de *T. vivax* (Rivera, 1996).

Lo relevante de la tripanosomosis provocada por *T. vivax*, radica en el negativo impacto económico que causa por la muerte de los animales, desmejoramiento de la condición física, retardo en el crecimiento, y problemas reproductivos tales como infertilidad y abortos (Sekoni y col., 1990; Silva y col., 1998a, 1998b; Obasi y col., 1999; Camargo y col., 2004; Batista y col., 2006, 2012). Las infecciones de curso agudo y subagudo (menos frecuentes), tienen una expresión clínica caracterizada por fiebre, anemia y mortalidad; en cambio, las formas crónicas o subclínicas (predominante en los bovinos), desencadenan procesos debilitantes en los animales infectados, que al sumárseles factores de estrés como mal nutrición, manejo inadecuado, cambios climáticos, entre otros, provocan un deterioro progresivo de la salud del rebaño, con pérdida de la productividad en las explotaciones ganaderas (Rivera, 1996; Navarrete y Acosta, 1999; Contreras, 2000; Masake y col., 2002).

El diagnóstico de la tripanosomosis bovina en Venezuela se efectúa rutinariamente a través de la detección de los tripanosomas en sangre mediante las técnicas de Woo y frotis sanguíneos de capa blanca (Rivera, 1996; Contreras,

2000). Sin embargo, estas técnicas presentan muy poca sensibilidad, particularmente en animales con infecciones crónicas, en los cuales la parasitemia es muy baja (Ventura y col., 2001; Masake y col., 2002). Considerando que la gran mayoría de las infecciones por tripanosomas a nivel de campo (sobre el 80%) desarrollan bajas parasitemias, y que éstas no pueden ser detectadas por las técnicas aplicadas (Masake y Nantulya, 1991), es difícil precisar la situación actual de la enfermedad en las diferentes zonas ganaderas del país (Tamasaukas y Roa, 1992).

Esta situación conlleva a que las medidas de prevención y control aplicadas en las fincas ganaderas sean ineficientes y no puedan evitarse las pérdidas económicas provocadas por la enfermedad. Los costos de producción se incrementan debido a la aplicación periódica de drogas tripanocidas, la introducción de animales de raza más resistentes a la enfermedad, el manejo del ganado para evitar la proximidad a los hospedadores reservorios, el control de la población de vectores transmisores mediante el uso de insecticidas y trampas, entre otros (Rivera, 1996; Contreras, 2000). Aunque es de común acuerdo las grandes pérdidas económicas causadas por esta enfermedad en la ganadería, son pocos los estudios existentes en Latinoamérica al respecto. En un brote de tripanosomosis en la zona de El Pantanal que abarcaba regiones de Brasil y Bolivia, las pérdidas económicas fueron estimadas en más de 160 millones de dólares (Seidl y col., 1999); sin embargo, no existen estudios al respecto en otros países latinoamericanos. Esto también incluye un importante impacto en el bienestar humano, lo que resulta en disminución de ingresos en entornos de máxima pobreza. En el caso de África, esto ha sido estimado con un costo de

1300 millones de dólares americanos por año (Shaw, 2004)

Los tripanosomas exhiben una considerable variación genética intraespecífica. Por ello se han utilizado marcadores genéticos para las caracterizaciones de algunas especies de estos parásitos, así como su empleo para análisis epidemiológicos y caracterizaciones moleculares de poblaciones (Melville y col., 1998). En este sentido, Morlais y col. (2001) desarrollaron marcadores moleculares específicos para la identificación de *T. vivax*, basados en una secuencia amplificada por PCR de microsatélites que contiene un fragmento repetitivo citosina-adenina. Esta secuencia mostró alto polimorfismo, siendo un marcador conveniente para estudios de genética poblacional. Sin embargo, otros autores (Duffy y col., 2009; Tait y col., 2011, García y col., 2014) consideran que la diversidad genética existente en *T. vivax* es limitada, lo cual es compatible con una reproducción de tipo clonal.

En América del Sur, la tripanosomosis bovina causada por *T. vivax* varía en severidad, yendo desde una presentación muy leve con ligera depresión hasta una condición crónica con pérdida de peso. También pueden ocurrir brotes epidémicos agudos con aborto y gran mortalidad (Taylor y Mertens, 1999; Batista y col., 2006, 2007, Rodrigues y col., 2008). Las razones de estas diferentes manifestaciones no son entendidas aún (Dirie y col., 1993), pero podría pensarse que se deben a las variaciones genéticas anteriormente mencionadas.

A fin de cuentas, está claro que el conocimiento de la diversidad genética de *T. vivax* es limitado, lo cual también limita su significado en términos de diagnóstico, formas de presentación de la enfermedad, respuesta a drogas, aparición de resistencia a tripanocidas entre otros aspectos de importancia (Hamilton, 2012).

Para tener un mejor manejo de la enfermedad causada por *T. vivax*, se deberían desarrollar estudios más profundos acerca de la biología básica del parásito, su dinámica poblacional y en particular investigaciones a nivel posgenómico que permitan evaluar patrones de virulencia y patogenicidad y así comprender las diferentes formas de presentación de la enfermedad.

A este respecto, en los estudios clínicos de la tripanosomosis bovina revisten especial importancia los conceptos de virulencia y patogenicidad. Holzmuller y col. (2008) definen la virulencia como la capacidad del tripanosoma de multiplicarse dentro del hospedador (es decir, la parasitemia) y la patogenicidad como la aptitud para producir daños patológicos y mortalidad. Con relación a esto, Gómez (2010) realizó un estudio comparando 5 aislados venezolanos de *T. vivax* encontrando importantes diferencias tanto clínicas como moleculares entre esos aislados.

Considerando que *T. vivax* está ampliamente distribuido en las regiones ganaderas tradicionales de Venezuela y en razón al impacto económico que tiene la enfermedad en la producción pecuaria, se hace necesario realizar estudios de diferente naturaleza dirigidos a profundizar los conocimientos de esta hemoparasitosis en cuanto a prevalencia, distribución, virulencia, patogenicidad e identificación de los aislados en las diferentes regiones de la geografía nacional.

Debido a esto, se propone realizar un estudio para evaluar la clínica, patología y proteómica de dos aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*.

Este objetivo se complementó con los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Determinar la virulencia y patogenicidad de los dos aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax* a partir de ovinos inoculados experimentalmente.
- 2.- Comparar las lesiones anatomopatológicas producidas por los dos aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax* en ovinos inoculados experimentalmente
- 3.- Comparar los patrones polipeptídicos de los dos aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax* por 2D-DIGE.
- 4.- Identificar las proteínas cuya expresión sea diferencial entre los dos aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax* mediante espectrometría de masas.
- 5.- Determinar la función de las proteínas identificadas a través de herramientas bioinformáticas

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- Tripanosomosis Bovina

2.1.1.- Etiología

Trypanosoma (Duttonella) vivax, es una especie monomórfica, la cual mide de 20 a 27 μm (media de 22,5 μm) de longitud por 3 μm de ancho. La porción posterior es más ancha y bulbosa, el kinetoplasto es grande y terminal, presenta un flagelo libre corto que mide entre 3-6 μm de longitud, con escaso desarrollo de la membrana ondulante. Es muy móvil en sangre fresca y se desplaza rápidamente a través del campo microscópico (Rivera, 1996; Urquhart y col., 1996). Entre sus hospedadores se incluyen bovinos, ovinos, caprinos, búfalos y cérvidos, localizándose principalmente en sangre, linfa y nódulos linfáticos (Mayaudón, 1973; Soulsby, 1987; Gardiner, 1989).

Este protozoo se clasifica taxonómicamente en el Reino Animalia, Subreino Protozoa, Phylum Sarcomastigophora, Subphylum Mastigophora, Clase Zoomastigophora, Orden Kinetoplastida, Suborden Trypanosomatina, Familia Trypanosomatidae, Género *Trypanosoma*, Subgénero *Duttonella* (Desquesnes, 2004).

2.1.2.- Reseña Histórica

Trypanosoma vivax fue introducido en América Latina en bovinos importados de África, posiblemente a finales del siglo XIX. Este parásito está ahora presente en 10 de los 13 países de Suramérica, ocasionando frecuentemente una severa enfermedad debilitante y muertes (Otte y col., 1994; Jones y Dávila 2001).

Desde que fue detectado por primera vez en bovinos de la Guayana Francesa (1919), *T. vivax* ha sido identificado en la sangre de bovinos en Venezuela (1920), Guadalupe (1926), Martinique (1929), Colombia (1931), Surinam (1938), Panamá (1941), Guyana (1952) y Brasil (1972). A través de anticuerpos para *T. vivax* se ha reportado en bovinos de El Salvador (1977), Costa Rica (1977), Ecuador (1977), Perú (1977), Paraguay (1977) y más recientemente, en Bolivia (1995) y Costa Rica (Wells y col., 1982a; Contreras, 2000; Jones y Dávila, 2001; Oliveira y col., 2009).

En Venezuela, el primer reporte de *T. vivax* fue hecho por Tejera en 1920, pero con el nombre de *T. casalboui* (Mayaudon, 1973), luego Fernández en 1931 realiza un estudio de una epizootia ocurrida en bovinos del llano, siendo ampliada esta observación por Kubes en 1944, quien describe la morfología del parásito y los síntomas de la enfermedad (Rivera, 1996).

Diversas investigaciones realizadas en el país demuestran una amplia distribución geográfica de *T. vivax* (Toro y col., 1980; Toro, 1990; Duno, 1992; Tamasaukas y Roa, 1992; Rivera, 1996; Espinoza y col., 1999; Guillén y col., 2001, Suárez y col., 2009). Toro (1990), en un estudio seroepidemiológico de las hemoparasitosis en 10 estados del país, señala una prevalencia de la tripanosomosis en bovinos que oscila entre 3,4% y 33,5% con un promedio de 20,8%. Tamasaukas y Roa (1992) informan sobre una seroprevalencia para *T. vivax* de 33,8% en diecinueve fincas bovinas ubicadas en el nor-centro y sureste del estado Guárico durante la época lluviosa.

Por su parte, Duno (1992), en un estudio realizado en bovinos de la zona nororiental del estado Falcón, revela la existencia de una seroprevalencia para

T. vivax de 57,8%. En 1992, Rivera (1996) determinó una seroprevalencia de 78% en bovinos de nueve fincas del estado Táchira y Tamasaukas y col. (2000), presentaron resultados de seroprevalencia de *T. vivax* de 3,9% en bovinos localizados en fincas de los estados Aragua y Guárico durante la época seca, ambos estudios emplearon la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) como método de diagnóstico. A pesar de la amplia difusión de *T. vivax* en muchas regiones del país y las considerables pérdidas que se asocian a la infección tripanosómica, es poca la información disponible sobre el comportamiento de esta enfermedad en los rebaños bovinos (Toro, 1990; Sandoval y col., 1998; Espinoza y col., 1999).

2.1.3.- Transmisión de *T. vivax*

De las tres principales especies de tripanosomas transmitidos por la mosca tse-tsé y que afectan a rumiantes, solo *T. vivax* puede distribuirse en dos formas, la impuesta y limitada por su vector, y la establecida por él mismo en Suramérica. Estudios morfométricos, marcaje de ADN y análisis bioquímicos de isoenzimas, sugieren que el *T. vivax* del nuevo mundo proviene del Oeste de África y se diferencia del parásito africano en la diversidad de sus antígenos de superficie y su incapacidad para infectar y crecer en la mosca tse-tsé *in vitro* (Jones y Dávila, 2001).

El movimiento irregular de animales infectados de un lugar a otro en fronteras nacionales e internacionales es probablemente la principal vía por la cual el parásito entra a nuevas áreas. Sin embargo, una vez que el parásito es introducido en una zona, su subsiguiente transmisión no está bien determinada (Silva y col., 1998a; Jones y Dávila, 2001). La transmisión mecánica o no cíclica

por parte de insectos hematófagos, tales como tábanos o moscas de establo (*Stomoxys* spp.), se cita como el principal método de transmisión de *T. vivax* en Suramérica (Soulsby, 1987; Otte y col., 1994; Jones y Dávila, 2001; Desquesnes, 2004; Osório y col., 2008). Es bien conocido que en el nuevo mundo, *T. vivax* puede ser transmitido por varias especies de moscas picadoras y en muchas áreas endémicas de Suramérica existen fuertes evidencias de que ocurre este mecanismo de transmisión (Otte y col., 1994; Jones y Dávila, 2001, Osório y col., 2008).

Los tábanos se consideran como los principales transmisores del parásito en Suramérica, representando el período de lluvias la época de mayor riesgo de transmisión, debido a la abundancia de estos insectos y la acumulación de animales en áreas secas (Otte y col., 1994; Silva y col., 1998a; 1998b, Osório y col., 2008). Las garrapatas, vampiros (*Desmodus rotundus*) y triatomídeos se citan como potenciales vectores de *T. vivax* pero esta posibilidad no está sustentada (Uzcanga y col., 2004). En rumiantes se ha demostrado la transmisión transplacentaria de *T. vivax*, (González y Espinoza, 1994; Elhassan y col., 1995; Jones y Dávila, 2001); y también es probable que la transmisión iatrogénica vía agujas e instrumentos tenga importancia, aunque no siempre sea reconocida su contribución a la propagación local durante las vacunaciones u otras prácticas de tratamiento en masas.

2.1.4.- Impacto económico de la tripanosomosis

Las enfermedades animales generan un impacto económico muy amplio que puede ser directo o indirecto, y pueden variar desde un problema muy localizado hasta uno global. En África, la tripanosomosis ocupa el tercer lugar de las

enfermedades de los bovinos que impactan negativamente en la población humana (Perry y col., 2002), causando más de 3 millones de muertes de bovinos y generando la aplicación de más de 35 millones de dosis de drogas tripanocidas por año. En el África Sub-sahariana, el total de las pérdidas económicas en la ganadería ascienden a 1.200 millones de dólares anuales (FAO, 2004). Esta enfermedad representa un importante obstáculo en la producción de la ganadería tanto en África como en América, ya que tiene un impacto directo en la productividad y el manejo de la ganadería y un efecto indirecto en el bienestar humano (Swallow, 2000). Además, existen algunos inconvenientes asociados con el control de la enfermedad que aumentan el efecto económico, tales como el emergente problema con la resistencia a las drogas tripanocidas.

Por esta razón, el panorama que se vislumbra refleja el mismo patrón visto décadas atrás, ya que *T. vivax* representa un factor limitante en la producción animal en toda Latinoamérica, debido a que parece ser enzootica desde Paraguay hasta Centroamérica, con brotes epizooticos esporádicos que causan una mortalidad, morbilidad y pérdidas económicas significativas (Desquesnes, 2004).

Son pocos los estudios que se han realizado en Latinoamérica sobre el impacto económico que la tripanosomosis puede llegar a tener en rebaños de rumiantes. En Colombia, hace poco más de tres décadas, se calculó que esta enfermedad llegaba a producir pérdidas por el orden de 56 US\$ por animal (Betancourt y Wells, 1979; Wells y col., 1982a), por lo cual la tripanosomosis fue considerada como la tercera enfermedad de los bovinos en importancia económica en ese país (Wells y col., 1982a; Otte y col., 1994).

Por otra parte, en el año 1995 se presentó un brote de tripanosomosis en la región de El Pantanal en Brasil, resultando en pérdidas financieras para los productores en términos de pérdidas de productividad incluyendo abortos, infertilidad y muerte de animales jóvenes y adultos. Desde el punto de vista de la productividad, se estimó que el 34,5 % de todos los animales sufrió de infertilidad por un año, efecto financieramente equivalente a un aborto por cada animal afectado durante el brote de la enfermedad. Realizando el tratamiento para todos los animales, el total estimado de las pérdidas económicas durante el mencionado brote fue de aproximadamente el 4% del valor de cada animal, lo cual representaría un total de 160 millones de US\$, tomando en consideración que en El Pantanal existen aproximadamente 11 millones de cabezas de ganado. Sin embargo, si no se aplicara el tratamiento correspondiente, las pérdidas económicas ascenderían al 17 % del valor de cada animal, lo que equivaldría a unas pérdidas totales de 700 millones de US\$ (Seidl y col., 1999).

En otro brote de tripanosomosis en Minas Gerais, Brasil, se calculó que esta enfermedad produjo una disminución del 27 % en la producción látea y 45 % en la tasa de preñez (Abrão y col., 2009).

En resumen, la valoración completa del impacto económico de esta enfermedad debería realizarse tomando en cuenta la situación epidemiológica tan compleja en Latinoamérica donde pueden ser infectados tanto bovinos como ovinos, caprinos, bufalinos y hasta equinos, los cuales generalmente conviven juntos en muchas unidades de producción extensivas y donde se reportan brotes esporádicos. Además, las infecciones por *T. vivax*., frecuentemente están acompañadas por otros agentes hemotrópicos (tales como *Babesia bigemina*,

Babesia bovis y/o *Anaplasma marginale*) que pueden contribuir a la morbilidad, mortalidad e infertilidad de los animales con el consecuente impacto en la productividad (Gonzatti y col., 2014). La cuantificación de las pérdidas económicas por *T. vivax* debe incluir otros costos, tales como tratamientos curativos o preventivos, personal y asistencia veterinaria y el impacto en los cultivos y sistemas agrícolas. Sin embargo, desde el punto de vista de las pérdidas producidas en rebaños bovinos, no solamente deben ser incluidas las causadas por *T. vivax*, sino que también es importante incluir los costos debidos a la enfermedad producida por *T. evansi* en caballos. En Venezuela, los caballos son indispensables para la cría de ganado extensiva, y este sistema de cría es muy común en gran parte del país. Para el año 2008, las pérdidas causadas en ganadería bovina debido la tripanosomosis en equinos por *T. evansi* fueron calculadas en casi 7,5 millones de US\$ (Moreno y col., 2013).

2.1.5.- Aspectos fisiopatológicos y clínicos de la tripanosomosis

La tripanosomosis bovina causada por *T. vivax* es una enfermedad con unas características clínicas muy variables, debido, en parte, a factores tales como: virulencia de la cepa, susceptibilidad de las especies hospedadoras, inmunidad del animal infectado, entre otros (Ventura y col., 2001). La enfermedad puede desarrollarse en una forma aguda, subaguda o crónica (Maikaje y col., 1991; Navarrete y Acosta, 1999). En los cursos agudos o subagudos, apenas da tiempo a que se establezca una sintomatología, observándose especialmente un síndrome febril con temperaturas que llegan hasta 41 °C y que se repiten cíclicamente, alrededor de cada 8-9 días (Sandoval y col., 1995a; Navarrete y Acosta, 1999). La fase crónica generalmente se asocia con infecciones de

semanas o meses anteriores y con una lenta y persistente pérdida de condición, terminando eventualmente en muertes (Holmes y col., 2000).

En los casos de tripanosomosis crónica, los animales pueden sobrevivir por mucho tiempo, presentándose en algunos de ellos signos clínicos leves de la enfermedad y, es en estos animales, donde los efectos en el sistema reproductivo adquieren importancia (Luckins, 1992; Holmes y col., 2000).

En Suramérica, las infecciones con *T. vivax* en bovinos varían en severidad, se reportan desde cuadros agudos a casos crónicos (Dirie y col., 1993). Silva y col. (1999) señalan que en Suramérica los brotes severos de tripanosomosis bovina son esporádicos y los principales síntomas de la enfermedad en bovinos del Brasil son pérdidas ligeras de peso dentro de un corto período de tiempo, anemia y abortos.

En Venezuela, se ha observado que los animales infectados con *T. vivax* desarrollan inicialmente un cuadro febril, acompañado de anorexia, aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria, anemia y progresivamente se tornan débiles e improductivos. El curso de la enfermedad es generalmente de evolución crónica y debilitante, con pérdida de condición física, anemia progresiva, trastornos de la locomoción, palidez de las mucosas, agrandamiento de los ganglios linfáticos y eventualmente postración y muerte por la infección que perdura durante meses o años (Toro y col., 1980; Espinoza, 1988; Sandoval y col., 1995a; Rivera, 1996). Contreras (2000) considera que el período de recuperación de los animales sometidos a tratamiento es bastante lento y en algunos casos clínicos observados en bovinos, detectó edema palpebral y cierto grado de opacidad de la córnea.

Parasitemias demostrables en frotis de sangre son debidas a la infección de animales susceptibles o inmunosupresiones por condiciones de estrés. Los niveles de parasitemia fluctúan marcadamente; los periodos de alta parasitemia son seguidos por periodos cortos donde no se detecta el parásito en sangre. El estado inmunológico del rebaño, así como la raza y el grado de desafío determinan la aparición o no de signos clínicos (Wells y col., 1982a; Sandoval y col., 1995a; Suarez y col., 2003).

Facer y col. (1982) reportan que el primer pico de parasitemia, luego de la infección, es el más alto y se acompaña con una disminución simultánea en el volumen del paquete celular (VPC), contaje de eritrocitos y concentración de hemoglobina. El inicio de la anemia en algunos casos está relacionado con la presencia de los parásitos en sangre y su severidad con el grado y duración de los picos de parasitemia.

El mecanismo o fisiopatología de la anemia en la tripanosomosis es compleja y multifactorial en su origen (Naessens y col., 2005), la cual se inicia con una cascada de eventos que conllevan a anemia hemolítica y colapso cardiovascular (Anosa, 1988a; 1988b). En la tripanosomosis se ha reportado que ocurren tres fases de anemia: Fase 1 o de crisis aguda, Fase 2 o de anemia crónica y Fase 3 o fase de recuperación (Anosa, 1988a).

La fase 1 o de crisis aguda comienza con la aparición de tripanosomas circulantes en sangre. La parasitemia en este caso es usualmente alta, fluctuante y evidente in la mayoría de los días (Anosa e Isoun, 1980; Anosa, 1988a; Mbaya y col., 2012). Durante esta fase, la anemia es morfológicamente clasificada como macrocítica y normocrómica (Anosa e Isoun, 1980). En este estadio es común la

muerte de los animales debido a una pancitopenia severa y otras patologías (Anosa 1988a).

La fase 2 o crónica sigue a la fase aguda y se caracteriza por bajos niveles de parasitemia. El hematocrito, la hemoglobina y el número de eritrocitos es de bajo a moderado con pocas fluctuaciones. Este período puede ir de varias semanas a meses. En esta fase aparasitémica, los tripanosomas ocupan espacios extravasculares pudiendo causar lesiones nerviosas (Batista y col., 2007; 2011).

Por último, la fase 3 o recuperación está caracterizada por una parasitemia baja o ausente. En este punto, los valores del hematocrito y número de eritrocitos comienzan a recuperarse, además de resolverse otros cambios patológicos existentes, conllevando a la auto-recuperación (Anosa, 1988a).

La aparición de la anemia se debe a la interrelación de varios factores, entre los cuales están: daño directo al eritrocito por el flagelo del parásito, fiebre ondulante, agregación plaquetaria, toxinas y metabolitos liberados por el tripanosoma, peroxidación lipídica y malnutrición (Igbokwe, 1994; Mbaya y col., 2012). Además, factores idiopáticos del suero y el factor de necrosis tumoral (TNF) son responsables de causar diseritropoyesis (Mabbott y Sternberg, 1995; Millar y col., 1999).

Aún así, la competencia inmunológica no es esencial para el desarrollo de anemia. Ratas irradiadas pueden volverse anémicas después de la infección con *T. brucei* (Murray y col., 1982) y la depleción de células T no afectó la anemia en bovinos (Sileghem y Naessens, 1995; Naessens y col., 2002). Una comparación de diferentes combinaciones hospedador-parásito reveló que no hay correlación

entre patología y supervivencia (Magez y col., 2004). Estos datos sugieren que la anemia es una consecuencia de la respuesta del hospedador a la infección y no directamente inducida por los productos de los parásitos (Noyes y col., 2009).

2.1.6.- Aspectos inmunológicos de la tripanosomosis

La naturaleza de los antígenos de los tripanosomas salivarios es compleja y representa un ejemplo clásico de la variación antigénica como mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador (Urquhart y Holmes, 1987). Los antígenos de los tripanosomas se dividen en dos grupos: un primer tipo conocido como antígenos comunes, los cuales se derivan de los diferentes componentes internos del protozoario, conformados por proteínas estructurales y enzimas; no son variables en el sentido de que pueden ser aislados de una determinada población de parásitos en cualquier punto de la infección en el animal; no son protectores y son responsables de reacciones serológicas cruzadas entre especies. El segundo tipo o antígenos variables, son responsables de la variación antigénica y se encuentran en la superficie del tripanosoma (Urquhart y Holmes, 1987; Gardiner, 1989).

Dentro del hospedador mamífero, los tripanosomas presentan una membrana superficial recubriendo a la membrana plasmática, la cual está conformada por glicoproteínas variantes de superficie (VSG). El término variante obedece al hecho de que cada parásito tiene un estimado de 1000 genes para estas glicoproteínas, por lo que cada parásito expresa una superficie de membrana antigénicamente distinta (Taylor y Mertens, 1999).

En una población de parásitos, una pequeña proporción de tripanosomas

expresan una membrana superficial que es antigénicamente distinta de la mayoría de la población y que es resultado de la expresión de diferentes genes VSG. Los parásitos que presentan un nuevo fenotipo antigénico evitan la eliminación por parte de los anticuerpos anti-VSG del hospedador y dan origen a un nuevo pico de parasitemia (Taylor, 1998). Bovinos inmunizados con tripanosomas irradiados o VSG purificadas son protegidos contra la infección con tripanosomas homólogos (aquellos que expresan la misma VSG), pero no con heterólogos (Wells, 1982b)

La variación antigénica es consecuencia de la sustitución de un gen activo de VSG por algunos de los 1000 genes de la reserva. Ya que sólo se expone a los anticuerpos del hospedador una pequeña parte de la VSG densamente empacada, no es necesario que cambie la molécula completa. La sustitución de los epitopos expuestos basta para una variación antigénica eficaz. Al principio de las infecciones por tripanosomas, ocurre un cambio del gen completo para la VSG; después, sustituciones parciales y mutaciones puntuales crean nuevas especificidades antigénicas (Taylor y Mertens, 1999). Las VSG que se producen en las etapas iniciales de las infecciones por tripanosomas tienden a desarrollarse con una secuencia predecible. Sin embargo, conforme avanza la infección, la producción de glicoproteínas variantes de superficie se vuelve más azarosa. Los tripanosomas que se multiplican en cultivo de tejido también muestran variación antigénica espontánea, lo cual demuestra que el cambio en la VSG no es necesariamente inducido por anticuerpos (Taylor y Mertens, 1999; Tizard, 2013).

Según Gardiner y Wilson (1987), *T. vivax*, al igual que otros tripanosomas

salivarios, presentan el fenómeno de la variación antigénica, lo que impide el desarrollo por parte del hospedador de una respuesta inmunitaria eficiente, además, dicho fenómeno se relaciona con las fluctuaciones cíclicas de la parasitemia, que permite picos y recaídas de la misma durante la infección. Cada período de parasitemia alta corresponde a la expansión de una población de tripanosomas con nuevas glicoproteínas de superficie. La muerte de esta población por anticuerpos ocasiona un rápido descenso de la parasitemia; sin embargo, de los sobrevivientes, algunos expresan nuevos antígenos superficiales y se reproducen sin impedimento. En consecuencia, se origina una nueva población, la cual produce una vez más un período de parasitemia alta. Este mecanismo de variación antigénica es importante en la relación parásito-hospedador que determina la persistencia de la infección y dificulta el posible desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y control de la enfermedad (Tizard, 2013).

Con relación a la respuesta inmunitaria del hospedador frente a la infección por tripanosomas, entran en juego elementos no específicos y específicos de protección de primera línea de defensa contra el parásito en particular y generalmente consiste en un mecanismo, mediante el cual, se reconoce el antígeno pero no se desarrolla una respuesta inmunitaria específica. Estos mecanismos incluyen barreras de tipo físico y químico, fagocitosis y la activación del complemento (Vickermam y Barry, 1982).

La localización extracelular de los tripanosomas conlleva a que la respuesta inmunitaria dominante por parte del hospedador sea humoral; es característico en las tripanosomosis bovinas, la activación policlonal de células B, demostrada

por el aumento en el número de células B y por los elevados niveles de IgM. Los anticuerpos producidos durante la infección pueden ser protectivos, ya que ellos median la limpieza del parásito, la remoción de complejos inmunes y la neutralización de productos secretados por el parásito. La eliminación de complejos antígeno-anticuerpo es regulada por la activación del complemento y por la unión de células fagocíticas, ambos procesos son dependientes del isotipo (Taylor, 1998; Hill y col., 2005).

La unión mediada por anticuerpos de los tripanosomas y su posterior ingreso a las células fagocíticas, ocurre en ausencia de complemento; el complemento mejora la eficiencia en la remoción de parásitos y complejos inmunes. Resultados experimentales evidencian que los tripanosomas son lisados *in vitro* en presencia de anticuerpos específicos de VSG y complemento, además, ambas vías (clásica y alterna) son activadas durante la infección; sin embargo, esto pareciera no ser un evento significativo en la tripanosomosis (Taylor, 1998).

En bovinos infectados con *T. vivax* y *T. congolense*, se ha observado una disminución en los niveles séricos del complemento hemolítico de la vía alterna y de C3 de la vía clásica, además IgM y algunas IgG fijan complemento, siendo la IgM más eficiente en este sentido. En ausencia de cantidades suficientes de C3, los complejos inmunes pueden persistir y conllevar a la activación policlonal de células B. Se ha demostrado que la sensibilidad de las células B para ser activadas por antígenos aumenta a través de la interacción con complejos antígeno-anticuerpo-complemento en la superficie de células dendríticas foliculares (Taylor, 1998).

La inmunodeficiencia es una característica de la tripanosomosis bovina, que ha

sido bien documentada (Taylor, 1998), ésta compromete la habilidad del animal para controlar la enfermedad, y para detener infecciones secundarias (Taylor y Mertens, 1999). Durante la infección por tripanosomas se ha observado una disminución de la respuesta humoral primaria frente a otros antígenos, aunado a una disminución de la proliferación de células T (estimulada por mitógenos y antígenos) y a la secreción de citocinas. A pesar de estas observaciones, no se ha establecido una relación significativa entre la severidad de la enfermedad y la disminución de la respuesta de células B (para antígenos no-tripanosomas) y células T (proliferación y producción de citocinas) en ratones y bovinos durante las primeras fases de la infección (Taylor, 1998).

La respuesta de proliferación de células T está disminuida durante la infección, lo cual se asocia a la disminución en la producción de interleuquina-2 (IL-2) y del receptor de IL-2 (IL-2R) (Hill y col., 2005). Se ha demostrado que una caída en la producción de CD8+ no afecta la parasitemia o la anemia observada durante la infección, además ni las células CD4+, CD8+, y T- $\gamma\delta$ participan en el control de la parasitemia. Estos resultados sugieren que la respuesta inmunitaria innata puede estar más activamente involucrada en la habilidad de los animales tripanotolerantes para controlar la parasitemia y puede ser independiente de la respuesta inmunitaria adquirida (Hill y col., 2005).

La inmunidad protectora en bovinos puede ser inducida por la producción de anticuerpos específicos contra tipos de antígenos variantes que reaccionan con las glicoproteínas (VSG) de los tripanosomas (Luckins, 1992). Los anticuerpos específicos contra antígenos variantes promueven la lisis de los tripanosomas y la activación de macrófagos (Hill y col., 2005).

2.1.7.- Inmunodiagnóstico en la tripanosomosis

Los procedimientos de diagnóstico, ampliamente utilizados en la tripanosomosis, son los métodos parasitológicos directos, mediante los cuales se observa el parásito al microscopio en frotis de sangre coloreados o por la técnica de Woo (Ventura y col., 2001; Boulangé y col., 2002, Paris y col., 1982). El principal inconveniente con estos métodos es su baja sensibilidad particularmente en animales con infecciones crónicas (Ventura y col., 2001; Masake y col., 2002).

A nivel mundial se han desarrollado técnicas serológicas para el diagnóstico de la tripanosomosis bovina, las cuales detectan anticuerpos específicos o antígenos parasitarios en la sangre de animales infectados (Nantulya y col., 1992; Greiner y col., 1997; Kayang y col., 1997; Rebeski y col., 1999; 2000). Diversos procedimientos basados en un ELISA sandwich directo para capturar antígenos parasitarios han sido probados, pero los resultados arrojan una baja sensibilidad y especificidad, además, han fallado al aplicarlos en infecciones naturales (Nantulya y col., 1992; Eisler y col., 1998; Rebeski y col., 1999). Otros, como el ELISA indirecto, para detectar anticuerpos utilizando extractos del tripanosoma como antígeno se han probado; sin embargo, los resultados no han sido satisfactorios, requiriéndose una completa estandarización de la técnica (Greiner y col., 1997; Rebeski y col., 1999; Boulangé y col., 2002).

La búsqueda de antígenos idóneos para su uso en serodiagnóstico está enfocado en la evaluación de proteínas antigénicas de tripanosomas especie-específicas capaces de ser reconocidas por sueros de animales enfermos y su posterior producción mediante técnicas de ADN recombinante (Authié y col., 1993; Boulangé y col., 2002; Uzcanga y col., 2002; Camargo y col., 2004; Bolívar

y col., 2007; Laha y Sasmal, 2008). En este sentido, Boulangé y col. (2002), identificaron una proteína invariable de 69 kDa, de *T. congolense* y posteriormente la probaron como antígeno en un ELISA indirecto, previa producción mediante tecnología de recombinación.

Los resultados demostraron una baja sensibilidad en bovinos con infecciones primarias, sin embargo, esta proteína recombinante presentó una alta sensibilidad en animales re infectados. Laha y Sasmal, (2008), compararon el perfil proteico de tres aislados de *T. evansi* tomados de diferentes hospedadores, además caracterizaron proteínas inmunogénicas de dichos aislados mediante análisis de Western Blot, encontrando una reactividad cruzada entre los aislados de *T. evansi* en diferentes hospedadores. Un ELISA para detectar anticuerpos empleando antígeno crudo de *T. vivax*, en Brasil, mostró una alta sensibilidad y especificidad, además de diferenciar las infecciones con *T. evansi*, al presentarse solo un caso de reacción cruzada, en un bovino infectado con *T. vivax* (Madruga y col., 2006).

Otra técnica de aglutinación con látex usando anticuerpos monoclonales, fue desarrollada para identificar antígenos circulantes en bovinos infectados naturalmente con *T. vivax*, *T. brucei* y *T. congolense*, pero los resultados indicaron dificultades en la detección de animales con infecciones confirmadas por métodos parasitológicos (Kayang y col., 1997).

Los métodos de diagnóstico basados en secuencias de ADN para detectar *T. vivax*, son variados e incluyen pruebas basadas en ADN satélite o secuencias repetitivas de ADN (Kukla y col., 1987; Dirie y col., 1993), también PCR usando como marcador secuencias de cADN que codifican para el antígeno empleado

en el ELISA o, secuencias de ADN satélite (Kukla y col., 1987; Morlais y col., 2001; Ventura y col., 2001; Masake y col., 2002), todas estas técnicas han contribuido en la identificación y caracterización de las especies de tripanosomas, además de proveer un método de diagnóstico preciso y confiable. Particularmente la técnica de PCR, se considera una técnica muy sensible para detectar tripanosomas, sin embargo, sus principales inconvenientes como método de diagnóstico rutinario, son la necesidad de laboratorios específicos con equipos de alta tecnología y los altos costos (Boulangé y col., 2002; Desquesnes y Dávila, 2002).

Ventura y col. (2001) evaluaron un protocolo de PCR para diagnóstico específico de *T. vivax* basado en secuencias de ADN, a través del cual se amplificó ADN de aislados de *T. vivax* de Suramérica (Brasil, Bolivia y Colombia) y África. Los resultados indican que este protocolo presentó alta especificidad y sensibilidad, logrando detectar el contenido de ADN de un solo parásito, además, reveló la presencia de *T. vivax* en animales asintomáticos y sin parasitemias detectables por frotis o por microhematocrito.

Un procedimiento de diagnóstico que combina la sensibilidad y especificidad de la PCR con la versatilidad del ELISA, ha sido probado en la detección de animales infectados con *T. vivax* y *T. brucei* (Masake y col., 2002). Resultados de esta investigación indican que mediante la técnica de ELISA, se logró detectar productos del PCR entre 10 a 100 veces más que por la coloración fluorescente de los productos del PCR contenidos en geles de agarosa, además la prueba de captura permitió verificar la autenticidad del producto del PCR. Otra ventaja demostrada es que el ELISA puede analizar rápidamente múltiples muestras de

PCR, simultáneamente. Finalmente, el estudio concluye que la técnica PCR-ELISA es una excelente opción para revelar los productos del PCR en la fase sólida de hibridación, ya que dichos productos biotinilados pueden ser visualizados directamente por el cambio de color.

En Venezuela el diagnóstico de *T. vivax* se realiza rutinariamente a través de la detección de los tripanosomas en sangre mediante las técnicas de Woo y frotis sanguíneo (Rivera, 1996; Contreras, 2000). En estudios de seroprevalencia realizados en diferentes zonas ganaderas del país, se aplicó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), los resultados señalan que dicha técnica resulta de gran utilidad. Sin embargo, su principal desventaja es que falla en la detección de infecciones tempranas por lo que se recomienda, para estudios epidemiológicos, utilizarla aunada a exámenes directos, particularmente la técnica de microcentrifugación (Toro, 1990; Duno, 1992; Tamasauskas y Roa, 1992; Rivera, 1996). Mediante la prueba de ELISA-Ac/*T. evansi* para detectar anticuerpos anti-*T. vivax*, Espinoza y col. (1999) evaluaron sueros bovinos en tres localidades del estado Bolívar entre 1996 y 1997, determinando un promedio de 30% de animales positivos.

Así mismo, algunas investigaciones se han enfocado en la identificación y aislamiento de proteínas antigénicas de *T. evansi*, que son responsables de una alta reactividad cruzada con *T. vivax*, con el propósito de evaluar el potencial de dichas proteínas en la detección de animales infectados con *T. vivax* (Uzcanga y col., 2002; Camargo y col., 2004; Uzcanga y col., 2004). Diversos estudios indican una alta reactividad inmunitaria cruzada entre *T. evansi* y *T. vivax* (Reyna-Bello y col., 1998; Uzcanga y col., 2002), y consideran que la producción

de antígenos de *T. vivax* es un factor limitante debido a que este parásito es difícil propagarlo en modelos animales experimentales (Gardiner, 1989), motivo por el cual, enfocan sus investigaciones a la búsqueda de antígenos de *T. evansi* responsables de esta reacción cruzada.

En este sentido, Uzcanga y col. (2002), purificaron una proteína glicosilada de 64 kDa (p64), con reactividad cruzada, aislada de *T. evansi* (aislado TEVA1) y la identificaron como la forma soluble de una glicoproteína variante de superficie (VSG). Por su parte, Camargo y col. (2004) purificaron dos proteínas antigénicas con pesos moleculares de aproximadamente 51 y 68 kDa de la fracción citosólica del mismo aislado de *T. evansi*, mediante cromatografía secuencial en DEAE-sepharosa y sephacryl S-300. Sueros obtenidos de animales con *T. evansi* y *T. vivax* fueron capaces de inmuno-reconocer ambas proteínas purificadas, definiendo su potencial como antígenos de reactividad cruzada.

Sin embargo, Bolívar y col. (2007), purificaron y caracterizaron dos proteínas de 32 kDa y 66 kDa de la fracción citoplasmática de un aislado de *T. vivax*, las cuales fueron reconocidas por sueros de bovinos positivos a *T. vivax*, pero no por sueros de equinos infectados por *T. evansi*, concluyendo que dichas proteínas presentan gran especificidad y que además pueden ser usadas para discriminar infecciones entre ambos parásitos.

2.1.8.- Situación actual

La situación de la tripanosomosis bovina en Venezuela se desconoce, debido en parte a la falta de laboratorios de diagnóstico que ofrezcan un resultado rápido y confiable. Los laboratorios existentes emplean técnicas parasitológicas directas,

poco sensibles, mientras que algunas pruebas serológicas han sido realizadas con fines experimentales. Estas circunstancias dificultan la implementación de medidas de control y prevención de la enfermedad que pudieran evitar las cuantiosas pérdidas económicas ocasionadas por la tripanosomosis en las regiones ganaderas del país.

Actualmente existen en el mercado internacional estuches comerciales ELISA para detectar *T. vivax* y otros tripanosomas patógenos, además de protocolos para PCR con cebadores especie específicos (Rebeski y col., 2000; Masake y col., 2002; Gonzáles y col., 2006; Madruga y col., 2006). Sin embargo, las limitantes de esta tecnología, se enfocan principalmente en los altos costos de los reactivos y equipos, que hacen inviable la aplicación de tales técnicas, para ofrecerlas al mercado nacional. Además, se hace necesario desarrollar técnicas de serodiagnóstico empleando aislados venezolanos de *T. vivax*, ya que existen diferencias antigénicas entre tripanosomas de diferentes zonas geográficas, que pueden afectar los resultados seroepidemiológicos de los rebaños evaluados (Rebeski y col., 2000).

En relación con estas diferencias entre aislados, Gómez (2010) realizó una investigación donde evaluó cinco aislados de *T. vivax* provenientes de diferentes regiones geográficas de Venezuela, desde el punto de vista hematológico, morfométrico y molecular. En cuanto a la evaluación hematológica, se encontraron diferencias tanto en los promedios de parasitemia presentados por los animales infectados con los cinco aislados de *T. vivax*, así como en los parámetros hematológicos como hematocrito, número de glóbulos rojos, número de glóbulos blancos y contaje diferencial de los mismos, concluyéndose que

existían diferencias en la virulencia y patogenicidad de estos aislados. De especial atención fueron los aislados TvMT1 (proveniente del estado Monagas), el cual presentó una baja virulencia con una patogenicidad moderada y el aislado TvLIEM76 (proveniente del estado Trujillo) que demostró tener alta virulencia y baja patogenicidad.

2.2.- Proteómica

La proteómica es uno de los métodos de separación proteica más potentes y útiles que existen hoy en día. Es una tecnología relativamente reciente, que comenzó a usarse a finales de los años 70 únicamente como herramienta analítica para la separación y caracterización proteica (O'Farrell, 1975). El término proteómica fue acuñado en 1995 para describir la caracterización del conjunto de todas las proteínas presentes en una célula, fluido o tejido en un momento dado (Wasinger y col., 1995; Anderson y Anderson, 1996). La proteómica comenzó a ser popular a finales de los años 80, con la aparición de las membranas PVDF (Bauw y col., 1989) y la creación de la primera base de datos para geles bidimensionales. Posteriormente, con la aparición y mejora de diversos métodos de preparación y extracción proteica de la muestra, así como de las distintas herramientas de secuenciación, la proteómica comenzó a tener una mayor importancia como método preparativo y de análisis de las proteínas. Fue sufriendo un progresivo auge durante los años 90 coincidiendo con el desarrollo de la espectrometría de masas, técnica de apoyo fundamental.

La proteómica permite realizar el análisis del conjunto de todas las proteínas presentes en una única muestra (célula, tejido, órgano o fluido y en definitiva cualquier muestra que contenga proteínas) en un momento dado; pero no sólo

aquellas proteínas procedentes de la expresión génica, sino también de todas aquellas proteínas generadas por las distintas modificaciones postraduccionales (Biron y col., 2011).

Es importante eliminar la idea de que un gen origina una única proteína. Un gen es capaz de originar múltiples productos proteicos (Gygi y col., 1999) debido a la gran variedad de modificaciones y procesos a los que puede verse sometido, como el *splicing* alternativo, modificaciones postraduccionales y los efectos del medio ambiente que rodea a la célula (fármacos, variaciones en las condiciones ambientales como la temperatura, pH, entre otros), condicionando lo que se conoce como fenotipo. Mientras el genoma es algo estático, el proteoma es dinámico y cambiante.

La aparición de nuevas herramientas informáticas que permitan la integración genómica-proteómica podrá ayudar a entender mejor los mecanismos implicados en la aparición y desarrollo de una enfermedad.

La proteómica combina electroforesis bidimensional, análisis de imágenes, espectrometría de masas y bioinformática. El análisis es tanto cualitativo como cuantitativo, y además detecta variaciones en la expresión ante distintas situaciones como por ejemplo el tratamiento con algún fármaco, o comparación entre una situación normal frente a una patológica. También permite detectar la existencia de distintas isoformas de una proteína, y analizar las posibles variaciones en su expresión.

Atendiendo a su objetivo final, existen 3 tipos de proteómica: proteómica de expresión, proteómica estructural y proteómica funcional. La proteómica de

expresión analiza la variación en la expresión proteica ante distintos estímulos (estudios cuantitativos de la expresión proteica). Se centra fundamentalmente en la identificación de nuevos biomarcadores y realiza estudios para la validación de nuevos fármacos. La proteómica estructural estudia las interacciones entre proteínas intentando averiguar la estructura de los distintos complejos proteicos, llegando a crear diversos mapas de vías de señalización que ayuden a entender mejor los mecanismos celulares. Por último, la proteómica funcional estudia los mecanismos de compartimentalización y translocación proteicos para intentar averiguar las distintas localizaciones subcelulares de las proteínas y así entender mejor su función y conocer cómo poder actuar frente a ellas (Blackstock y Weir, 1999).

El objetivo final de cualquier estudio proteómico va más allá del simple catalogado de las proteínas expresadas en un tipo celular en una situación normal frente a una patológica. Intenta llegar a comprender mejor los mecanismos metabólicos y vías de señalización y regulación implicadas en la biología celular que puedan ayudar a entender los mecanismos por los que se desarrolla cualquier enfermedad y predecir en cierto modo cómo su función puede variar por la utilización tanto de fármacos como de manipulaciones genéticas. Permite, además, la identificación de proteínas específicas implicadas en una determinada patología, detección de marcadores de eficacia tras el tratamiento con un determinado fármaco, detección de marcadores de toxicidad así como interpretar mejor los mecanismos de regulación implicados en la biología celular. Intenta crear un completo mapa tridimensional celular indicando la localización de cada proteína, los procesos y cambios a los que estas se

pueden ver sometidas bajo determinadas circunstancias (translocaciones, procesos de proteólisis, fosforilaciones, uniones entre distintas proteínas) y que ayuden a comprender mejor los mecanismos moleculares implicados en cualquier proceso fisiológico o patológico (Silberring y Ciborowski, 2010).

Uno de los principales obstáculos a los que se ha enfrentado la investigación proteómica en los últimos tiempos es la dificultad que supone la identificación de todas las proteínas presentes dentro de una muestra biológica compleja. Esta dificultad se ve agravada por el limitado rango dinámico de concentración que las técnicas actuales son capaces de resolver (Archakov y col., 2007). Otros problemas están asociados a la evaluación de la enorme cantidad de información que genera esta tecnología, que complica la selección e interpretación de los datos potencialmente útiles de entre todos los obtenidos (Schrattenholz, 2004).

La electroforesis en doble dimensión (2-DE) o bidimensional permite la separación de las proteínas en dos dimensiones en función de dos de sus características más representativas, el peso molecular (tamaño) y punto isoeléctrico (pH en el cual la carga neta de la proteína es cero). Basándose en estas dos características únicas y exclusivas de cada proteína se puede definir un mapa de expresión proteico en el que cada proteína va a poder ser identificada según una coordenada de peso molecular y punto isoeléctrico (Bjellqvist y col., 1993).

2.2.1.- Preparación de las muestras

El protocolo de preparación de un gel bidimensional consta de varias etapas, que incluyen la preparación de la muestra, la primera dimensión mediante IEF, la

segunda dimensión mediante SDS-PAGE, la visualización de las proteínas y la digitalización y análisis de los mapas bidimensionales.

La preparación de la muestra es un paso esencial para desarrollo de la electroforesis en doble dimensión, que requiere la eliminación de los posibles contaminantes y/o proteasas presentes en la muestra (Rabilloud, 1996). Los contaminantes se pueden eliminar mediante técnicas como la diálisis, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía en fase reversa o precipitación de proteínas (Englard y Seifter, 1990). En el caso de las proteasas, es posible bloquearlas mediante inhibidores específicos, aunque es necesario comprobar previamente que sean compatibles con la electroforesis bidimensional. A continuación, las proteínas han de solubilizarse en un medio que debe contener: un agente caotrópico neutro para solubilizar las proteínas (normalmente urea); un detergente no iónico o “zwitteriónico”, para prevenir agregaciones (NP-40, CHAPS, entre otros); un agente reductor, para romper los puentes disulfuro (β -mercaptoethanol, dithiothreitol o DTT); y finalmente anfolitos, que potencian la solubilidad de las proteínas, minimizando la agregación por interacciones de carga, aunque pueden llegar a interferir con el IEF si su concentración es demasiado elevada (Rabilloud, 1996).

2.2.2.- Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)

Las proteínas son moléculas anfotéricas que pueden estar cargadas positiva o negativamente en función del pH del medio en que se encuentren. El isoelectroenfoque separa las proteínas de acuerdo a sus puntos isoeléctricos (pI). Si se aplica un campo eléctrico a un gradiente de pH, las proteínas que estén dentro migrarán hasta alcanzar el pH equivalente a su pI, donde pierden

toda carga y dejan de moverse. Por tanto, para realizar un IEF se necesita un gradiente de pH y una fuente capaz de generar una diferencia de potencial. Actualmente los gradientes para IEF se venden de forma comercial, en tiras de plástico que llevan adherida la acrilamida con el gradiente de pH. Estos geles se denominan tiras IPG (Isoelectric Phocusing Gradient) y existen en distintos rangos de pH que facilita el estudio puesto que puede ayudar a focalizar y conseguir una mejor resolución de la separación proteica (Bjellqvist y col., 1993). Estos geles tienen la acrilamida deshidratada para mejorar su conservación, por lo que es necesario rehidratar la tira con la solución adecuada antes de comenzar el IEF. La muestra se puede aplicar durante o después de este paso de rehidratación, tras lo cual se desarrolla el IEF, que debe constar de varias etapas, ya que la conductividad eléctrica del gel va cambiando a lo largo del proceso (Görg y col., 2000). Al igual que ocurría con la preparación previa, el tipo de rehidratación, la forma de aplicación, así como las etapas y duración del IEF deben ser determinados empíricamente para cada tipo de muestra biológica.

2.2.3.- Segunda dimensión o SDS-PAGE

Antes de realizar la electroforesis SDS-PAGE según Laemmli, (1970), las tiras IPG deben ser tratadas con un tampón de equilibrio, que contiene varios reactivos necesarios para la separación en la segunda dimensión. El más importante de ellos es el SDS, que es fundamental en el desarrollo de este tipo de electroforesis, ya que desnaturaliza las proteínas y forma con ellas complejos cargados negativamente que migran hacia el polo positivo durante el proceso. La solución de equilibrio contiene también urea y glicerol, para reducir los efectos electroendosmóticos (Görg y col., 2000). El equilibrado se realiza en dos pasos:

un primero en el que se añade DTT al tampón anteriormente descrito y un segundo paso, en el que se añade iodoacetamida. Estos dos pasos previenen la reoxidación de las proteínas y evitan la aparición de los patrones distorsionados por rayas verticales o “streaking” (Görg y col., 1987). A continuación, las proteínas enfocadas y equilibradas en la tira IPG vuelven a ser separadas en base a su masa molecular empleando SDS-PAGE en la segunda dimensión (en dirección perpendicular a la primera). La elección del porcentaje de acrilamida y el tipo de gel (homogéneo o en gradiente) depende del rango de masa molecular que se quiere resolver. Para análisis de mezclas complejas se suelen utilizar geles en gradiente (Issaq y Veenstra, 2008).

Así se puede detectar proteínas que hayan sufrido algún tipo de modificación postraducciona ya que esta modificación suele conferirle a la proteína un cambio tanto de carga como de peso molecular, que va a poder ser reflejado en el mapa proteico puesto que la proteína aparecerá en una localización distinta a la normal (Issaq y Veenstra, 2008).

2.2.4.- Visualización y tinción de geles bidimensionales

Una vez que la segunda dimensión ha finalizado, las manchas proteicas deben ser visualizadas, para lo cual existen varios métodos de tinción, con diferentes características como sensibilidad, linealidad, homogeneidad y reproducibilidad. El método más sensible es la tinción con plata, aunque el rango de detección lineal es más amplio en las técnicas que utilizan compuestos fluorescentes (Patton, 2000). La aplicación de estos métodos es posterior al desarrollo de la 2-DE, excepto en el caso de la electroforesis bidimensional diferencial (Two-dimensional difference gel electrophoresis, 2D-DIGE) (Marouga y col., 2005). Se

trata de una técnica comercializada como “Ettan DIGE proteomics system” (GE Healthcare), que permite un análisis cuantitativo de la expresión diferencial entre muestras biológicas, basándose en las propiedades específicas de tres fluorocromos con propiedades espectrales diferenciales (Cy2, Cy3 y Cy5; “CyDye DIGE Fluor minimal dyes”). Estos compuestos fluorescentes, que han sido diseñados para igualar su masa y carga, se utilizan para marcar covalentemente las proteínas de diferentes muestras en residuos de lisina antes de su separación en un mismo gel bidimensional. Las proteínas marcadas pueden ser detectadas a las longitudes de onda de excitación y emisión apropiadas, empleando un escáner especial para la detección de señales fluorescentes. Las señales detectadas se pueden entonces comparar empleando las aplicaciones informáticas adecuadas. Posteriormente se pueden teñir los geles tras la digitalización de las imágenes fluorescentes, con azul de Coomassie o Sypro Ruby. Esta metodología tiene múltiples ventajas, ya que todas las muestras están sujetas a las mismas manipulaciones experimentales y, al tratarse de un método de fluorescencia (Patton, 2000), proporciona una mayor sensibilidad y una mayor linealidad en el rango dinámico de detección que otras técnicas de tinción. Por ello, los cambios en la expresión de las proteínas pueden ser detectados y cuantificados con mayor nivel de confianza. Para realizar un experimento de electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) se requiere un diseño experimental minucioso, en función del objetivo buscado. Lo más importante de tomar en cuenta al momento de seleccionar la tinción es que sea compatible con la espectrometría de masas (Andersen y Mann, 2000).

2.2.5.- Adquisición de la imagen y análisis de geles bidimensionales

Las imágenes de los geles deben ser digitalizadas y guardadas en archivos de imagen informáticos para poder ser analizadas. La complejidad de los geles bidimensionales requiere el empleo de paquetes informáticos especializados para su análisis (Dowsey y col., 2003; Görg y col., 2004; Palagi y col., 2006), que deben ser capaces de realizar una serie de funciones imprescindibles como la edición y optimización de la imagen del gel, la detección de las manchas proteicas o comúnmente denominadas “spots”, el emparejamiento de los puntos en los diferentes geles objeto de estudio y el análisis estadístico y cuantitativo final.

Hoy en día existen diversas herramientas informáticas que facilitan mucho el análisis. Además permite la comparación visual con mapas proteómicos existentes en bases de datos disponibles en la red, siendo la base de datos SwissProt (<http://www.uniprot.org/>) una de las más conocida y empleada. También existen herramientas informáticas que permiten analizar cuantitativamente las variaciones de expresión de las distintas proteínas presentes en los mapas de expresión (Banks y col., 2000).

Uno de los desarrollos más importantes en la identificación proteica ha sido la aparición y evolución de las técnicas de espectrometría de masas (Andersen y Mann, 2000). Desde la década pasada, su sensibilidad y eficacia ha aumentado de manera que hoy en día se pueden detectar proteínas en geles bidimensionales en el rango femtomolar. Es muy sensible, permite o tolera el análisis de mezclas proteicas y permite también la realización de múltiples

análisis, por lo que poco a poco ha reemplazado a la secuenciación por el método de Edman, convirtiéndose en la técnica de elección.

La espectrometría de masas proporciona información sobre la estructura proteica ya que da información sobre la masa peptídica y la secuencia de aminoácidos. Esta información puede ser utilizada para identificar proteínas mediante búsquedas en las bases de datos que existen hoy en día tanto de nucleótidos como de proteínas. Esto permite determinar el tipo y localización de modificación proteica que haya sufrido la proteína (Banks y col., 2000).

Se somete a la proteína a una digestión enzimática, normalmente con tripsina, que es capaz de romperla en puntos o localizaciones específicas, obteniéndose una serie de fragmentos peptídicos específicos cuya masa permite identificarla mediante la comparación con las bases de datos peptídicas. Los fragmentos peptídicos obtenidos son ionizados tras el tratamiento con un láser que confiere carga y una vez conferida la carga son separados en el espectro según su relación masa/carga y posteriormente son analizados por un detector, que es capaz de medir la intensidad de cada fragmento.

Entre los objetivos futuros de la proteómica, se pueden mencionar: definir componentes críticos de las señales de transducción, contribuyendo al desarrollo de agentes terapéuticos más efectivos; determinar mecanismos patológicos e identificar nuevos marcadores diagnósticos, de evolución y nuevas dianas terapéuticas y predecir la respuesta de los pacientes a fármacos (farmacoproteómica) (Ahn y Wang, 2008).

2.3. Proteómica de Tripanosomas

En la última década, los genomas de *Leishmania major*, *T. cruzi* y *T. brucei* (los TriTryps) fueron completados (Ivens y col., 2005; El-Sayed y col., 2005, Berriman y col., 2005) y compilados (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). El análisis comparativo de estos tres genomas reveló una secuencia altamente conservada y un proteoma también conservado con aproximadamente 6200 genes. Sin embargo, debido a la ausencia de homología con otros organismos ya secuenciados para esa fecha, cerca de la mitad del proteoma previsto no tenía función específica, por lo que las proteínas resultantes se anotaban como “hipotéticas” (<http://www.genedb.org>). En este contexto, varios estudios proteómicos han ofrecido la posibilidad de proveer evidencia experimental para la expresión génica a nivel protéico, asignando potenciales funciones a esas proteínas “hipotéticas”, identificando nuevos marcadores de diagnóstico, determinando potenciales blancos terapéuticos y vacunales; y revelando mecanismos específicos relacionados con la biología de estos tripanosomatídeos (Cuervo y col., 2010).

El estudio proteómico en los tripanosomatídeos es particularmente importante debido a que estos organismos no utilizan el inicio de la transcripción como un paso regulatorio en la expresión de control génico. Todos los genes que codifican para proteínas están organizados en grandes unidades de transcripción policistrónicas que generan precursores de ARN policistrónicos, los cuales entonces son procesados a ARNm monocistrónicos por mecanismos de “*trans-splicing*” y poliadenilación (Michaeli, 2011, Droll y col., 2013).

Paba y col. (2004a) reportaron el primer análisis proteómico de *T. cruzi*, utilizando tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes. Los principales hallazgos de este primer estudio revelaron que el perfil de expresión de proteínas era muy conservado entre las tres formas de desarrollo del parásito. A pesar del reducido número de secuencias disponibles de *T. cruzi* para esa fecha, los autores identificaron, por espectrometría de masas, 19 proteínas en los tripomastigotes. Entre los polipéptidos identificados estaban algunas proteínas de choque térmico (HSP60, HSP70 y HSP90), factores de elongación, enzimas de la vía glicolítica (enolasa, piruvato quinasa y 2,3 bifosfoglicerato mutasa) y proteínas estructurales (KMP-11, tubulina y componentes de la barra paraflagelar). Posteriormente, en otro estudio proteómico de tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*, utilizando el método de etiqueta de afinidad codificada por isótopo (ICAT, por sus siglas en inglés), estos mismos autores (Paba y col., 2004b) identificaron 41 proteínas, de las cuales 29 mostraron expresión conservada entre ambos estadios, nueve estaban más expresadas en tripomastigotes y 3 tenían mayor expresión en amastigotes.

Por su parte, Parodi-Talice y col. (2004) realizaron un análisis proteómico de *T. cruzi*, encontrando 22 proteínas, de las cuales 11 estaban relacionadas con el metabolismo del parásito, tres al citoesqueleto, cuatro a la síntesis de proteínas y/o al ciclo celular y cuatro eran del grupo de las chaperonas.

Sin embargo, uno de los más amplios estudios proteómicos de *T. cruzi* fue realizado por Atwood y col. (2005), en el cual se analizaron tripomastigotes metacíclicos, amastigotes, tripomastigotes y epimastigotes logrando la identificación de 2784 proteínas. De estas proteínas, aproximadamente el 30%

(838) fueron detectadas en los cuatro estadios evolutivos. Además, 30 miembros de la familia de la mucina y trans-sialidasa estaban expresadas solamente en los tripomastigotes. Mientras que los amastigotes y los tripomastigotes metacíclicos expresaron subsets de proteínas trans-sialidasas únicas para cada estadio, la expresión de estas moléculas no se detectó en epimastigotes.

En tripanosomatídeos, la primera parte de la vía glicolítica está compartamentalizada dentro de unos organelos muy especializados llamados glicosomas (Michels y col., 2006). En su fase sanguínea, los tripanosomas son completamente dependientes del aporte de glucosa presente en la sangre de su hospedador mamífero. Todo el ATP sintetizado proviene de la conversión de glucosa en piruvato, el cual es el producto final de la glicólisis en el tripanosoma en su fase sanguínea. Las siete enzimas que participan en la conversión de glucosa en 3-fosfoglicerato están presentes dentro del glicosoma, mientras que las que catalizan la última parte de la vía glicolítica están localizadas en el glicosol (Opperdoes y Borst, 1977; Michels y col., 2006). Recientemente se ha reportado que la localización de las enzimas glicolíticas en *T. evansi* tienen la misma localización que en *T. brucei brucei* (Moreno y Nava, 2015).

Además de la glicólisis, los glicosomas aparentemente están involucrados en la derivación de la hexosa monofosfato, en la vía de salvamento de las purinas, biosíntesis de pirimidinas, oxidación de ácidos grasos y biosíntesis lipídica (Michels y col., 2006; Vertommen y col., 2008). De hecho, muchas de las enzimas de estas vías metabólicas han sido encontradas dentro de los glicosomas, pero hasta ahora toda esta información está altamente fragmentada.

En *T. evansi*, las enzimas glicolíticas localizadas exclusivamente dentro de los glicosomas son: enolasa, malato deshidrogenasa, piruvato quinasa, glutamato oxalacetato transaminasa y fosfoglicerato mutasa. Por otra parte, las que son solamente citosólicas son: hexoquinasa, glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fructosa bifosfato aldolasa, fosfofructoquinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa y triosa fosfato isomerasa. Además, la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GADPH) tienen ambas localizaciones, es decir, se encuentran tanto en los glicosomas como en el citosol (Moreno y Nava, 2015).

Investigaciones en las tres últimas décadas han demostrado que la localización específica de estos procesos metabólicos esenciales dentro de organelos en tripanosomatídeos y la gran distancia evolutiva entre estos parásitos y sus hospedadores mamíferos, ha resultado en la adquisición de características estructurales y funcionales únicas de las proteínas glicosomales, por lo que cada día estas enzimas reciben mayor atención como blancos terapéuticos (Barros-Álvarez y col., 2014; Moreno y Nava, 2015).

Otro grupo de proteínas muy comúnmente encontrado en análisis proteómicos de tripanosomatídeos son las proteínas del citoesqueleto y asociadas al flagelo del parásito. El flagelo de los tripanosomatídeos es esencial no solo para la motilidad del parásito sino también para la morfogénesis celular, división celular (reproducción) y evasión inmune (Ralston y Hill, 2008; Ralston y col., 2009; Langousis y Hill, 2014). Este organelo emerge del cuerpo basal cerca del extremo posterior de la célula. Una vez que sale del citoplasma, es rodeado por su propia membrana y se fija en casi toda su longitud al parásito trazando una

trayectoria levógira helicoidal en sentido antero-posterior. El extremo distal del flagelo emerge más allá del cuerpo celular. Una parte muy especializada de la membrana, llamada “bolsillo flagelar” forma una invaginación de la superficie celular donde el extremo proximal del flagelo emerge del citoplasma (Ralston y Hill, 2008; Ralston y col., 2009). La membrana celular, el bolsillo flagelar y la membrana flagelar son tres dominios de membrana estructuralmente adyacentes, pero funcionalmente diferentes (Langousis y Hill, 2014).

El cuerpo del flagelo está formado por el axonema, el cual consta de un sistema de microtúbulos llamado “9+2”, lo cual significa que hay nueve dobletes de microtúbulos que rodean un doblete central. Además, una de las estructuras más peculiares del flagelo de los tripanosomas es la presencia de un gran filamento paracrystalino, llamada barra paraflagelar (PFR, por sus siglas en inglés), la cual se extiende a todo lo largo del axonema desde el bolsillo flagelar hasta la punta del flagelo (Landfear e Ignatushchenko, 2001; Portman y Gull., 2010; Koyfman y col., 2011; Hughes y col., 2012).

Algunas proteínas flagelares, así como características particulares de este organelo han sido revelados en varias investigaciones a través de una combinación de ARNi y estudios proteómicos. Broadhead y col. (2006) aislaron el axonema y barra paraflagelar de *T. brucei*, encontrando 331 proteínas en el proteoma del flagelo incluyendo los esperados componentes estructurales, tales como las tubulinas, dineínas y proteínas de la barra paraflagelar. De las 331 proteínas, 208 fueron identificadas como específicas de tripanosomatídeos y probablemente tienen estructura y funciones específicas para estos organismos, indicando que la motilidad del flagelo es necesaria para la viabilidad del parásito.

En *T. cruzi*, algunas de estas proteínas han sido estudiadas como posibles candidatos a vacunas por estar asociadas a inmunoprotección. La inmunización con proteínas de la barra paraflagelar ha demostrado ser altamente efectiva en reducir la parasitemia activa y otorgando hasta 100 % de protección contra desafíos considerados letales de una cepa muy virulenta de *T. cruzi* (Wrightsmann y col., 1995; Wrightsmann y Manning, 2000). Por otra parte, utilizando proteínas recombinantes de las tres proteínas de la barra paraflagelar (PFR1, PFR2 y PFR3), Luhrs y col. (2003) igualmente lograron una reducción de la parasitemia y un 100% de supervivencia a la infección por *T. cruzi*, indicando que las proteínas de la barra paraflagelar son antígenos protectivos. Sin embargo, es importante aclarar que de las tres proteínas, la PFR3 no produjo los mismos niveles de protección que PFR1 y PFR2. Estos autores también demostraron que el gen que produce la PFR2, llamado *par2*, es altamente conservado entre diversos aislados de *T. cruzi*, incluso entre los kinetoplástidos, sugiriendo que podría ser un efectivo antígeno contra estos parásitos (Saravia y col., 2004; Clark y col., 2005; Abdille y col., 2008a, 2008b). De hecho, se ha demostrado que la secuencia de nucleótidos de la PFR2 de *T. evansi* es 100 % idéntica a la de *T. brucei* y, 83,4 %; 76,6 % y 77,9 % similar a las de *T. cruzi*, *L. mexicana* y *L. infantum*, indicando la alta conservación del gen de la PFR2 entre varias especies de kinetoplástidos (Abdille y col., 2008b).

Por otra parte, las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) están entre las más altamente conservadas en el árbol evolutivo de los kinetoplástidos y son producidas por estos organismos en respuesta a elevadas temperaturas (Folgueira y Requena, 2007). Estas proteínas juegan un papel

importante en el plegamiento, ensamblaje, localización intracelular, secreción regulación y degradación de otras proteínas (Young y col., 2004).

En general, las HSP como chaperonas moleculares, interactúan con proteínas que han sido plegadas incorrectamente y, al hacerlo, minimizan la probabilidad de interacciones inapropiadas con otras proteínas. De acuerdo con ello, el mismo estrés que induce la producción de las HSP (altas temperaturas) induce la producción de proteínas que tienen conformaciones no nativas, lo cual, de hecho, induce la expresión de genes de choque térmico (Feder y Hofmann, 1999). Por lo tanto, la respuesta de choque térmico se puede ver como un mecanismo homeostático general que protege a las células de los efectos deletéreos del estrés ambiental.

En este aspecto, son de particular interés los patógenos transmitidos por vectores, como es el caso de los tripanosomatídeos, los cuales sufren cambios importantes de temperaturas al pasar de su vector hacia el hospedador invertebrado. Este cambio de temperatura es acompañado por una fuerte producción de HSP (Maresca y Carratu, 1992). Por ejemplo, análisis proteómicos detallados de *L. donovani* y *T. cruzi* han mostrado un incremento en la síntesis de HSP60, HSP70, HSP70 mitocondrial y HSP90 durante la diferenciación en sus estadios evolutivos (Bente y col., 2003; Paba y col., 2004a; 2004b). Sin embargo, no está claro si la expresión de las HSP es parte del proceso de diferenciación en sí, o es un fenómeno involucrado en la adaptación a la nueva temperatura y condiciones ambientales.

La primera caracterización del gen que codifica para la HSP60 (una de las principales proteínas chaperonas) en kinetoplastidos fue realizada en *T. cruzi*

(Giambiagi-de Marval y col., 1993). La HSP 60 de *T. cruzi*, codificada por una familia multigen, fue encontrada en la matriz mitocondrial (Sullivan y col., 1994). Posteriormente, fue caracterizado un ADNc que codifica para la HSP60 en *T. brucei*, encontrándose que esta proteína era de dos a cuatro veces más abundante en las formas procíclicas (en el insecto), las cuales tienen una mitocondria completamente activa, que en los tripomastigotes sanguíneos (en el mamífero), lo cual sugiere que el nivel de expresión de la HSP60 está adaptado a la función mitocondrial del parásito (Bringaud y col., 1995). Adicionalmente, el gen de la HSP60 también fue clonado en *L. major*, demostrándose que esta proteína se comporta como un antígeno en pacientes con leishmaniasis (Rey-Ladino y col., 1997).

De igual forma, dentro de este grupo se encuentra la HSP70, la cual es una familia de proteínas que son componentes centrales de muchos procesos celulares fundamentales, incluyendo el plegamiento y ensamblaje de proteínas recién sintetizadas, el replegamiento de proteínas mal plegadas y agregadas, translocación de membrana de las proteínas organelares y secretoras, degradación proteolítica de proteínas inestables y el control de la actividad de muchas proteínas reguladoras (Mayer y Bukau, 2005). Según Folgueira y Requena (2007), esta proteína se encuentra en la mitocondria y el retículo endoplásmico, llamándose a esta última forma (la presente en retículo endoplásmico), como Proteína 78 regulada por glucosa (GRP78) o proteína de unión luminal 1 (BiP). En kinetoplastidos, esta proteína ha sido caracterizada en *T. brucei* (Bangs y col., 1993), *T. cruzi* (Tibbets y col., 1994) y en *L. donovani* (Jensen y col., 2001).

Recientemente, han cobrado importancia los estudios proteómicos comparando dos o más tipos de proteomas que permiten hacer un mayor análisis de las diferencias entre estos parásitos. Al respecto, Holzmuller y col. (2008) hicieron un análisis proteómico de dos cepas de *T. b. gambiense*, aislados en el mismo foco de infección en Costa de Marfil, los cuales exhibían diferencias en su virulencia y en su patogenicidad. Estos autores encontraron que aunque ambos tripanosomas fueron aislados del mismo foco y no mostraban diferencias en estudios moleculares, sí manifestaban una expresión diferencial en sus factores de secreción-excreción (secretoma). Las interacciones de estos secretomas expresados diferencialmente con las células del sistema inmune del hospedador podrían estar relacionadas con baja virulencia/alta patogenicidad o alta virulencia/baja patogenicidad. Este experimento abrió las puertas a una nueva visión de la virulencia/patogenicidad desde el punto de vista del parásito y la resistencia/susceptibilidad desde el punto de vista del hospedador. Las observaciones encontradas en la investigación sugieren fuertemente que la expresión del genoma, más que su plasticidad, podría determinar tanto la virulencia como la patogenicidad de los tripanosomas, y esa expresión del genoma está, al menos en parte, involucrada en cómo los tripanosomas manejan a sus hospedadores, lo cual podría representar una información clave acerca de la potencia del proceso infeccioso.

Siguiendo esta misma línea de investigación, Grébaut y col. (2009) estudiaron el secretoma de dos aislados de *T. congolense* (IL1180 e IL3000) que manifestaban distintos patrones de virulencia y patogenicidad. Se pudieron identificar 37 proteínas que se expresaban con mucha diferencia entre ambos

aislados, de las cuales ocho eran putativas y no caracterizadas, 13 eran putativas en la base de datos TrEMBL y 24 pudieron ser caracterizadas en la base de datos Swiss-Prot. Las proteínas correlacionadas con baja virulencia y patogenicidad (aislado IL1180) fueron: 2,3 bifosfoglicerato mutasa; subunidad theta de la proteína del Complejo T 1 glicosomal; factor de iniciación de traslación de eucariotas 3, proteína quinasa C activada, enolasa, adenosilhomocisteinasa, aminopeptidasa y el precursor de la glicoproteína variable de superficie (VSG). Por otro lado, las proteínas asociadas con alta virulencia y patogenicidad (aislado IL3000) fueron: calreticulina, beta tubulina, alfa tubulina, ATP sintetasa vacuolar subunidad B, cisteín proteasa, factor de elongación 2, enolasa, y arginina quinasa.

Por su parte, Parra (2011) realizó un estudio proteómico del secretoma y del proteoma de tres aislados venezolanos de *T. evansi* (Teva1, TeGub-323 y El Frío) con diferencias en su patrón de virulencia, por medio de la técnica de 2D-DIGE acoplado a espectrometría de masas. En el secretoma se pudieron observar 21 “spots” con expresión diferencial entre los aislados, con una identificación total de 25 proteínas, de las cuales la HSP70, PFR1, gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa, UNC119 y la calreticulina tuvieron una mayor expresión en el aislado más virulento (Teva1) por lo que se propone que estas proteínas pudieran estar asociadas a la virulencia del parásito. Así mismo, en el proteoma se seleccionaron 14 “spots” con expresión diferencial, identificándose un total de 12 proteínas. De estas, las más resaltantes fueron: proteína asociada a la resistencia a diminaceno, subunidad del complejo T1, gliceraldehido fosfato deshidrogenasa, y el factor de elongación alfa (EF-1 α), las cuales fueron

mayormente expresadas en el aislado menos virulento (TeGub-323). Por otra parte, en un análisis proteómico de *T. evansi* infectando roedores, Roy y col. (2010) reportaron la identificación de 166 proteínas, siendo las más abundantes las enzimas de la vía glicolítica, seguidas por proteínas del citoesqueleto, asociadas a virulencia, chaperonas, proteasas, quinasas y fosfatasas, entre otras.

En lo referente a *T. vivax*, los estudios genéticos han tardado más tiempo que en otros tripanosomas debido al hecho de la dificultad de replicar esta especie en roedores y la poca cantidad de parásitos obtenidos durante la purificación (Desquesnes y Tresse, 1996; González y col., 2005). A pesar de ello, el empleo de nuevas herramientas en genómica, transcriptómica y proteómica, que permiten trabajar con mínimas cantidades de parásitos, han brindado gran cantidad de información y han permitido en estos últimos años realizar nuevos estudios sobre *T. vivax* de gran relevancia, tales como su diversidad genética, la evolución de su VSG y otros antígenos superficiales, así como la comparación con otros tripanosomatídeos a nivel genético y su transcriptoma completo (Auty y col., 2012; Duffy y col., 2009; Hamilton, 2012; Jackson y col., 2012; 2013; Greif y col., 2013).

Avances significativos en estudios sobre *T. vivax* han sido realizados en los últimos años, incluyendo la publicación de secuencias genómicas, así como secuencias parciales de ARN para la cepa Y486, la cual está adaptada a roedores (Jackson y col., 2012) y el análisis transcriptómico del aislado TvLIEM176 (Greif y col., 2013). Ambos aislados de *T. vivax* provienen de bovinos; el aislado Y486 fue obtenido de ganado cebú en Nigeria en el año 1976

(Leeflang y col., 1976; Gibson, 2012); mientras que TvLIEM176 proviene del estado Trujillo, Venezuela (Gómez-Piñeres y col., 2014).

Además, algunos estudios genómicos evolutivos se han llevado a cabo en *T. vivax* y otras especies representativas de los tripanosomas africanos, comparando sus repertorios de genes silenciosos VSG y la forma en que están organizados con el objetivo de comprender la evolución de estas proteínas y cómo dan lugar a nuevas funciones (Jackson y col., 2012; 2013). En estas investigaciones se ha encontrado que las especies de tripanosomas difieren en la organización de su archivo silencioso VSG, algo que puede resultar en diferentes mecanismos para la generación de la diversidad antigénica. Además, estos autores sugieren que mientras en *T. brucei* y *T. congolense* hay una alta tasa de recombinación entre copias silenciosas VSG, este fenómeno es mucho menos pronunciado en *T. vivax*.

Además de lo anterior, Jackson y col. (2012) reportan que la base genómica para la variación antigénica ha divergido entre los tripanosomas en una manera consistente con distintos mecanismos para la generación de variabilidad antigénica. *T. vivax* tiene el repertorio estructuralmente más diverso, que consta de una a-VSG, b-VSG. Por su parte, *T. congolense* combina múltiples linajes ancestrales de b-VSG, cada uno con un CTD (Dominio C-Terminal) distinto y *T. brucei* con una a-VSG y b-VSG que se derivan de linajes distintos pero con un CTD común. De esta manera, como resultado de diferencias en la composición, la escala de recombinación que ocurre en el vector varía entre las especies, siendo más frecuente entre las VSG de *T. brucei* y *T. congolense* que en *T. vivax*, y más prevalente entre la VSG de *T. brucei* que en *T. congolense*.

Otro aporte importante de los trabajos de Jackson y col. (2012, 2013) es la revelación de la ausencia en *T. vivax* de todo el linaje del receptor de transferrina, sugiriendo que esta familia de proteínas apareció mas tarde, después de la separación de *T. vivax* de *T. congolense* y *T. brucei*. El panorama resultante es el de una arquitectura compleja de la superficie que también podría explicar las diferencias biológicas observadas y mecanismos específicos de evasión inmune que caracterizan a *T. vivax* y lo distinguen de otros tripanosomas africanos.

Este análisis, no obstante, apenas aborda el tema de la expresión de este grupo fundamental de proteínas. De hecho, no existen previos estudios genómicos amplios sobre la expresión de genes en *T. vivax*. Sin embargo, para abordar esta y otras preguntas importantes, Greif y col. (2013) llevaron a cabo un análisis transcriptómico de formas sanguíneas de *T. vivax*, utilizando para ello el aislado venezolano TvLIEM176. Estos investigadores consiguieron alrededor de 6500 proteínas y secuencias codificadas por el ARN, incluyendo más de 100 especie-específicos, además de 50 genes que no habían sido previamente reportados en el GenBank, lo que indica que muy probablemente estos genes podrían ser exclusivos del aislado TvLIEM176. El único gen de VSG que fue encontrado en el ARNm de este aislado, sorpresivamente fue muy similar (90,4 % de similitud) con el único gen de VSG reportado hasta la fecha para *T. vivax*, el cual proviene de un aislado africano de esta especie (Gardiner y col., 1996).

El transcriptoma de *T. vivax* reportado por Greif y col. (2013), disponible en: <http://www.bioinformatica.fcien.edu.uy/Tvivax/>, muestra que otras proteínas de la superficie celular, aparte de las VSG, parecen jugar un papel estratégico en la evasión inmune. La VSG representa el 55 % de las proteínas dispuestas en la

superficie celular de *T. vivax*, una cantidad considerablemente menor que el 98 % observado para las VSG de *T. brucei*. Los autores proponen que otras proteínas de superficie, tales como la peptidasa GP63 pudieran ser relevantes.

Otro hallazgo importante del trabajo de Greif y col. (2013), es que contrariamente a lo aceptado acerca de que todos los tripanosomatídeos regulan su expresión génica a nivel post transcripcional, el análisis transcriptómico del aislado TvLIEM176 reveló que algunos genes y regiones del genoma no son transcritos. Esto sugiere fuertemente que la regulación del inicio de la transcripción puede también jugar un papel importante en la regulación génica de *T. vivax* y probablemente pudiera también ocurrir en otros tripanosomatídeos.

Como seguimiento de sus investigaciones, Greif y col. (2015) hicieron un estudio del genoma completo del ADN del kinetoplasto (kADN) de dos aislados americanos (TvLIEM176 y TvMT1) y un aislado africano (Y486) de *T. vivax*. Este análisis posee gran importancia debido a que en el continente americano, *T. vivax* se transmite solamente por vía mecánica, al igual que *T. evansi*, lo que hace que solamente existan formas sanguíneas, a diferencia del continente africano donde se transmite de manera cíclica mediante su vector, la mosca tsé-tsé (Osório y col., 2008). En este estudio se encontró, tal como se esperaba que los aislados del continente americano son más similares entre sí que con el aislado africano. En efecto, ambos aislados americanos mostraron muchas diferencias en los nucleótidos y varias deleciones cuando se compararon con el aislado proveniente de África. La mayoría (aunque no todos) de estos cambios son compartidos entre las cepas americanas lo cual indica que ellos ocurrieron en América antes de la separación de ambos aislados.

Por otra parte, la comparación de los genes en los maxicírculos mostró que en los aislados americanos dos genes exhiben grandes deleciones (ND7 y COIII) y tres genes (ND1, ND2 y ND4) presentan mutaciones de marco de lectura causando inclusión-delección, lo que implica una completa pérdida de la función. El análisis de expresión y edición demostró que todos los genes son transcritos, pero solo tres (ATPasa A6, RPS12, MURF2) son correctamente editados. El hecho de que algunos genes sean editados y otros no es un claro indicio de que mientras la maquinaria enzimática de edición es completamente funcional, la guía necesaria para la edición de genes tardíos está ausente (Greif y col., 2015). Esto permite concluir que el genoma mitocondrial de los aislados americanos de *T. vivax* está sufriendo un drástico proceso de degradación de su capacidad de codificación, por lo que se puede afirmar que estos aislados están en pleno proceso evolutivo.

Por su parte, Tavares (2013) realizó un estudio proteómico del inmunoma del aislado venezolano TvLIEM176 de *T. vivax*. Al realizar el Western blot por doble dimensión, se encontraron 18 spots de interés con masas moleculares aproximadas de 50, 55, 60, 70 y 83 kDa. Estos spots fueron evaluados por nano LC-MS/MS, lográndose la identificación de 12 proteínas. De las doce proteínas inmunodominantes, cinco fueron catalogadas como candidatas para diagnóstico especie-específico de *T. vivax*, al no ser reconocidas por sueros de animales positivos a *T. evansi*: PFR1, PFR2, HSP60, HSP70 y HSP83. El resto de las proteínas identificadas fueron: alfa tubulina, beta tubulina, piruvato deshidrogenasa, ATP sintetasa subunidad Beta, piruvato quinasa, enolasa y ATPasa subunidad A.

Curiosamente, entre las proteínas inmunogénicas de este estudio, no se evidenció la VSG, la cual pareciera no ser antigénica en *T. vivax*, coincidiendo con lo reportado por Greif y col. (2013) y Ramírez-Barrios y col. (2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Obtención y expansión de los aislados de *T. vivax*

3.1.1.- Aislados de *T. vivax*

Los aislados de *T. vivax* que se utilizaron en la presente investigación, fueron donados por el Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos de la Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (IDECYT – UNESR), los cuales fueron aislados de bovinos naturalmente infectados en los estados Trujillo y Monagas, respectivamente, tal como se muestra en la Tabla 1. Estos aislados fueron caracterizados molecularmente por Gómez (2010); quien también evaluó parcialmente sus efectos hematológicos en ovinos infectados experimentalmente.

Tabla 1. Identificación de los aislados de *T. vivax* utilizados en la presente investigación

Aislado	Lugar de Origen	Hospedador de Origen
TvLIEM176*	Estado Trujillo	Bovino
TvMT1	Estado Monagas	Bovino

*Criopreservado donado originalmente por las Doctoras Glenda Moreno y Laura Morón, de la Universidad de los Andes, Núcleo Trujillo, Venezuela.

3.1.2.- Expansión de los aislados de *T. vivax*

A fin de expandir cada aislado y de obtener los parásitos para inocular los animales experimentales y luego extraer los proteomas respectivos, se utilizaron

cuatro ovinos, mestizos, de aproximadamente dos años de edad y con un peso aproximado de 30 kg cada uno, los cuales fueron identificados con los números del 1 al 4. Estos ovinos fueron seleccionados de un rebaño el cual fue evaluado por técnicas serológicas (ELISA) y moleculares (Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR), demostrándose que eran negativos para infección por *T. vivax*. Además, fueron desparasitados con ivermectina (0,2 mg/kg), realizándose posteriormente exámenes coprológicos para comprobar que no tenían parásitos gastrointestinales. Estos animales fueron sometidos a inmunosupresión mediante la administración intravenosa de dexametasona a dosis de 2 mg/kg de manera interdiaria por 5 aplicaciones.

Una vez completado el protocolo de inmunosupresión, los animales fueron inoculados vía intravenosa con el contenido de dos viales de criopreservado de *T. vivax* de la siguiente manera: Animales 1 y 2: Aislado TvLIEM176; animales 3 y 4: Aislado TvMT1. Cada vial de criopreservado (conteniendo aproximadamente $1,5 \times 10^6$ parásitos), fue descongelado a 37°C por 15 min, verificándose la movilidad de los parásitos a través de la visualización de una gota del mismo al microscopio de luz.

A partir del momento en que se realizó la infección experimental, se comenzó a realizar una evaluación diaria de todos los animales, haciendo un seguimiento de sus signos vitales (temperatura corporal, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y color de membranas mucosas) y valores de hematocrito. También se realizó la determinación diaria de parasitemia, según el método del hemocitómetro (Valera y col., 2005), hasta que ésta alcanzara valores iguales o

superiores a 2×10^7 flagelados/ml. Una vez se alcanzó la parasitemia deseada, se extrajo la sangre necesaria para inocular al resto de los animales en experimentación (Ver más abajo) y para la purificación del parásito (90 ml), luego de lo cual cada animal fue tratado con Cloruro de Isometamidium (0,5 mg/kg, vía intramuscular). Los protocolos aquí usados fueron aprobados por el Comité de Ética para la Utilización de Animales de Laboratorio bajo el número 013-11 de acuerdo al Código de Ética para Experimentación Animal. De igual manera, todas las inoculaciones se realizaron siguiendo las normativas del Código de Bioética y Bioseguridad, establecidas por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología de la República Bolivariana de Venezuela (MCT-FONACIT, 2008).

3.2.- Determinación de los patrones de virulencia y patogenicidad de cada aislado de *T. vivax*

A fin de determinar los patrones de virulencia y patogenicidad de los dos aislados de *T. vivax* se realizaron infecciones experimentales en ovinos, lo cual consistió en dos fases:

Periodo preinfección: Su duración fue de una semana, previo a las inoculaciones experimentales. Durante este periodo, los animales fueron evaluados clínicamente y hematológicamente dos veces, además de ser desparasitados con ivermectina a una dosis terapéutica de 0,2 mg/kg por vía subcutánea, verificándose el buen estado de salud de los animales antes de entrar en la siguiente fase del estudio.

Periodo de infección: Su duración fue de 60 días y durante esta fase del estudio, los animales experimentales fueron inoculados con 10^6 tripanosomas/animal por vía intravenosa.

3.2.1.- Animales experimentales

Para esta fase del estudio, se utilizaron nueve (9) ovinos mestizos de aproximadamente dieciocho (18) meses de edad, provenientes del mismo rebaño de donde se obtuvieron los animales utilizados para la expansión del aislado (Sección 1.2). Estos animales, al igual que los anteriores, estaban negativos a infección por *T. vivax* tanto por métodos serológicos (ELISA) como por métodos moleculares (PCR). El establecimiento de los grupos experimentales se realizó de la siguiente manera:

- **Grupo 1:** Animales infectados con el aislado TvLIEM176 (obtenido del estado Trujillo, Venezuela): 3 animales.
- **Grupo 2:** Animales infectados con el aislado TvMT1 (obtenido del estado Monagas, Venezuela): 3 animales.
- **Grupo 3:** Animales no infectados (Grupo Control): 3 animales.

Cada grupo de animales fue mantenido en corrales separados, cubiertos por malla antimosquito, en la Policlínica Veterinaria de la Universidad del Zulia, Venezuela. La alimentación consistió en alimento concentrado en raciones de 1,5 kg/animal/día, heno y agua *ad libitum*.

3.2.2.- Evaluación clínica

Luego de la inoculación, tanto el grupo control como los grupos infectados fueron evaluados cada tres días hasta completar 60 días de experimentación. La evaluación clínica fue realizada a tempranas horas de la mañana, tomándose todos los datos clínicos del animal: temperatura, color de las membranas mucosas, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, estado de hidratación, actitud del animal y cualquier otro signo clínico adicional, llenándose para tal fin una historia clínica.

3.2.3.- Evaluación hematológica

En el momento del examen clínico, se tomaron dos muestras de sangre por cada animal: una en tubo con anticoagulante (EDTA), la cual sirvió para realizar los siguientes exámenes: determinación del volumen del paquete celular (hematocrito), visualización de parásitos a través de la técnica del microhematocrito (Woo, 1969), determinación de la parasitemia por el método del hemocitómetro (Valera, 2005), proteínas totales y además se realizó una hematología a cada animal, la cual incluyó, además de lo anterior: determinación de hemoglobina, conteo de glóbulos blancos y conteo diferencial de leucocitos. Los resultados de los exámenes de laboratorio fueron registrados de manera individual para cada animal junto con la historia clínica. Para el conteo diferencial de leucocitos se calculó el conteo absoluto de los diferentes tipos de glóbulos blancos, multiplicando el porcentaje de cada tipo celular por el número absoluto de glóbulos blancos para el animal.

La determinación de la parasitemia se hizo de acuerdo a la técnica descrita por Valera (2005), para lo cual se utilizó la cámara de Neubaüer. Para esto, fue preparada una solución diluyente conformada por 10 ml de oxalato de amonio (1%) y 2 gotas de azul de metileno (1%), con la cual se realizó una dilución de 1:10 con la muestra de sangre en la solución diluyente. La cámara de Neubaüer fue llenada con esta dilución y se esperó 10 minutos para comenzar el conteo de tripanosomas en los cuatro cuadrantes de las esquinas, utilizando un microscopio de luz con el objetivo de 40X. El número de tripanosomas contado en la cámara se multiplicó por 25000 (factor de dilución x volumen de la cámara / 4) y la parasitemia se expresó en tripanosomas/ml.

3.2.4.- Evaluación serológica

La segunda muestra de sangre fue tomada en tubo sin anticoagulante con la finalidad de obtener el suero para realizar la determinación de anticuerpos mediante la técnica de ELISA, siguiendo la metodología descrita por Reyna-Bello y col., (1998, 2007), la cual se describe brevemente a continuación:

Se utilizó un antígeno purificado proveniente de un aislado de *T. evansi*, el cual fue donado por el Dr. Armando Reyna de la Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez, Venezuela (UNESR). La concentración de proteínas del purificado se determinó según el método descrito por Bradford (1976).

En la placa de ELISA (fondo en U, Polysorp®), se vertió 100 µl por pozo del extracto soluble de *T. evansi* conteniendo 20 µg/ml de proteínas diluidas en una solución tampón 0,05 M carbonato-bicarbonato, pH 9,6. La placa fue incubada a 4 °C por 12 h. Seguidamente, los pozos fueron lavados cinco veces con un

lavador de placas automático (Columbus-Plus Basic, marca TECAN) empleando una solución de lavado, compuesta por tampón fosfato salino o PBS 20 mM (fosfato de sodio 40 mM, NaCl 150 mM) y Tween-20 al 0,1 %. Posteriormente, las placas fueron bloqueadas mediante la incubación por 1h a 37 °C con solución de bloqueo al 5% de leche descremada diluida en PBS 20 mM (fosfato de sodio 40 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2). Las placas se lavaron de nuevo, cinco veces con solución de lavado y se añadieron los sueros diluidos 1:100 con solución PBS-Tween 1%, dejándose incubar por 1h a 37 °C. Como controles negativos y positivos fueron utilizados sueros de ovinos previamente evaluados mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Transcurrido este tiempo, se lavó nuevamente la placa en las mismas condiciones y se colocó el conjugado anti-IgG ovino con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch®) diluido 1:10000 y se incubó durante una hora a 37 °C. Finalmente, la placa fue nuevamente lavada y se vertió en cada pocillo, 100 µl de ABTS (Sustrato constituido por 0,1% de Acido 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzotiazolin-6-sulfónico, 0,05 M tampón citrato pH 4 y 0,5% peróxido de hidrógeno) agitándose durante 45 minutos en oscuridad y se leyó su absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA (BioRad®).

Para la interpretación de los resultados se definió el punto de corte, que es el punto a partir del cual se considera que un animal es positivo. Esto se realizó según lo establecido por Reyna-Bello y col. (1998), tomando los valores de la densidad óptica de los controles negativos, se calculó su promedio y su desviación estándar. Luego se sumó el promedio de los negativos más 3 veces la desviación estándar (Prom Negativos + 3 * DS) y este se consideró el punto de corte establecido para la técnica. Las muestras de sueros con resultados

mayores al punto de corte se clasificaron como positivas a la presencia de anticuerpos anti-*Trypanosoma* y resultados menores se consideraron como negativas.

3.2.5.- Estudio histopatológico

Una vez concluidos los sesenta (60) días correspondientes al período experimental, los animales fueron sacrificados siguiendo las normativas del Código de Bioética y Bioseguridad (MCT-FONACIT, 2008). Se realizó necropsia de cada uno de los animales y se tomaron muestras de los siguientes órganos: Hígado, bazo, ganglios linfáticos, riñones, médula ósea, corazón, pulmones, cerebro y testículos. Estas muestras fueron enviadas al Laboratorio de Anatomía Patológica de la Policlínica Veterinaria de la Universidad del Zulia para su correspondiente estudio histopatológico.

3.2.6.- Análisis estadístico para los parámetros clínicos, hematológicos y serológicos

El programa Sistema de Análisis Estadístico (versión 9.2., SAS Inc., Cary, NC, USA, S.A.S. 2008) fue usado para el análisis estadístico (S.A.S., 2008). Inicialmente los datos fueron probados para la distribución normal usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($n > 90$; proc univariate normal plot). Los datos fueron presentados en medias mínimas cuadráticas \pm error estándar (S.A.S., 2010).

Para lograr la distribución normal de la variable “parasitemia”, antes de los análisis estadísticos paramétricos fue aplicada la transformación logarítmica. Los

datos fueron analizados usando ANOVA de medias repetidas en el tiempo con efectos fijos del procedimiento del modelo mixto (proc mix and method reml). Las variables fueron definidas como principal efecto del tratamiento (control = 0, TvMT1 = 1 y TvLIEM176 = 2), tiempo (día -3 a 60) y la interacción (tratamiento x tiempo). Se analizó la frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, temperatura, (log)parasitemia, hematocrito, hemoglobina, glóbulos blancos, proteínas totales y títulos serológicos de tripanosomiasis (Littell y col., 1998; 2000).

El criterio Bayesian-Schwarz y el criterio de información Akaike fueron usados para determinar la óptima estructura del modelo de covarianza matricial (frecuencia cardiaca, temperatura = autoregresiva tipo 1; hematocrito, glóbulos blancos = autoregresiva tipo 1 con efectos aleatorios; frecuencia respiratoria, (log)aparasitemia, hemoglobina = poder del espacio; proteínas totales = poder del espacio con efectos aleatorios; títulos serológicos anti-*T. vivax* = compuesto simétrico) (Littell y col., 1998; 2000; 2006).

La diferencia estadística entre las variables fue utilizada los contrastes ortogonales. Para todos los procedimientos, la significancia estadística fue preestablecida a $P < 0,05$.

3.3.- Análisis proteómico de los aislados de *T. vivax*

Para realizar el análisis proteómico, se utilizaron los cuatro (4) animales en los cuales se realizó la expansión de los aislados de *T. vivax* (Sección 3.1.2.-). El aislado TvLIEM176 replicó satisfactoriamente en ambos animales, produciendo adecuados niveles de parasitemia para realizar la purificación de cada uno de estos ovejos, los cuales se denominaron purificado LIEM 1 y LIEM 2. Sin

embargo, en el caso de los animales inoculados con el aislado TvMT1, solamente en uno se produjo un nivel de parasitemia suficiente para realizar purificación del parásito y se denominó purificado Monagas; mientras que en el otro animal la parasitemia alcanzada no fue suficiente. De esta manera, el análisis proteómico se realizó a partir los purificados llamados Liem 1, Liem 2 y Monagas, provenientes de los ovinos utilizados para la expansión de los aislados.

3.3.1.- Purificación de los tripanosomas y obtención del proteoma

Una vez alcanzada la parasitemia deseada (2×10^7 tripanosomas/ml o más), se procedió a extraer aproximadamente 90 ml de sangre de la vena yugular de cada animal utilizando EDTA al 15% como anticoagulante, previa limpieza y desinfección de la zona. Los protozoarios fueron purificados de acuerdo a la técnica descrita por González y col. (2005) de la siguiente manera:

La sangre fue mezclada en cantidades iguales con percoll (Sigma®), conteniendo sucrosa (8,55 %), glucosa (2,0 %) y ajustando el pH a 7,4 con Hepes, como lo describieron Grab y Bwayo (1982). Esta mezcla de sangre con percoll fue centrifugada a $17500 \times g$ por 20 min a 4 °C, separándose en 3 capas. Los parásitos fueron entonces recuperados tanto de la capa superior como de la media del gradiente de percoll y fueron resuspendidos 1:3 con tampón fosfato salino o PBS (fosfato de sodio 40 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) conteniendo 1% de glucosa (PBSG). Los parásitos colectados fueron sometidos nuevamente a centrifugación a razón de $6000 \times g$ por 15 min a 4 °C.

Posteriormente, el sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó dos veces con PBSG (40 ml) para eliminar cualquier residuo de percoll que hubiera podido quedar. Estos parásitos, parcialmente purificados, fueron resuspendidos en 2 ml de PBSG y pasados por una columna cromatográfica de DEAE-celulosa (10 ml), previamente empaquetada y equilibrada a pH 7,5 con PBSG. El eluato, que contenía los tripanosomas purificados, fue centrifugado a $6000 \times g$ por 15 min a 4°C y el sedimento fue evaluado para cuantificar los tripanosomas mediante la técnica de Brener (1962). Este procedimiento consistió en colocar 5 μL de sangre del animal infectado sobre un portaobjeto y cubrirlo con una lámina cubreobjeto de 22 X 22 mm, la cual se presiona ligeramente para lograr que la sangre cubra la totalidad de la lámina cubreobjeto, formando una monocapa celular.

Luego se contaron los parásitos presentes en 100 campos con un aumento de 400X (Leica, 1349521X) y se obtuvo el número de parásitos según fórmula: total de tripanosomas \times factor del microscopio \times 200. El factor del microscopio utilizado en este caso fue de 5628 (el cual constituye la cantidad de campos que deben ser vistos para contar todos los parásitos de la lámina 22 X 22 mm) y el número 200 lo constituye el valor por el cual debe ser multiplicado el número total de parásitos contenidos en 5 μL para llevarlo a 1 ml.

Posteriormente, este pellet fue sonificado para romper los parásitos y obtener el proteoma para su evaluación.

3.3.2- Eliminación de sales contaminantes

Para asegurar una mayor eliminación de las sales provenientes de la solución tampón, detergente y ácidos nucleicos, las muestras fueron sometidas a

precipitación utilizando el estuche comercial 2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences®), siguiendo las siguientes instrucciones:

Inicialmente cada muestra de proteína se transfirió a un tubo de centrifuga de 12 ml y se agregaron 3 volúmenes de precipitante, mezclando en vortex. Posteriormente, se incubó en hielo (4 a 5 °C) por 15 minutos y se agregaron 3 volúmenes de coprecipitante, mezclándose brevemente en vortex. Estos tubos fueron centrifugados a 8000 x *g* por 10 minutos, retirándose apenas terminó la centrifugación. En el fondo de cada tubo se observó un pellet y se retiró el sobrenadante con pipeta, evitando la resuspensión del pellet. Se volvieron a colocar los tubos en la centrifuga cuidadosamente como antes (con el precipitado hacia fuera) y se centrifugaron de nuevo por 1 minuto para llevar todo el líquido restante a la parte inferior de los tubos. Con una pipeta se eliminó el sobrenadante restante y se agregaron 3 volúmenes del coprecipitante, centrifugándose por 5 minutos y descartándose igualmente el sobrenadante.

Luego se agregó suficiente agua destilada desionizada en la parte superior como para cubrir el pellet y se mezcló en vortex por unos cuantos segundos hasta que el pellet se dispersó pero sin que llegara a disolverse. Se agregó 1 ml de solución tampón de lavado (previamente congelada a -20°C). Posteriormente se agregó 5 µl de aditivo de lavado y se mezcló en vortex hasta que el pellet se dispersó completamente. Cada tubo fue incubado a -20°C por 30 minutos y se mezcló en vortex cada 10 minutos por 20 a 30 segundos para luego centrifugar a 8000 x *g* por 10 minutos.

El sobrenadante fue descartado cuidadosamente y el pellet se secó al aire, para luego ser resuspendido en solución de rehidratación, mezclándose en vortex por 30 segundos. Después se centrifugó a 8000 x g por 10 minutos para remover cualquier material insoluble y reducir la espuma. Este material fue liofilizado para su traslado al Laboratorio de Proteómica (Unidad Mixta de Investigación) del IRD (Institut de Recherche pour le Développement) en Montpellier, Francia.

3.3.3.- Hidratación del sedimento de proteínas

Una vez en el Laboratorio de Proteómica del IRD, el liofilizado de cada proteoma fue rehidratado en tampón de rehidratación (Urea 7 M, Tiourea 2 M, 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) 4 %, Tris 30 mM, Triton X-100 0,5 %) y se dejó durante toda la noche a 4 °C. El purificado Monagas se rehidrató con 50 µl, mientras que los purificados Liem 1 y Liem 2 fueron rehidratados con 100 µl cada uno. La razón de esto fue la diferencia en la parasitemia obtenida para cada aislado.

3.3.4.- Cuantificación de la concentración de proteínas

Luego de verificar la completa rehidratación y solubilización del liofilizado, se procedió a la cuantificación de la concentración de proteínas para cada aislado, la cual se hizo siguiendo el método de Bradford (1976). Con la finalidad de hacer una curva patrón, se diluyó un set de BSA (Albumina Sérica Bovina) inicial de 2 mg/ml en agua para realizar las siguientes concentraciones: 0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml y 1 mg/ml. De cada punto de la curva patrón, se colocaron 5 µL en la placa de ELISA fondo plano (Polysorp®).

Posteriormente, se hicieron las diluciones seriadas del extracto soluble de *T. vivax* en concentraciones que variaban de 1/50 a 1/1600 y se vertieron 5 µl en sendos pocillos de la placa de ELISA. Una vez vertidos los puntos de la curva patrón de BSA y las diluciones de las muestras problemas, se procedió a agregar 150 µl de la solución de trabajo del estuche comercial previamente diluido 1:4 en agua MilliQ. Se cubrió la placa y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente.

Después de la incubación, se midió la absorbancia a 595 nm en un sistema automático de lectura para placas de ELISA (BioRad®).

3.4.- Electroforesis diferencial en doble dimensión (2D-DIGE)

Esta parte de la investigación se llevó a cabo en el IRD-CIRAD, en Montpellier, Francia, realizándose según la metodología descrita para DIGE (2-D Differential Gel Electrophoresis) por Marouga y col. (2005) y Grébaut y col. (2009), de acuerdo al siguiente protocolo:

3.4.1.- Preparación de muestras para Isoelectroenfoque (IEF)

Además de los tres purificados de *T. vivax* ya descritos anteriormente en la Sección 3 (Monagas, Liem 1 y Liem 2), para la realización del 2D-DIGE se utilizó una muestra de proteoma del aislado El Frío de *T. evansi*, el cual ha sido caracterizado previamente (Parra, 2011). Esto se realizó para tener un estándar de comparación y poder seleccionar las proteínas que se expresen solamente en *T. vivax*, y que sean diferenciales con *T. evansi*. Sin embargo; es importante

aclarar que la evaluación del proteoma de *T. evansi* no forma parte del objetivo de esta investigación.

Una vez reconstituido el material liofilizado y realizada la cuantificación de proteínas, se procedió al marcaje de las muestras, para lo cual se utilizaron los colorantes fluoróforos CyDye DIGE (CyDye DIGE Fluors minimal dyes for Ettan DIGE) para marcaje mínimo de proteínas (Amersham GE Healthcare®), especialmente diseñado para la realización de 2D-DIGE. Esto consta de 3 colorantes: Cy2, Cy3 y Cy5. Bajo este protocolo, se puede evaluar simultáneamente en un mismo gel la abundancia diferencial proteica de los proteomas de los aislados de *T. vivax*, a partir de 50 µg de proteína de cada muestra.

Se planificó la realización de 4 geles para poder realizar dos réplicas de cada purificado y así obtener una mayor sensibilidad en el análisis proteómico. Para esto, cada muestra se marcó por duplicado, utilizándose los fluoróforos Cy3 y Cy5. El fluoróforo Cy2 se utilizó como control estándar interno de cada gel, tal como se muestra en la Tabla 2, para normalizar los niveles de proteína a lo largo del gel y para controlar la variación de gel a gel (Alban y col., 2003).

Tabla 2. Esquema del protocolo utilizado para el marcaje de las muestras y la realización del 2D-DIGE

Gel Número	Cy3	Cy5	Cy2
1	Monagas	Liem 1	Liem 1, Liem 2, Monagas y <i>T. evansi</i>
2	Liem 1	<i>T. evansi</i>	Liem 1, Liem 2, Monagas y <i>T. evansi</i>
3	Liem 2	Monagas	Liem 1, Liem 2, Monagas y <i>T. evansi</i>
4	<i>T. evansi</i>	Liem 2	Liem 1, Liem 2, Monagas y <i>T. evansi</i>

De cada muestra se tomaron alícuotas duplicadas de 50 µg de proteína, colocándose cada una en un tubo y llevándose a un volumen final de 20 µl. Luego se colocaron 400 pMol (1 µl) de los colorantes Cy3 y Cy5, previamente diluidos en dimetilformamidina (DMF) a una concentración de trabajo de 400 pMol/µl, respectivamente. Además se preparó el control estándar interno, el cual constaba de una mezcla de las 4 muestras (50 µg de proteína de cada una en un volumen final de 80 µl), al cual se le agregó 1600 pM (4 µl) del colorante Cy2 (diluido igual que los otros colorantes). Las muestras fueron centrifugadas rápidamente (aproximadamente 15 segundos y se mantuvieron refrigeradas (en hielo) y protegidas de la luz durante 30 minutos. Luego se agregó 1 µl de lisina (10 mM) para detener la reacción, mezclándose y centrifugándose rápidamente para llevar todo el contenido hasta el fondo del tubo. Se dejó en reposo (en oscuridad) por 10 minutos y posteriormente, las muestras marcadas se mezclaron de acuerdo al protocolo descrito en la Tabla 2 para cada gel.

En cada tubo correspondiente a cada gel se agregaron 20 µl de cada una de las dos muestras marcadas y 20 µl del control estándar interno y entonces cada tubo

fue completado hasta el volumen final de rehidratación con tampón de rehidratación (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4 %, Triton X-100 0,5 %, agente reductor (“Destreak Reagent”, GE Healthcare®) 1,2 % y anfolitos (Immobilised pH gradient IPG buffer pH 3-10, GE Healthcare®) 1%). Para la rehidratación de cada gel de isoelectroenfoque se necesitaron 450 µl de la solución. Los 4 tubos se dejaron en refrigeración y oscuridad por 10 minutos.

Para la realización de la primera dimensión se utilizaron geles inmobilinas (Immobiline™ DryStrip GE Healthcare®), con un rango de pH de 3 a 10 no lineal y de 24 cm de longitud. Estos geles fueron rehidratados pasivamente con las muestras (450 µl) por 14 horas, en oscuridad y a temperatura ambiente. Un esquema de esta metodología se muestra en la Figura 1.

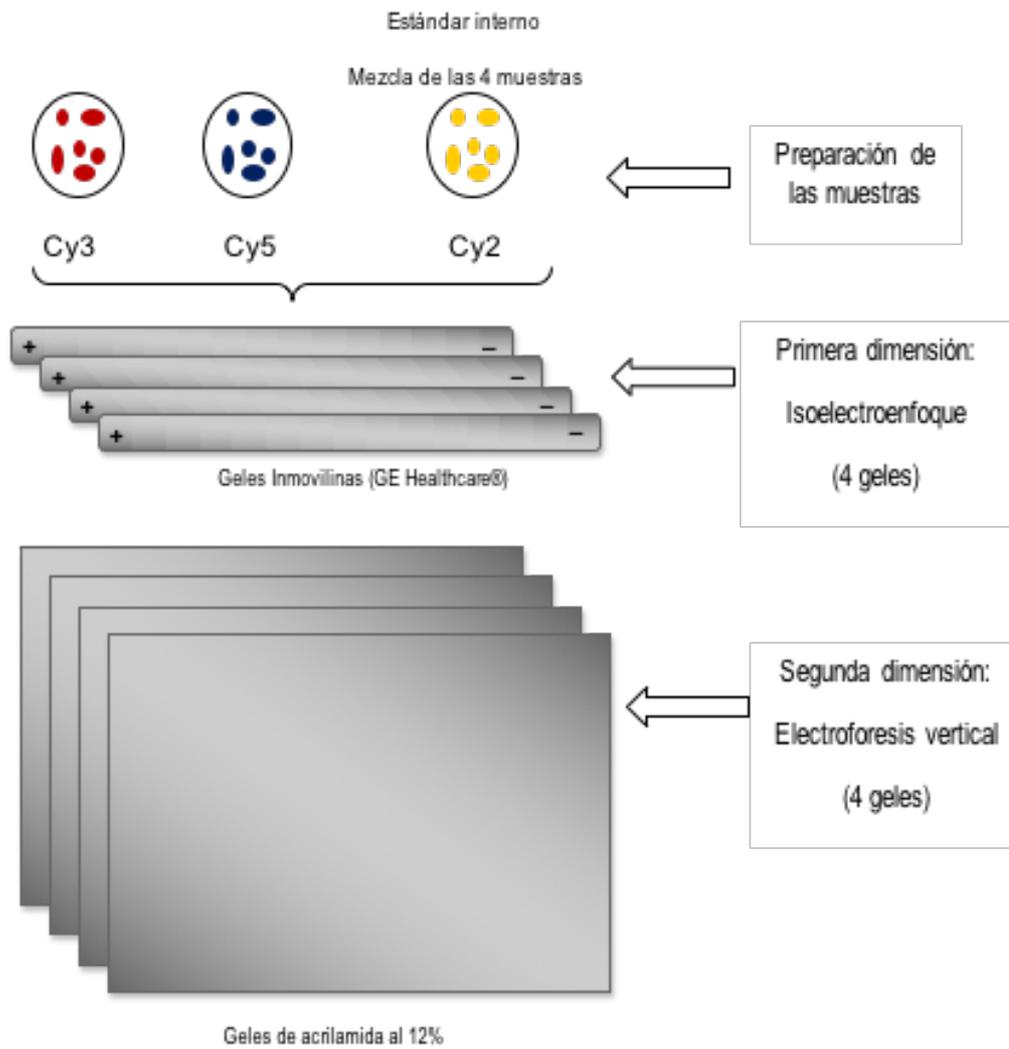


Figura 1. Esquema de marcaje de las muestras proteicas para DIGE

3.4.2.- Isoelectroenfoque

La primera dimensión de la electroforesis consistió en la separación de las proteínas por isoelectroenfoque (IEF), lo cual se llevó a cabo en un equipo Ettan IPGphor™ 3 (GE Healthcare®), utilizándose una carga de 50 $\mu\text{A}/\text{gel}$, bajo las siguientes condiciones:

- Paso 1: 60 V por 3h
- Paso 2: 1000 V por 4h en gradiente
- Paso 3: 8000 V por 4h en gradiente
- Paso 4: 8000 V constantes por 8h
- Paso 5: 30 V constantes hasta alcanzar 80000 V/h.

Luego de finalizado el IEF, los geles fueron congelados hasta la realización de la siguiente etapa.

3.4.3.- Equilibrio de geles de isoelectroenfoque

Antes de proceder a la segunda dimensión, los geles de isoelectroenfoque debieron ser equilibrados, ya que de esta manera se saturan con tampón conteniendo duodecil sulfato de sodio (SDS), el cual es requerido para la separación de las proteínas en la segunda dimensión.

Para esto, inicialmente, los geles se sumergieron en 10 ml de la solución de equilibrio 1 (Urea 6 M, Tris 300 mM, pH 8,8; SDS 2 %, glicerol 30 %, ditiotritol o DTT 1 % y trazas de bromofenol) por 20 minutos en agitación constante y protegidos de la luz. El propósito del DTT es mantener el estado reducido y no alquilado de las proteínas desnaturalizadas. Luego, los geles fueron lavados rápidamente con agua destilada y se sumergieron en 10 ml de solución de equilibrio 2 (Urea 6 M, Tris 300 mM, pH 8.8, SDS 2 %, glicerol 30 %, iodoacetamida 2,5 % y trazas de bromofenol). La iodoacetamida tiene como función alquilar los grupos tiol en las proteínas, previniendo su reoxidación durante la electroforesis, además de alquilar los restos de DTT previniendo de

esta manera la aparición de artefactos. Finalmente se enjuagaron en suficiente agua destilada.

3.4.4.- Electroforesis SDS-PAGE

La segunda dimensión consistió en electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para separar las proteínas por peso molecular, según la técnica de Laemmli (1970), con algunas modificaciones.

Para esto, se prepararon 4 geles de acrilamida al 12% (para una resolución de 10 a 200 kDa) y de 1,5 mm de espesor. Cuando los geles de acrilamida polimerizaron, los geles de isoelectroenfoco se colocaron en el borde superior del gel vertical de acrilamida y en un extremo se colocó un papel filtro con el marcador de peso molecular. Luego se selló el borde superior del gel vertical con agarosa al 0,5% en tampón TAE 1X (Tris/Acetato 0,04 M, EDTA 0,01 M). La separación electroforética se realizó en el sistema Ettan Dalt II (Amersham Biosciences®), realizando la corrida de los 4 geles de manera simultánea, utilizando tampón de corrida (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1 %) a 17 mA/gel a 4 °C, con una duración de entre 24 y 30 horas.

3.4.5.- Software de análisis

Una vez culminada la electroforesis en los geles de acrilamida, los geles 2-D DIGE fueron escaneados en un equipo Typhoon 9400 (GE Healthcare®). Las longitudes de onda utilizadas para cada fluoróforo fueron: Cy2: 490 nm; Cy3: 550 nm y Cy5: 650 nm.

Las imágenes emitidas por cada fluoróforo se obtienen por separado con una resolución de 100 μm . Luego, las imágenes escaneadas fueron cargadas en el software Progenesis SameSpots v3.0 (Nonlinear Dynamics Ltd.), para poder realizar el reconocimiento y cuantificación de la expresión de los puntos o “spots”.

La cuantificación de los datos de los “spots” de los aislados de *T. vivax* fue normalizado usando el control estándar interno (Cy2). Este software compara la expresión de los diferentes “spots” en los distintos geles y aplica las pruebas estadísticas *t* student y ANOVA, lo cual permitió seleccionar los “spots” correspondientes a proteínas comunes en los aislados pero con expresión diferencial en cada muestra, además de los que se manifiesten en diferentes posiciones, para luego cortarlos en los geles.

3.5.- Identificación de proteínas expresadas diferencialmente entre los dos aislados de *T. vivax*

De los geles de doble dimensión se seleccionaron los “spots” que fueron comunes a ambos aislados pero con expresión diferencial, además de los que se manifestaron en diferentes posiciones, de acuerdo al siguiente protocolo:

3.5.1.- Coloración de los geles de acrilamida

Para poder observar los “spots” seleccionados en el gel y proceder a cortarlos, fue necesario hacer la coloración de los mismos. Para esto, después de ser escaneados, los geles se sumergieron en 150 ml de solución tampón de fijación cada uno (Etanol 50% y Ácido Fosfórico 10%), dejándolos en agitación constante por 3 días. Luego, se descartó la solución tampón de fijación y se agregó la

solución colorante de azul plata (blue silver), dejándose nuevamente en agitación constante por 24 horas (Westermeyer, 2006; Candiano y col., 2004). Una vez verificada la coloración del gel y visualización de los spots, se descartó el colorante y los geles fueron lavados con agua destilada.

3.5.2.- Selección y digestión de proteínas de interés

Una vez obtenida la imagen final de los “spots” de interés a través del software Progenesis SameSpots v3.0 (Nonlinear Dynamics Ltd.) y teñidos los geles, se procedió a cortar los “spots” de interés en los 4 geles. Esto fue realizado en una campana de flujo laminar para prevenir contaminación. Cada “spot” fue cortado en los 4 geles con la ayuda de puntas pipeta de 1000 µl estériles y luego colocados en un vial estéril, identificado y congelado a -80 °C hasta su digestión con tripsina.

La digestión de los geles se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Wilm y col. (1996), con algunas modificaciones, tal como se describe a continuación:

Inicialmente se lavaron los spots con 100 µl de solución tampón de acetonitrilo (ACN) 50% y trietilamonio bicarbonato (TEABC) 50 mM, agitándose en vortex por 10 minutos, eliminando luego el sobrenadante. Los “spots” se lavaron de esta manera 4 veces, hasta que se decoloraron totalmente. Posterior a esto, se rehidrataron por 10 min con TEABC 50 mM, se eliminó el sobrenadante y se deshidrataron por 10 minutos con ACN 100%. Luego de eliminar el sobrenadante, se colocaron en la secadora de tubos por 3 minutos. Una vez secos los trozos de acrilamida se procedió a la digestión, rehidratando los geles

con 40 µl de solución de digestión (Tripsina 6 µg en 600 µl de TEABC 50 mM), incubándose en hielo por 30 minutos y dejándose posteriormente en agitación constante por 12 a 14 horas a una temperatura entre 25 y 30 °C.

Al día siguiente se procedió a la extracción de los péptidos, recuperando el sobrenadante de los tubos (producto de la digestión con tripsina) y colocándolo en otro tubo correctamente identificado. A los geles se les agregó 40 µl de ACN 100% y a los 10 minutos se recuperó el sobrenadante, el cual se agregó en el tubo que contenía los péptidos productos de la digestión. Luego, se agregó TEABC 50 mM y 10 minutos después se volvió a agregar ACN 100% (40 µl), recuperándose el sobrenadante 10 minutos después. Posteriormente se agregó 40 µl de ácido fórmico 5% y a los 10 minutos se agregó 40 µl de ACN 100%, recuperándose nuevamente el sobrenadante. Los tubos conteniendo todos los sobrenadantes (péptidos) fueron secados por 2 horas aproximadamente y se congelaron a -80°C hasta su procesamiento por espectrometría de masas.

3.5.3.- Análisis por espectrometría de masas para la identificación de las proteínas (LC-MS/MS)

El análisis se realizó con un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific), de acuerdo a la metodología indicada para el equipo. Las muestras (3-5 µl) fueron analizadas en línea por nanoflujo HPLC (Ultimate 3000, Dionex) acoplado al espectrómetro de masas con una fuente de nanoelectropulverización. Los péptidos se separaron en una columna capilar (fase inversa C18, Pepmap®, Dionex) de 0,3 mm x 10 mm, utilizando un gradiente de A (Ácido fórmico 0,1%; acetonitrilo 2% agua) de 0 a 40% en 30

minutos y de B (Ácido fórmico 0,1% en acetronitrilo) de 80% en 15 minutos a una velocidad de flujo de 300 nl/minuto para eluir los péptidos por capilaridad. Los experimentos de LC-MS/MS comprendieron eventos de 5 ciclos. Los fragmentos generados por disociación inducida por colisión (CID) fueron detectados en una trampa lineal. Para la CID se utilizó una energía de colisión normalizada de 35 eV y un tiempo de activación de 30 ms.

Todos los espectros fueron registrados utilizando en software Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific) con el método TOP5_FTIT.meth. El rango de masas fue de 400 a 2000 y las condiciones espectrométricas estándares fueron: voltaje de spray 2,4 kV, flujo de gas auxiliar, temperatura capilar de 200 °C, voltaje capilar 40 V. Los datos espectrales se analizaron utilizando el programa Proteome Discoverer software 1.3 (Thermo Fisher Scientific) y Mascot versión 2.3 (<http://www.matrixscience.com>) y fueron contrastados con las entradas para "Trypanosoma" en las bases de datos UniProtKB/Swiss-Prot y UniProtKB/TrEMBL (<http://www.uniprot.org>) Sprot_Trembl_2012_07 (23.702.399 secuencias y 7.765.859.837 residuos / Trypanosoma 23.521 secuencias, punto de corte $p < 0,01$; 2 péptidos/proteínas) con las siguientes modificaciones: carbamidometilacion (C) fijo y oxidación (O) variable. El manejo y la validación de los datos de espectrometría de masas fue llevado a cabo usando el programa Proteome Discoverer software 1.3 (Thermo Fisher Scientific).

Sólo las proteínas identificadas con dos o más péptidos fueron consideradas como significativas para ser buscadas en SwissProt o TrEMBL. Todos los resultados obtenidos de las bases de datos, fueron enfrentados contra el

transcriptoma de *T. vivax*, publicado recientemente por Greif y col. (2013), el cual está disponible en: <http://www.bioinformatica.fcien.edu.uy/Tvivax/>. Este transcriptoma fue realizado en el Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay, a partir del aislado TvLIEM176, el cual es uno de los aislados utilizados en este estudio.

Posteriormente, se hizo un Blast de cada proteína para conocer el porcentaje (%) de homología con otros tripanosomas y con su secuencia se calculó su peso molecular y punto isoeléctrico (pI). Por otra parte, se hizo una correlación de las proteínas identificadas y su nivel de expresión en los dos aislados en estudio, así como una búsqueda en las bases de datos UniprotKB (www.uniprot.org) y CombFunc (www.sbg.bio.ic.ac.uk) para encontrar sus funciones biológicas y moleculares.

IV. RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1.- Determinación de los patrones de virulencia y patogenicidad de cada aislado de *T. vivax*

Para determinar los parámetros de virulencia y patogenicidad mostrados por los dos aislados venezolanos de *T. vivax* durante las infecciones experimentales, fue necesario conocer referencias de los conceptos y los parámetros involucrados en las interacciones patógeno-hospedador, como los señalados por Casadevall y Pirofski (1999, 2000) y Soriano y col. (2006), quienes indican que en la relación hospedero-microorganismo, el resultado patológico debe ser identificado desde el nivel molecular hasta el nivel de organismo y dependen de factores, tanto del hospedador como del patógeno, entre los cuales vale destacar: los daños ocasionados por sustancias excretadas por los microorganismos, así como por la respuesta inmune del hospedero. De forma similar, la manifestación clínica de la infección microbiana dependerá de la cantidad de daño ocasionada en el hospedador.

Además, Casadevall y Pirofski (2003) proponen la teoría de la respuesta-daño de la patogenia microbiana, la cual se basa en: a) la patogenia microbiana es el resultado de la interacción entre un hospedador y un microorganismo; b) el resultado patológico en el hospedador, debido a la interacción hospedador-microorganismo, se determina por la cantidad de daño producida en el hospedador; y c) el daño en el hospedador resulta tanto de factores microbianos como de la respuesta inmunitaria del hospedador.

En este orden de ideas, para demostrar y describir los efectos relacionados con la virulencia y la patogenicidad de los tripanosomas originarios de Venezuela, se consideraron las variaciones en los niveles de parasitemia desarrollada durante las infecciones experimentales, las cuales juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Así como también, las variaciones de la temperatura corporal y de los principales niveles hematológicos tales como el porcentaje de hematocrito, concentración de hemoglobina, número total de leucocitos, contaje diferencial de leucocitos y concentración de proteínas séricas totales.

4.1.1.- Evaluación clínica

4.1.1.1.- Temperatura corporal

Durante la fase de preinfección, los animales del grupo control presentaron un promedio de temperatura corporal de 39 °C, mientras que los animales del grupo experimental TvMT1 mostraron un promedio de 38,9 °C y los infectados con TvLIEM176 un promedio de 39,0 °C; manteniéndose todos los animales dentro de los valores considerados fisiológicos para la especie (entre 38,3 °C y 39,4 °C) según Mendoza y col. (2010), Tabla 3.

Durante el tiempo que duró la fase experimental, el promedio de la temperatura de los ovinos infectados con el aislado TvLIEM176, osciló entre 38,9 y 39,9 °C, registrándose el mayor pico de hipertermia para el día 6 post-infección (PI), mientras que los ovinos inoculados con el aislado TvMT1 presentaron valores promedios de temperatura entre 39 y 40 °C, muy por encima de los valores promedios registrados en el grupo control (entre 38,7 y 39,2 °C).

Tabla 3. Valores promedios de la temperatura corporal (°C) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección

Días	Grupo		
	Control Promedio ± DS	TvMT1 Promedio ± DS	TvLIEM176 Promedio ± DS
PPI	39,1 ± 0,1a	38,9 ± 0,0a	39,0 ± 0,1a
3	38,9 ± 0,2a	39,0 ± 0,2a	38,9 ± 0,1a
6	38,9 ± 0,3a	40,0 ± 0,1b	39,9 ± 0,1b
9	39,1 ± 0,5a	39,9 ± 0,1b	39,7 ± 0,3b
12	39,1 ± 0,1a	39,7 ± 0,2b	39,4 ± 0,2ab
15	38,7 ± 0,3a	39,3 ± 0,1b	39,4 ± 0,3b
18	38,8 ± 0,2a	39,7 ± 0,2b	39,4 ± 0,2b
21	38,7 ± 0,3a	39,8 ± 0,4b	39,1 ± 0,2a
24	38,8 ± 0,3a	40,0 ± 0,2b	39,3 ± 0,2c
27	39,1 ± 0,2a	39,5 ± 0,6b	39,5 ± 0,1ab
30	39,2 ± 0,2a	39,5 ± 0,5b	39,5 ± 0,3ab
33	39,2 ± 0,3a	39,5 ± 0,2b	39,2 ± 0,5ab
36	39,0 ± 0,2a	39,3 ± 0,4a	39,0 ± 0,2a
39	38,8 ± 0,3a	39,4 ± 0,4b	39,0 ± 0,2a
42	39,1 ± 0,1a	39,3 ± 0,3a	39,0 ± 0,2a
45	39,2 ± 0,2a	39,7 ± 0,3b	39,0 ± 0,4a
48	38,9 ± 0,3a	39,8 ± 0,2b	39,1 ± 0,5a
51	38,9 ± 0,2a	39,8 ± 0,4b	39,3 ± 0,3c
54	39,1 ± 0,1a	39,6 ± 0,3b	39,4 ± 0,4ab
57	38,9 ± 0,3a	39,8 ± 0,1b	39,6 ± 0,2b
60	38,8 ± 0,2a	39,9 ± 0,3b	39,3 ± 0,1c

PPI: Período preinfección

DS: Desviación estándar

a, b, c: Valores de la misma fila con letras diferentes, difieren significativamente (P<0,05)

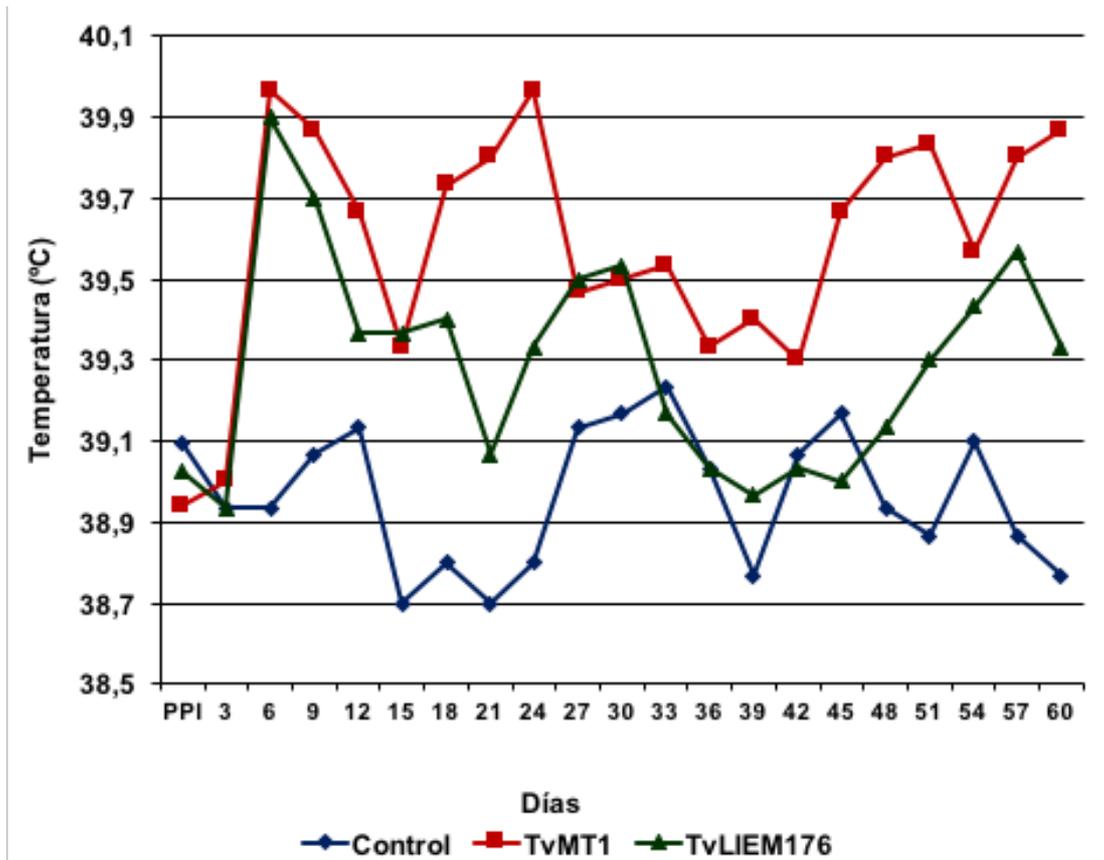


Figura 2. Valores promedio de la temperatura corporal (°C) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el periodo pre y post-infección

Como puede observarse en la Tabla 3 y en la en la Figura 2, los mayores valores de temperatura fueron alcanzados por los animales inoculados con el aislado TvMT1 los días 6 y 24 PI, con un promedio en el grupo de 40 °C, señalando a este aislado parasitario como el que mayormente afectó la temperatura corporal, provocando varios episodios febriles.

Adicionalmente, la Tabla 3 muestra que la etapa febril en ambos grupos inoculados comenzó a partir del día 6 PI, observándose diferencias significativas entre el grupo control y ambos grupos experimentales. En el caso del aislado

TvMT1, esta fase febril se mantiene hasta el día 24 PI cuando se alcanza el mayor pico de temperatura (40 °C), a partir de lo cual se observa un periodo afebril de poco mas de dos semanas (hasta el día 42 PI), manifestándose posteriormente fiebre hasta el final del experimento. Sin embargo, con excepción de dos días (días 36 y 42 PI), durante todo el período experimental hubo diferencias estadísticas entre el valor promedio de temperatura de los animales inoculados con el aislado TvMT1 y el valor promedio de los animales del grupo control.

Por su parte, los episodios febriles mostrados por los animales inoculados con el aislado TvLIEM176 se caracterizaron por ser de corta duración (días 6 al 9 PI y día 57 PI). Durante los días 12 al 54 PI estos animales mostraron valores promedio de temperatura dentro de los rangos fisiológicos para la especie, y durante 3 semanas (días 27 al 48 PI) no se observaron diferencias estadísticas cuando se comparó con el promedio del grupo control.

No obstante, el análisis de varianza de la variable temperatura, reveló que durante la fase experimental se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0,0001$) en los valores promedio de temperatura entre los tres grupos, y entre los días de experimentación. La prueba de comparación de medias se muestra en la Tabla 4, donde se puede ver que los animales inoculados con el aislado TvMT1 presentaron mayores valores promedio en la temperatura corporal, comparado con los animales inoculados con el aislado TvLIEM176 y con el grupo control.

Tabla 4. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable temperatura corporal (°C)

Grupo	Promedio
Control	39,0 ± 0,04 ^a
TvMT1	39,5 ± 0,04 ^b
TvLIEM176	39,2 ± 0,04 ^c

a, b, c: Valores con letras diferentes, difieren significativamente (P<0,05)

4.1.1.2.- Frecuencia cardíaca

El promedio de frecuencia cardíaca durante el período preinfección en los animales del grupo control fue de 63,3 latidos/min, mientras que en los animales del grupo inoculado con TvMT1 fue de 70,3 latidos/min y en los infectados con TvLIEM176 fue de 66,3 latidos/min, estando dentro de los valores considerados como fisiológicos para la especie según Mendoza y col. (2010) y sin reflejarse diferencias significativas entre los tres grupos.

En la Tabla 5 y en la Figura 3 se puede observar que durante la fase experimental, los valores promedio de frecuencia cardíaca en los ovinos infectados con TvLIEM176, oscilaron entre 64,0 y 96,0 latidos/min, mientras que en los ovinos inoculados con TvMT1 los valores estuvieron entre 86,7 y 104,0 latidos/min.

Tabla 5. Valores promedios de frecuencia cardiaca (latidos/minuto) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección

Días	Grupo		
	Control Promedio \pm DS	TvMT1 Promedio \pm DS	TvLIEM Promedio \pm DS
PPI	63,3 \pm 4,7a	70,3 \pm 2,5a	66,3 \pm 1,5a
3	64,0 \pm 4,0a	88,7 \pm 4,6b	64,0 \pm 0,0a
6	65,3 \pm 6,1a	98,7 \pm 2,3b	82,7 \pm 4,6c
9	62,7 \pm 8,3a	101,3 \pm 2,3b	96,0 \pm 10,6ab
12	61,3 \pm 4,6a	100,0 \pm 4,0b	72,0 \pm 4,0b
15	68,0 \pm 4,0a	94,7 \pm 2,3b	92,0 \pm 17,4b
18	66,7 \pm 4,6a	96,0 \pm 6,9b	96,0 \pm 8,4b
21	62,7 \pm 4,6a	104,0 \pm 12,0b	89,3 \pm 10,1c
24	70,7 \pm 6,1a	102,7 \pm 12,2b	90,7 \pm 8,3c
27	64,0 \pm 4,0a	98,7 \pm 2,3b	85,3 \pm 4,6c
30	62,7 \pm 6,1a	93,3 \pm 4,6b	80,0 \pm 8,0c
33	68,0 \pm 4,0a	93,3 \pm 2,3b	78,7 \pm 6,1c
36	70,7 \pm 6,1a	90,7 \pm 2,3b	82,7 \pm 2,3b
39	66,7 \pm 4,6a	90,7 \pm 4,6b	82,7 \pm 6,1b
42	64,0 \pm 4,0a	92,0 \pm 4,0b	89,3 \pm 2,3b
45	68,0 \pm 4,0a	96,0 \pm 4,0b	85,3 \pm 4,6c
48	69,3 \pm 4,6a	92,0 \pm 4,0b	86,7 \pm 10,1b
51	65,3 \pm 2,3a	94,7 \pm 10,1b	84,0 \pm 4,0c
54	65,3 \pm 4,6a	86,7 \pm 6,1b	84,0 \pm 4,0b
57	62,7 \pm 2,3a	88,0 \pm 4,0b	74,7 \pm 6,1c
60	61,3 \pm 2,3a	88,0 \pm 8,0b	76,0 \pm 4,0c

PPI: Período preinfección

DS: Desviación estándar

a, b, c: Valores de la misma fila con letras diferentes, difieren significativamente ($P < 0,05$)

Los cambios producidos en la frecuencia cardiaca de los animales inoculados con el aislado TvMT1 se comenzaron a reflejar a partir del día 3 PI, manteniéndose este parámetro elevado durante toda la fase experimental, llegando incluso a promedios por encima de 100 latidos/minuto los días 9, 12, 21 y 24 PI. El análisis estadístico permitió detectar que durante todo el ensayo existieron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre el valor

promedio de la frecuencia cardíaca de este grupo y los promedios del grupo control.

Por otra parte, en el grupo de animales infectados con el aislado TvLIEM176, las diferencias con el grupo control empezaron a reflejarse igualmente a partir del día 6 PI, manteniéndose valores por encima de los parámetros fisiológicos hasta el día 27 PI; a partir de lo cual se observa que por unos 9 días (hasta el día 39 PI) los valores de frecuencia cardíaca bajaron hasta hacerse fisiológicos para nuevamente volver a elevarse hasta el día 54 PI. Sin embargo, las elevaciones en la frecuencia cardíaca para este aislado (TvLIEM176) no fueron tan marcadas como en el caso del aislado TvMT1, observándose que a partir de la cuarta semana PI, el promedio se encontraba siempre cerca de 80 latidos/min (límite superior considerado como fisiológico para esta especie). En la tercera semana PI (desde el día hasta el día 33 PI) fue cuando se pudieron detectar las mayores diferencias entre ambos grupos infectados con *T. vivax*, Tabla 5.

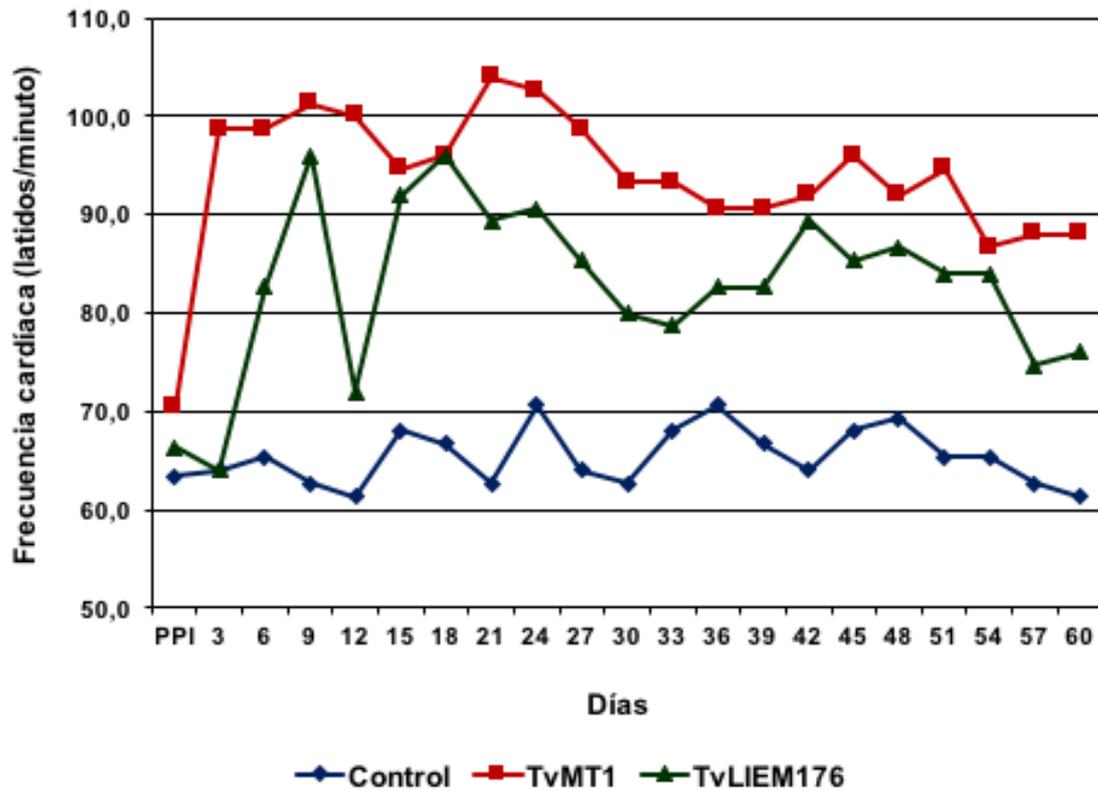


Figura 3. Valores promedios de la frecuencia cardiaca (latidos/minuto) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección

El análisis de varianza permitió observar diferencias extremadamente significativas entre los valores de frecuencia cardíaca entre los tres grupos ($P < 0,0001$). En la Tabla 6 se muestra la prueba de comparación de medias, donde se manifiesta que los animales inoculados con el aislado TvMT1 presentaron mayores valores promedio en la frecuencia cardíaca, comparado con los animales inoculados con el aislado TvLIEM176 y con el grupo control.

Tabla 6. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable frecuencia cardiaca (latidos/min)

Grupo	Promedio
Control	65,1 ± 0,93a
TvMT1	90,9 ± 0,93b
TvLIEM176	80,7 ± 0,93c

a, b, c: Valores con letras diferentes, difieren significativamente ($P < 0,05$)

4.1.1.3.- Frecuencia respiratoria

Cuando se evaluó la frecuencia respiratoria durante el periodo preinfección, los animales del grupo control presentaron un promedio de 22,0 respiraciones/min; los animales inoculados con TvMT1 un promedio de 21,3 respiraciones/min y los inoculados con TvLIEM176 un promedio de 21,7 respiraciones/min, pudiéndose determinar que los valores de los tres grupos están dentro del rango de normalidad (Mendoza y col., 2010) y sin detectarse diferencias estadísticas significativas entre los grupos, Tabla 7. Adicionalmente, los animales del grupo control mantuvieron durante todo el experimento valores de frecuencia respiratoria ubicados dentro de los parámetros considerados fisiológicos para la especie.

Tabla 7. Valores promedios de frecuencia respiratoria (respiraciones/minuto) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección

Días	Grupo		
	Control Promedio \pm DS	TvMT1 Promedio \pm DS	TvLIEM Promedio \pm DS
PPI	22,0 \pm 1,0a	21,3 \pm 1,2 a	21,7 \pm 2,3a
3	18,3 \pm 2,5a	21,3 \pm 2,3a	21,3 \pm 4,6a
6	24,3 \pm 3,5a	41,3 \pm 6,1b	30,7 \pm 10,1c
9	22,7 \pm 2,3a	34,7 \pm 2,3b	37,3 \pm 4,6b
12	22,7 \pm 2,3a	33,3 \pm 2,3b	33,3 \pm 4,6b
15	22,3 \pm 1,5a	41,3 \pm 6,1b	38,7 \pm 6,1b
18	22,7 \pm 6,1a	37,3 \pm 9,2b	39,3 \pm 6,4b
21	24,0 \pm 3,5a	41,3 \pm 6,1b	40,0 \pm 0,0b
24	22,3 \pm 0,6a	41,3 \pm 4,6b	37,3 \pm 2,3b
27	24,0 \pm 4,0a	36,0 \pm 4,0b	33,3 \pm 6,1b
30	25,3 \pm 2,3a	37,3 \pm 4,6b	29,3 \pm 2,3a
33	21,3 \pm 2,3a	38,7 \pm 2,3b	30,7 \pm 2,3c
36	25,3 \pm 2,3a	38,7 \pm 2,3b	30,7 \pm 4,6a
39	22,7 \pm 1,2a	42,7 \pm 2,3b	30,7 \pm 4,6c
42	24,0 \pm 6,9a	33,3 \pm 2,3b	32,0 \pm 4,0b
45	26,7 \pm 6,1a	30,7 \pm 2,3a	29,3 \pm 2,3a
48	24,0 \pm 4,0a	30,7 \pm 6,1a	28,0 \pm 4,0a
51	25,3 \pm 1,2a	32,0 \pm 4,0a	29,3 \pm 2,3a
54	24,0 \pm 0,0a	30,7 \pm 2,3a	29,3 \pm 2,3a
57	22,7 \pm 2,3a	30,7 \pm 4,6a	30,7 \pm 2,3a
60	24,0 \pm 0,0a	33,3 \pm 4,6a	30,7 \pm 2,3a

PPI: Período preinfección

DS: Desviación estándar

a, b, c: Valores de la misma fila con letras diferentes, difieren significativamente ($P < 0,05$)

Posterior a la infección experimental, los ovinos inoculados con TvMT1 sufrieron fluctuaciones entre 21,3 y 42,7 respiraciones/min, entre tanto los animales inoculados con TvLIEM176 mostraron variaciones en el promedio de este parámetro que oscilaron desde 21,3 a 40,0 respiraciones/min, mostrando ambos grupos valores estadísticamente superiores a los promedios obtenidos en el grupo control (que estuvieron entre 18,3 y 26,7 respiraciones/min).

Es importante destacar que aunque los picos máximos en el promedio de la frecuencia respiratoria conseguidos en ambos grupos experimentales fue relativamente similar (42, 7 respiraciones/minutos en el grupo inoculado con TvMT1 versus 40,0 respraciones/minuto en el grupo con TvLIEM176), este signo vital fue mayormente afectado por el aislado TvMT1 puesto que en general se encontraron valores más altos para estos animales tal como se puede observar en la Figura 4. Allí puede notarse que a partir del 6 PI y durante toda la fase de infección estos animales mostraron valores de frecuencia respiratoria por encima del rango normal, mientras que en el grupo TvLIEM176 se puede ver que a partir del día 30 PI hubo una tendencia a la regularización de esta variable, incluso pudiéndose detectar diferencias estadísticas ($P < 0,05$) entre ambos grupos experimentales durante los días 30 al 39 PI.

Al realizar el análisis de varianza para este signo vital, se pudo encontrar diferencias estadísticas ($P < 0,0001$) entre los valores promedios de los tres grupos; y al realizar la prueba de comparación de medias (mostrada en la Tabla 8) se puede ver que el aislado TvMT1 fue el que produjo los mayores cambios de esta variable.

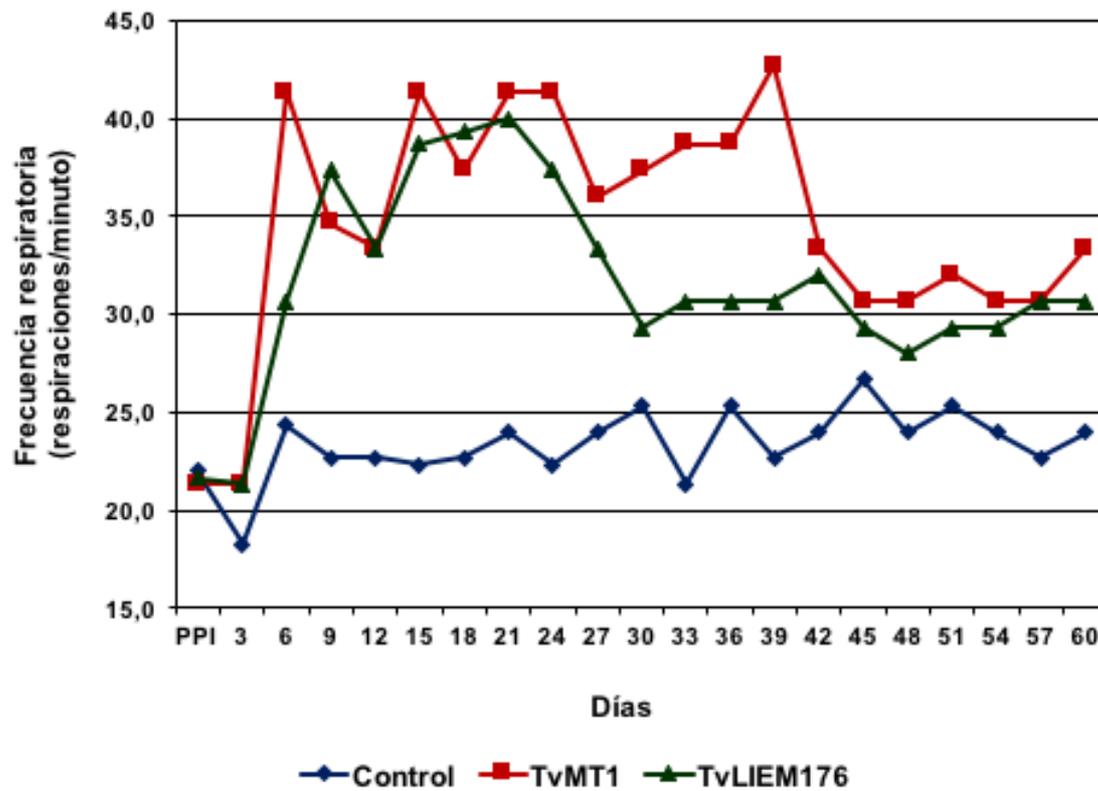


Figura 4. Valores promedios de la frecuencia respiratoria (respiraciones/minuto) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección

Tabla 8. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable frecuencia respiratoria (respiraciones/min)

Grupo	Promedio
Control	22,4 ± 0,56 ^a
TvMT1	33,0 ± 0,56 ^b
TvLIEM176	30,6 ± 0,56 ^c

a, b, c: Valores con letras diferentes, difieren significativamente (P<0,05)

4.1.1.4.- Otros signos clínicos

Además de las alteraciones descritas previamente en los signos vitales, en los ovinos inoculados con los aislados TvLIEM176 y TvMT1 de *T. vivax*, se observaron los siguientes signos clínicos: anorexia o inapetencia, letargia,

debilidad, palidez de mucosas algunas veces con tinte icterico, pérdida del brillo del pelo, linfadenomegalia, secreción ocular serosa unilateral, orquitis bilateral y pérdida de peso con enflaquecimiento progresivo. Estos signos fueron comunes en ambos grupos infectados; no obstante, en el grupo inoculado con el aislado TvMT1 la aparición de los mismos ocurrió antes y además fueron más severos que en el grupo infectado con el aislado TvLIEM176. Además, en el grupo TvMT1 se presentaron dos animales con edemas en miembros posteriores y pabellones auriculares y disnea. Estos signos no se observaron en el grupo TvLIEM176.

4.1.2.- Evaluación Hematológica

4.1.2.1.- Parasitemia

Los tripanosomas fueron detectados en sangre por primera vez a partir del tercer día PI en ambos grupos experimentales; resultando posteriormente en la aparición de varias ondas parasitémicas durante el periodo de evaluación, lo cual evidenció el comportamiento característico de estos parásitos, Tabla 9.

Tabla 9. Variación de los valores de la parasitemia (tripanosomas/ml) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección

Días	Grupo		
	Control Promedio \pm DS	TvMT1 Promedio \pm DS	TvLIEM Promedio \pm DS
PPI	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
3	0,0 \pm 0,0	6,7x10 ⁵ \pm 7,6x10 ⁴ a	6,0x10 ⁵ \pm 5,2x10 ⁵ a
6	0,0 \pm 0,0	2,9x10 ⁶ \pm 1,4x10 ⁶ a	1,2x10 ⁷ \pm 2,6x10 ⁶ b
9	0,0 \pm 0,0	1,6x10 ⁶ \pm 1,1x10 ⁶ a	1,0x10 ⁷ \pm 6,2x10 ⁶ b
12	0,0 \pm 0,0	1,1x10 ⁶ \pm 1,3x10 ⁶ a	3,3x10 ⁶ \pm 1,0x10 ⁶ b
15	0,0 \pm 0,0	8,3x10 ⁴ \pm 7,6x10 ⁴ a	2,7x10 ⁶ \pm 1,5x10 ⁶ b
18	0,0 \pm 0,0	1,6x10 ⁶ \pm 1,3x10 ⁶ a	2,4x10 ⁶ \pm 1,6x10 ⁶ a
21	0,0 \pm 0,0	1,9x10 ⁶ \pm 2,2x10 ⁶ a	9,2x10 ⁵ \pm 4,0x10 ⁵ a
24	0,0 \pm 0,0	2,9x10 ⁶ \pm 2,2x10 ⁶ a	5,0x10 ⁶ \pm 3,7x10 ⁶ a
27	0,0 \pm 0,0	2,1x10 ⁶ \pm 3,6x10 ⁶ a	9,1x10 ⁶ \pm 7,0x10 ⁶ b
30	0,0 \pm 0,0	1,8x10 ⁶ \pm 2,7x10 ⁶ a	7,3x10 ⁶ \pm 2,5x10 ⁶ b
33	0,0 \pm 0,0	6,3x10 ⁵ \pm 4,6x10 ⁵ a	1,7x10 ⁶ \pm 6,3x10 ⁵ b
36	0,0 \pm 0,0	2,3x10 ⁵ \pm 4,0x10 ⁵ a	6,5x10 ⁵ \pm 4,4x10 ⁵ a
39	0,0 \pm 0,0	2,7x10 ⁵ \pm 2,7x10 ⁵ a	1,3x10 ⁶ \pm 1,7x10 ⁶ a
42	0,0 \pm 0,0	2,0x10 ⁵ \pm 2,3x10 ⁵ a	3,4x10 ⁶ \pm 3,9x10 ⁶ b
45	0,0 \pm 0,0	8,2x10 ⁵ \pm 1,2x10 ⁵ a	2,3x10 ⁶ \pm 2,5x10 ⁶ b
48	0,0 \pm 0,0	7,0x10 ⁵ \pm 2,2x10 ⁵ a	2,3x10 ⁶ \pm 1,7x10 ⁶ b
51	0,0 \pm 0,0	1,0x10 ⁶ \pm 8,7x10 ⁵ a	2,1x10 ⁶ \pm 2,1x10 ⁶ a
54	0,0 \pm 0,0	3,7x10 ⁵ \pm 6,3x10 ⁵ a	3,0x10 ⁶ \pm 3,2x10 ⁶ a
57	0,0 \pm 0,0	7,5x10 ⁵ \pm 4,6x10 ⁵ a	2,6x10 ⁶ \pm 1,8x10 ⁶ b
60	0,0 \pm 0,0	7,7x10 ⁵ \pm 4,9x10 ⁵ a	2,9x10 ⁶ \pm 1,9x10 ⁶ b

PPI: Período preinfección

DS: Desviación estándar

a, b: Valores de la misma fila con letras diferentes, difieren significativamente (P<0,05)

Los ovinos inoculados con el aislado TvLIEM176 presentaron 3 ondas de parasitemia, observándose la primera los días 6 y 9 PI con un promedio para los 3 animales de $1,2 \times 10^7$ y $1,0 \times 10^7$ trip/ml, respectivamente, Figura 5. Esta onda representó el mayor valor registrado durante toda la fase de infección de estos animales. Posteriormente se observó una segunda onda de parasitemia el día 27 PI con un valor promedio de $9,1 \times 10^6$ trip/ml y luego una tercera onda de

menor intensidad de $3,4 \times 10^6$ trip/ml el día 42 PI, a partir de lo cual la parasitemia se mantuvo en niveles similares hasta el final del estudio.

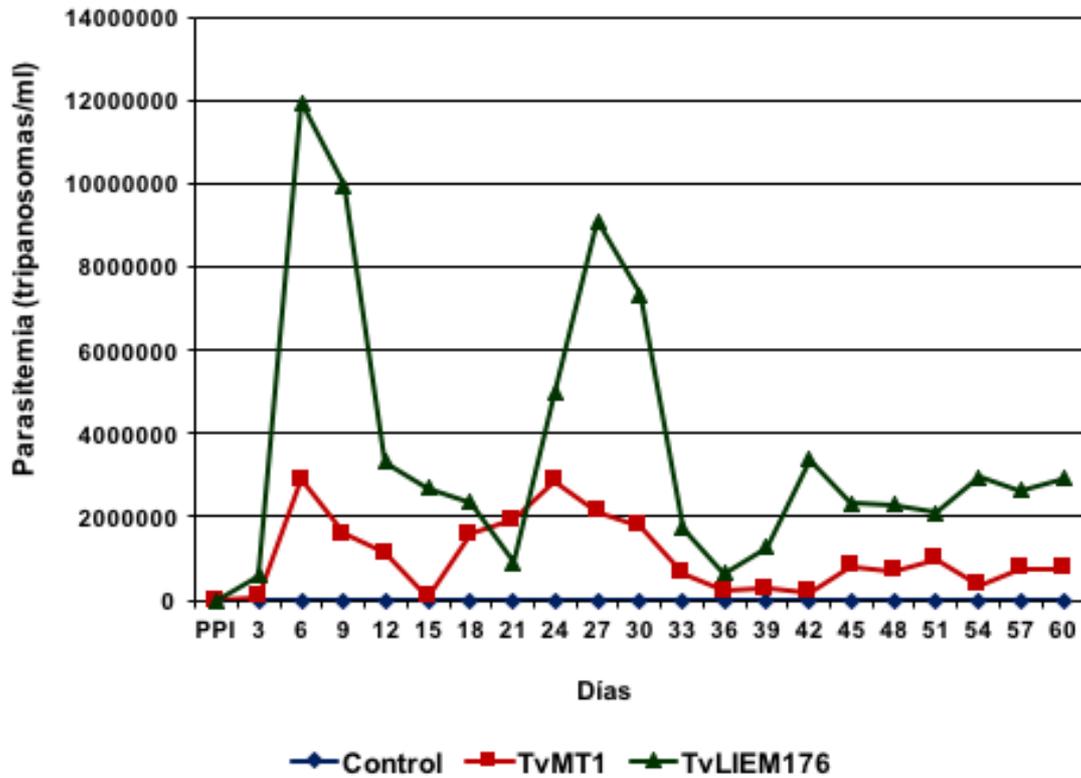


Figura 5. Valores promedios de la parasitemia (trypansomas/ml) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección

En la Figura 5 se puede observar además que durante todo el ensayo, con excepción de los días 21, 33, 36 y 39 PI, la parasitemia de este aislado siempre estuvo por encima de 2×10^6 trip/ml. También es importante resaltar que los dos primeros picos de parasitemia de estos animales (grupo TvLIEM176) coincidieron perfectamente con los picos de hipertermia de los mismos, tal como se muestra en la Figura 6.

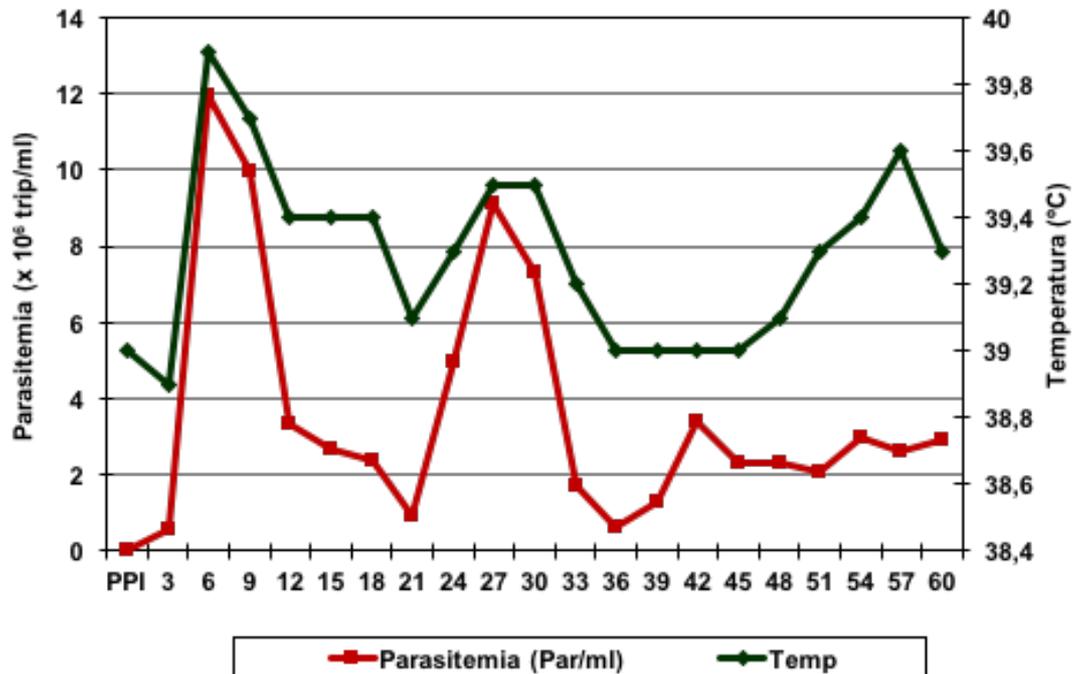


Figura 6. Comparación de los valores promedio de la parasitemia (tripanosomas/ml) y temperatura corporal (°C) en los ovinos infectados con el aislado TvLIEM176 de *T. vivax*

El comportamiento de la parasitemia en los ovinos inoculados con el aislado TvMT1 fue similar en cuanto a que se presentaron tres picos de parasitemia, aunque con valores diferentes a los del otro grupo experimental. El primer pico de parasitemia se presentó, al igual que para el grupo TvLIEM176, el día 6 PI, presentando un valor promedio de $2,9 \times 10^6$ trip/ml; mientras que el segundo apareció el día 24 PI con un valor promedio similar a la primera onda de parasitemia ($2,9 \times 10^6$ trip/ml). La tercera onda parasitémica se presentó durante los días 45 al 51 PI con valores cercanos a 10^6 trip/ml; sin embargo, esta última podría ser considerada más bien una meseta por lo bajo de su valor y por su prolongada duración (aproximadamente 6 días), Figura 5.

Sin embargo, dentro de este grupo (TvMT1) se obtuvieron algunos valores de parasitemia superiores al promedio mencionado acá. Por ejemplo, el día 6 PI, uno de los animales presentó una parasitemia de $4,4 \times 10^6$ sin volver mostrar elevaciones similares durante el estudio; otro animal mostró sus mayores niveles de parásitos en sangre los días 24 y 27 PI con $5,4 \times 10^6$ y $6,35 \times 10^6$ trip/ml, respectivamente.

En la Figura 7 se puede observar de una manera gráfica cómo coinciden las ondas parasitémicas con las elevaciones de la temperatura corporal de los animales inoculados con el aislado TvMT1.

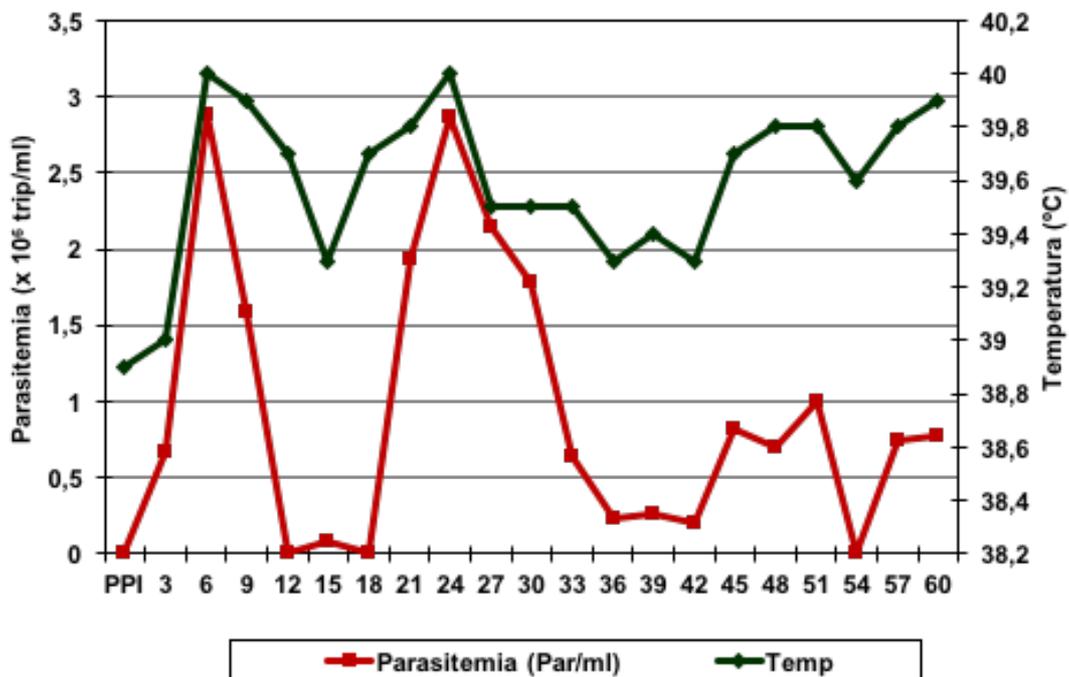


Figura 7. Comparación de los valores promedio de la parasitemia (tripanosomas/ml) y temperatura corporal (°C) en los ovinos infectados con el aislado TvMT1 de *T. vivax*

El análisis de varianza reveló que en líneas generales, las parasitemias individuales mostradas por los animales del grupo inoculado con el aislado TvLIEM176 fueron estadísticamente superiores ($P < 0,05$) durante todo el periodo experimental que las registradas por los animales del grupo TvMT1. También se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los días PI, siendo la primera onda parasitémica, en cada aislado, donde se observaron mayor cantidad de hemoflagelados.

La prueba de comparación de medias se muestra en la Tabla 10, donde se indica que el aislado TvLIEM176 produjo las mayores ondas promedio de parasitemias, comparado con el aislado TvMT1.

Tabla 10. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable parasitemia (tripanosomas/ml)

Grupo	Promedio
TvMT1	$1,1 \times 10^6 \pm 9,7 \times 10^5$ a
TvLIEM176	$3,9 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$ b

a, b: Valores con letras diferentes, difieren significativamente ($P < 0,05$)

4.1.2.2.- Hematocrito

Los niveles de hematocrito en todos los animales durante la fase de preinfección se mantuvieron entre 27 a 45%, valores considerados como fisiológicos para la especie por Byers y Kramer (2010).

De esta manera, en la Tabla 11 puede observarse que el grupo control presentó un promedio preinfección de 32,6 %; el grupo inoculado con TvMT1 de 31,7 % y los infectados con TvLIEM176 de 31,5 %; sin detectarse diferencias

estadísticamente significativas entre los tres grupos durante este periodo. Además, durante todo el periodo de evaluación, los animales controles mantuvieron valores dentro de la normalidad, es decir, sin presentar anemia.

Tabla 11. Variación de hematocrito (%) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección

Días	Grupo		
	Control Promedio \pm DS	TvMT1 Promedio \pm DS	TvLIEM Promedio \pm DS
PPI	32,6 \pm 2,5a	31,7 \pm 0,4a	31,5 \pm 1,3a
3	32,3 \pm 1,2a	25,7 \pm 2,1b	29,7 \pm 1,5c
6	31,7 \pm 2,3a	20,0 \pm 1,2b	27,3 \pm 2,3c
9	31,3 \pm 2,1a	15,3 \pm 1,2b	26,0 \pm 3,5c
12	31,0 \pm 1,0a	14,7 \pm 2,5b	25,0 \pm 2,0c
15	28,0 \pm 2,3a	15,3 \pm 1,2b	26,0 \pm 1,0a
18	31,3 \pm 2,3a	15,3 \pm 1,5b	22,7 \pm 1,2c
21	31,7 \pm 1,5a	12,3 \pm 3,1b	21,0 \pm 1,0c
24	32,3 \pm 2,9a	11,7 \pm 2,5b	21,7 \pm 0,6c
27	31,3 \pm 1,2a	11,3 \pm 0,6b	23,0 \pm 1,0c
30	31,3 \pm 1,5a	11,7 \pm 2,5b	20,3 \pm 0,6c
33	32,0 \pm 2,0a	11,3 \pm 0,6b	19,7 \pm 0,6c
36	31,0 \pm 3,6a	10,7 \pm 1,5b	19,3 \pm 0,6c
39	31,3 \pm 2,1a	11,3 \pm 2,5b	18,3 \pm 1,5c
42	29,0 \pm 1,0a	12,0 \pm 2,0b	19,0 \pm 1,0c
45	29,0 \pm 3,0a	11,3 \pm 1,2b	20,3 \pm 2,3c
48	31,7 \pm 1,2a	10,7 \pm 1,5b	20,0 \pm 1,0c
51	31,3 \pm 1,5a	10,0 \pm 1,7b	19,0 \pm 1,0c
54	32,0 \pm 1,7a	11,3 \pm 0,6b	18,3 \pm 1,2c
57	29,7 \pm 3,2a	12,0 \pm 0,0b	18,7 \pm 2,5c
60	30,7 \pm 2,1a	12,3 \pm 1,5b	18,0 \pm 2,0c

PPI: Período preinfección

DS: Desviación estándar

a, b, c: Valores de la misma fila con letras diferentes, difieren significativamente ($P < 0,05$)

Luego de la inoculación de los animales con el aislado TvMT1, los cambios en el hematocrito se produjeron de manera muy evidente, pudiéndose observar que para el día 6 PI, uno de los animales de este grupo ya presentaba un valor por debajo del 20 %. En la Figura 8 se muestra que durante las semanas 2 a 5 PI el

valor promedio del hematocrito de estos animales siguió disminuyendo progresivamente hasta alcanzar su punto mínimo el día 36 PI con un promedio de 10,7 %. Luego de esta fase, los animales mostraron una ligera recuperación con algunas oscilaciones aunque continuaron con un cuadro anémico severo hasta el final del periodo experimental, reflejando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) tanto con el grupo inoculado con el aislado TvLIEM176, como con el grupo control durante toda la fase de infección. Este aislado resultó ser el más anemizante por sus efectos de disminución acentuada en los porcentajes de esta variable hematológica cuando se comparó con el aislado TvLIEM176.

En el caso del grupo de animales infectado con el aislado TvLIEM176, a medida que avanzó la infección, comenzó un descenso paulatino del hematocrito. El día 9 PI solamente un animal presentó anemia (22 %), mientras que los otros dos animales presentaron valores dentro de los niveles de normalidad. Posteriormente, el hematocrito de todos los animales siguió disminuyendo hasta alcanzar el punto más bajo el día 39 PI (18,3 %), a partir del cual se observó la tendencia a recuperarse gradualmente pero manteniéndose por debajo (18 - 20 %) de los valores mínimos referenciales para la especie ovina, Figura 8.

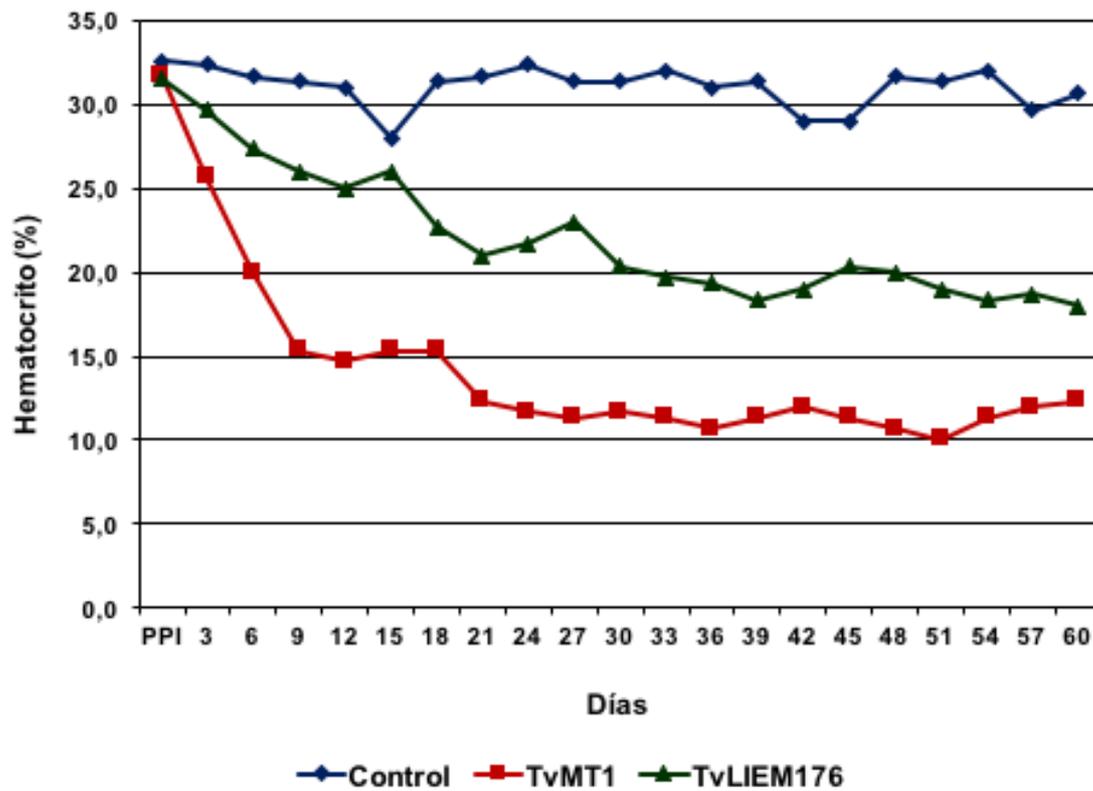


Figura 8. Valores promedio del hematocrito (%) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección

El análisis de varianza demostró que el hematocrito evidenció una significativa disminución en todos los ovinos infectados con ambos aislados de *T. vivax*, con respecto al grupo control, resultando estas diferencias altamente significativas ($P < 0,0001$). El comportamiento de esta variable durante el experimento reveló que los valores promedio del hematocrito sufrieron unas diferencias considerablemente significativas ($P < 0,0001$) a medida que avanzaba la enfermedad, obteniéndose los mayores porcentajes de disminución entre la 5ta y la 6ta semana PI.

La prueba de comparación de medias reveló para los porcentajes de hematocrito diferencias muy significativas ($P < 0,0001$) entre los ovinos inoculados con el aislado TvMT1, los infectados con el aislado TvLIEM176 y los animales del grupo control, Tabla 12.

Tabla 12. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable hematocrito (%)

Grupo	Promedio
Control	31,2 ± 0,6a
TvMT1	16,4 ± 0,6b
TvLIEM176	23,3 ± 0,6c

a, b, c: Valores con letras diferentes, difieren significativamente ($P < 0,05$)

4.1.2.3.- Hemoglobina

En la Tabla 13 se observan los valores de hemoglobina para los tres grupos durante el periodo pre y post-infección. Allí se puede evidenciar que antes de la inoculación, los animales de grupo control presentaron un valor promedio de 11,3 gr/dl, al igual que los animales de grupo inoculado con el aislado TvMT1; mientras que los animales del grupo TvLIEM176 obtuvieron un valor promedio de 10,8 gr/dl. Todos estos valores estaban dentro del rango fisiológico para la especie ovina (9 a 15 gr/dl) según lo considerado por Byers y Kramer (2010).

Tabla 13. Variación de la hemoglobina (gr/dl) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección

Días	Grupo		
	Control Promedio \pm DS	TvMT1 Promedio \pm DS	TvLIEM Promedio \pm DS
PPI	11,3 \pm 0,5a	11,3 \pm 0,2a	10,8 \pm 0,3a
3	11,2 \pm 0,3a	8,9 \pm 0,6b	10,5 \pm 0,5c
6	10,8 \pm 0,7a	7,8 \pm 0,6b	10,1 \pm 0,7c
9	10,8 \pm 0,8a	6,1 \pm 0,3b	9,4 \pm 1,1c
12	11,0 \pm 0,1a	5,7 \pm 0,2b	9,1 \pm 0,7c
15	10,7 \pm 0,9a	5,4 \pm 0,2b	8,9 \pm 0,5c
18	11,1 \pm 0,3a	5,2 \pm 0,2b	8,3 \pm 0,2c
21	10,7 \pm 0,6a	4,9 \pm 0,1b	7,9 \pm 0,1c
24	11,2 \pm 0,7a	4,8 \pm 0,2b	7,4 \pm 0,2c
27	11,0 \pm 0,2a	4,7 \pm 0,5b	7,6 \pm 0,2c
30	11,1 \pm 0,2a	4,7 \pm 0,4b	7,1 \pm 0,1c
33	11,0 \pm 0,2a	4,7 \pm 0,3b	7,1 \pm 0,1c
36	11,1 \pm 0,2a	4,6 \pm 0,4b	7,0 \pm 0,3c
39	11,1 \pm 0,1a	4,5 \pm 0,1b	6,6 \pm 0,4c
42	10,8 \pm 0,6a	4,6 \pm 0,2b	6,8 \pm 0,4c
45	10,6 \pm 1,0a	4,4 \pm 0,1b	7,0 \pm 0,2c
48	11,0 \pm 0,1a	4,4 \pm 0,1b	6,9 \pm 0,3c
51	11,0 \pm 0,1a	4,4 \pm 0,1b	7,0 \pm 0,1c
54	11,0 \pm 0,2a	4,4 \pm 0,1b	6,9 \pm 0,1c
57	10,5 \pm 1,0a	4,4 \pm 0,1b	6,5 \pm 0,6c
60	11,1 \pm 0,3a	4,5 \pm 0,1b	6,3 \pm 0,8c

PPI: Período preinfección

DS: Desviación estándar

a, b, c: Valores de la misma fila con letras diferentes, difieren significativamente ($P < 0,05$)

Luego de la inoculación con el aislado TvMT1, los niveles de concentración de hemoglobina descendieron drásticamente, y ya para el día 3 PI se encontraban por debajo de los niveles fisiológicos (8,9 gr/dl). Este descenso marcado de la hemoglobina continuó durante los 60 días de la fase post-infección llegando a niveles críticos (entre 4,4 y 4,6 gr/dl) hacia el final de esta fase del experimento, Figura 9. El análisis estadístico permitió observar diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) entre los valores de hemoglobina de este grupo cuando

se comparó con los niveles del grupo inoculado con el aislado TvLIEM176 y con el grupo control.

De igual manera, en los animales inoculados con el aislado TvLIEM176, la hemoglobina comenzó a descender luego de la infección. Sin embargo, esta disminución fue menos drástica y más paulatina que en el caso de los animales inoculados con el aislado TvMT1. En la Tabla 13 y en la Figura 9 se muestra cómo hasta el día 12 PI los niveles de hemoglobina se encontraron dentro de los parámetros fisiológicos. A partir de este día, este valor siguió descendiendo hasta el final del experimento, cuando llegó a su nivel más bajo (6,3 gr/dl). Durante todo el experimento se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) con el grupo control y con el otro grupo experimental.

El análisis de varianza para la hemoglobina reveló que durante la infección experimental, los aislados de *T. vivax* resultaron altamente significativos ($P < 0,0001$) sobre los niveles de esta variable. Además, la prueba de comparación múltiple de medias demostró que existieron diferencias estadísticas entre los valores promedio de la hemoglobina, Tabla 14.

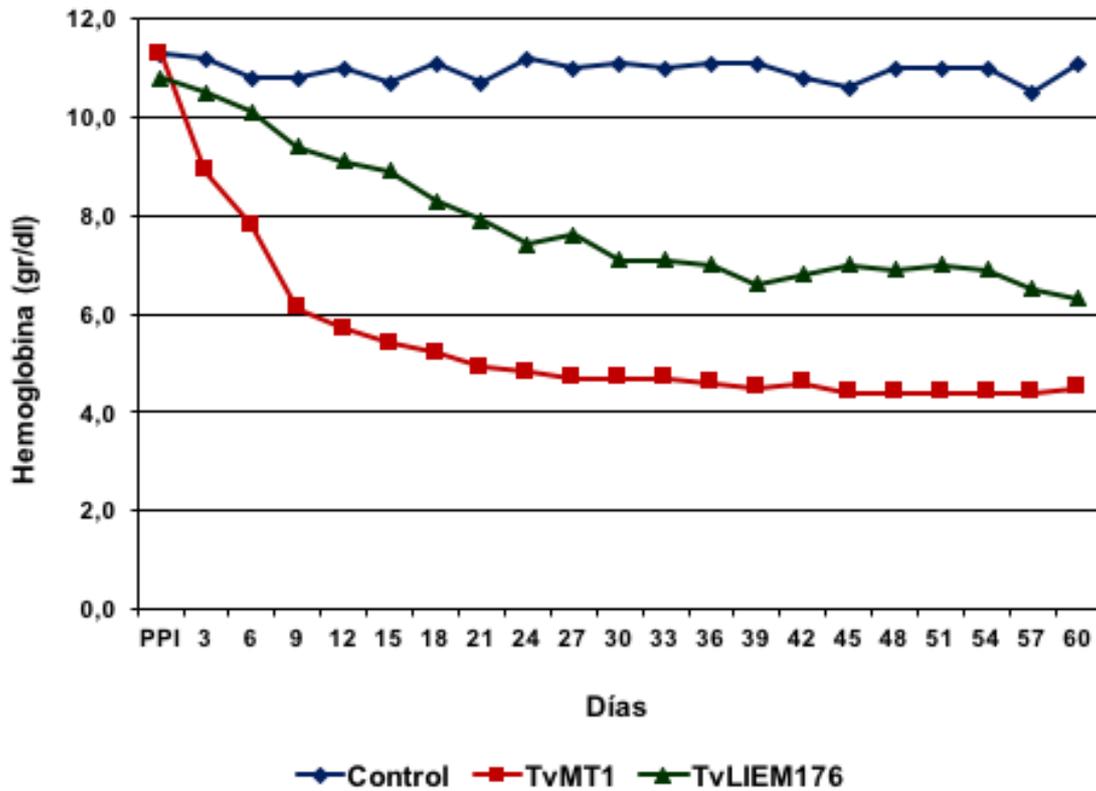


Figura 9. Valores promedios de la hemoglobina (gr/dl) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección

Tabla 14. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable hemoglobina (gr/dl)

Grupo	Promedio
Control	11,0 ± 0,07a
TvMT1	6,2 ± 0,07b
TvLIEM176	8,2 ± 0,07c

a, b, c: Valores con letras diferentes, difieren significativamente ($P < 0,05$)

4.1.2.4.- Número Total de Leucocitos (NTL)

Los cambios producidos en el NTL de los animales infectados y controles durante el periodo pre y post-infección se muestran en la Tabla 15 y Figura 10. Durante la fase de preinfección, el NTL osciló dentro de los intervalos de normalidad en todos los animales del estudio, el cual se considera debe estar entre 4000 y 8000

células/ μ l (Byers y Kramer, 2010). Antes de la infección, el grupo control mostró un promedio de 7000 cel/ μ l, el grupo infectado con el aislado TvTM1 7258,3 cel/ μ l y el grupo inoculado con el aislado TvLIEM176 6566,7 cel/ μ l, sin evidenciarse diferencias significativas entre los tres grupos.

Tabla 15. Variación del número total de leucocitos (cel/ μ l) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el periodo de pre y post-infección

Días	Grupo		
	Control Promedio \pm DS	TvMT1 Promedio \pm DS	TvLIEM Promedio \pm DS
PPI	7000,0 \pm 152,1a	7.258,3 \pm 848,7a	6.566,7 \pm 539,9a
3	7.016,7 \pm 208,2a	6.666,7 \pm 175,6a	6.550,0 \pm 507,4a
6	7.116,7 \pm 275,4a	6.450,0 \pm 606,2b	6.250,0 \pm 278,4b
9	7.133,3 \pm 115,5a	6.050,0 \pm 984,9b	6.033,3 \pm 160,7b
12	7.200,0 \pm 250,0a	6.133,3 \pm 568,6b	6.016,7 \pm 375,3b
15	7.400,0 \pm 500,0a	5.866,7 \pm 525,2b	5.850,0 \pm 563,5b
18	7.650,0 \pm 589,5a	5.533,3 \pm 1042,0b	5.500,0 \pm 626,5b
21	7.583,3 \pm 425,2a	4.816,7 \pm 621,2b	5.483,3 \pm 381,9c
24	7.600,0 \pm 739,9a	4.550,0 \pm 916,5b	5.516,7 \pm 425,2c
27	7.233,3 \pm 513,2a	4.833,3 \pm 1451,1b	5.250,0 \pm 444,4b
30	6.916,7 \pm 76,4a	4.533,3 \pm 846,1b	5.100,0 \pm 492,4b
33	7.016,7 \pm 388,4a	4.500,0 \pm 360,6b	5.050,0 \pm 736,5b
36	6.833,3 \pm 104,1a	4.350,0 \pm 458,3b	5.083,3 \pm 436,8c
39	7.066,7 \pm 57,7a	3.950,0 \pm 492,4b	5.066,7 \pm 251,7c
42	7.133,3 \pm 125,8a	4.383,3 \pm 529,9b	4.883,3 \pm 583,8c
45	7.033,3 \pm 208,2a	4.216,7 \pm 562,0b	4.950,0 \pm 589,5c
48	6.950,0 \pm 132,3a	4.183,3 \pm 251,7b	4.966,7 \pm 485,6c
51	7.050,0 \pm 350,0a	4.066,7 \pm 461,9b	4.866,7 \pm 251,7c
54	7.083,3 \pm 175,6a	4.200,0 \pm 264,6b	4.966,7 \pm 419,3c
57	7.016,7 \pm 208,2a	4.133,3 \pm 275,4b	4.950,0 \pm 312,2c
60	7.083,3 \pm 284,3a	4.066,7 \pm 202,1b	5.000,0 \pm 444,4c

PPI: Período preinfección

DS: Desviación estándar

a, b, c: Valores de la misma fila con letras diferentes, difieren significativamente ($P < 0,05$)

Posterior a la inoculación experimental, los animales infectados del grupo TvMT1 empezaron a mostrar una disminución del NTL, siendo ésta más acentuada hacia el día 21 PI cuando el promedio estuvo por debajo de las 5000 cel/ μ l,

manteniéndose este comportamiento hasta el día 39 PI cuando se registró el valor mínimo (3950 cel/ μ l), detectándose leucopenia en dos de los animales infectados y observándose diferencias estadísticamente significativas con el grupo infectado con el aislado TvLIEM176 durante estos días. A partir de este momento se logró una recuperación gradual del NTL hasta el final de la fase experimental.

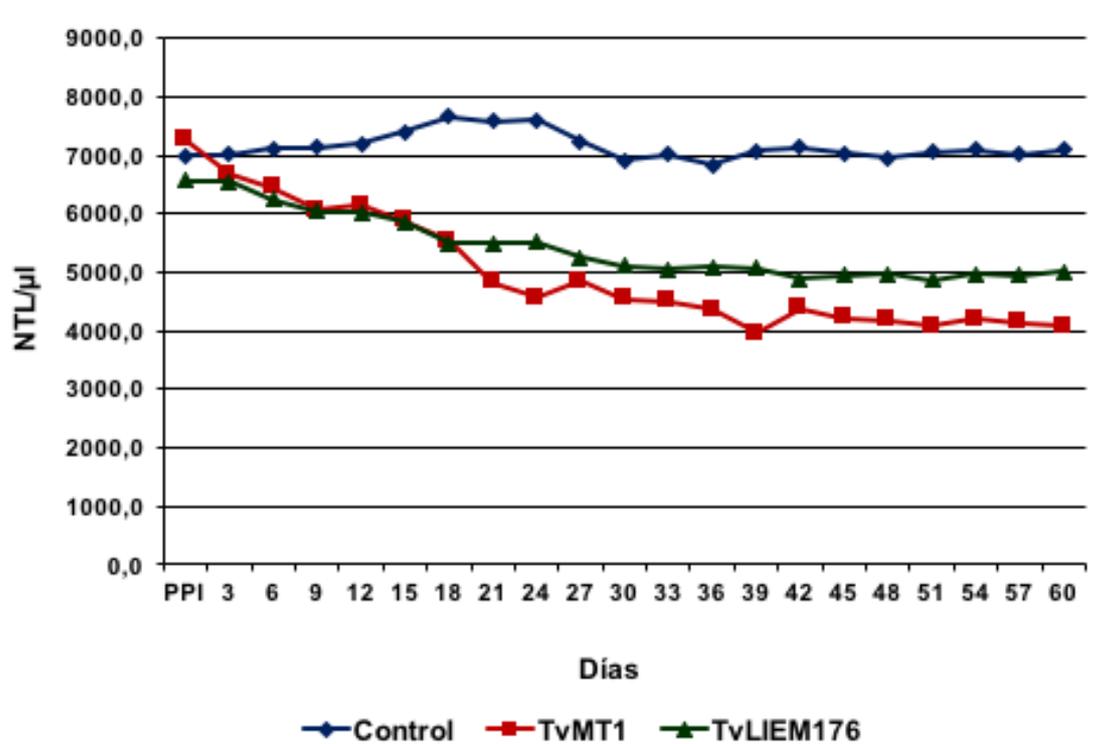


Figura 10. Valores promedios del número total de leucocitos (cel/ μ l) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección

En cuanto a los animales del aislado TvLIEM176, el NTL se mantuvo relativamente estable hasta el día 12 PI; luego de lo cual fue disminuyendo progresivamente hasta alcanzarse un promedio de 4866,7 cel/ μ l el día 51 PI y

posteriormente observarse una ligera recuperación hacia el final de la fase experimental, sin observarse leucopenia en todo este periodo.

En general, el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias permitieron determinar que la cuenta leucocitaria de los animales de ambos grupos inoculados descendió y permaneció por debajo de los valores del grupo control durante toda la fase infecciosa, observándose diferencias significativas ($P < 0,05$), Tabla 16. Sin embargo, con la sola excepción de dos animales del grupo inoculado con el aislado TvMT1 para el día 39 PI, no se observó leucopenia en los grupos experimentales, manteniéndose esta variable dentro de los parámetros considerados fisiológicos para esta especie.

Tabla 16. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable número total de leucocitos (cel/ μ l)

Grupo	Promedio
Control	7129,9 \pm 224,6a
TvMT1	5271,5 \pm 224,6b
TvLIEM176	5566,7 \pm 224,6b

a, b: Valores con letras diferentes, difieren significativamente ($P < 0,05$)

4.1.2.5.- Contaje diferencial de leucocitos

Durante todo el período que duró el experimento, el contaje de linfocitos en el grupo control permaneció siempre dentro de los valores normales, el cual se considera debe estar entre 2000 y 9000 células/ μ l, de acuerdo a Byers y Kramer (2010). Igualmente, cuando se observa la Tabla 17 y la Figura 11, se puede observar que los animales inoculados con el grupo TvMT1 presentaron una disminución progresiva en el contaje de linfocitos, llegando casi hasta el límite inferior al final de los 60 días de experimento, pero manteniéndose siempre

dentro de los valores fisiológicos. Sin embargo, no pasa lo mismo con los animales infectados con el aislado TvLIEM176. Estos animales, inmediatamente después de la infección experimental reflejaron una disminución marcada en el número de linfocitos, llegando a presentar una linfopenia a partir del día 12 PI, la cual se mantuvo hasta el día 36 PI. A partir de este día, se notó una tendencia a la normalización del número total de linfocitos, el cual se fue restituyendo lentamente hasta el final del experimento.

Tabla 17. Variación del número total de linfocitos (cel/ μ l) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección

Días	Grupo		
	Control Promedio	TvMT1 Promedio	TvLIEM Promedio
PPI	2940,0	4064,7	3480,3
3	3859,2	2866,7	2620,0
6	3416,0	4450,5	2500,0
9	3138,7	4961,0	2111,7
12	3600,0	4109,3	1925,3
15	3626,0	3813,3	1813,5
18	4054,5	2656,0	1650,0
21	4246,7	2215,7	1699,8
24	3496,0	2184,0	1655,0
27	3689,0	2465,0	1522,5
30	3873,3	2266,7	1581,0
33	3718,8	2340,0	1767,5
36	3416,7	2088,0	1982,5
39	3392,0	2054,0	2026,7
42	3994,7	2191,7	2099,8
45	4079,3	2150,5	2029,5
48	3822,5	2049,8	2135,7
51	4089,0	2033,3	2238,7
54	3825,0	2352,0	2582,7
57	3648,7	2273,3	2524,5
60	3683,3	2236,7	2650,0

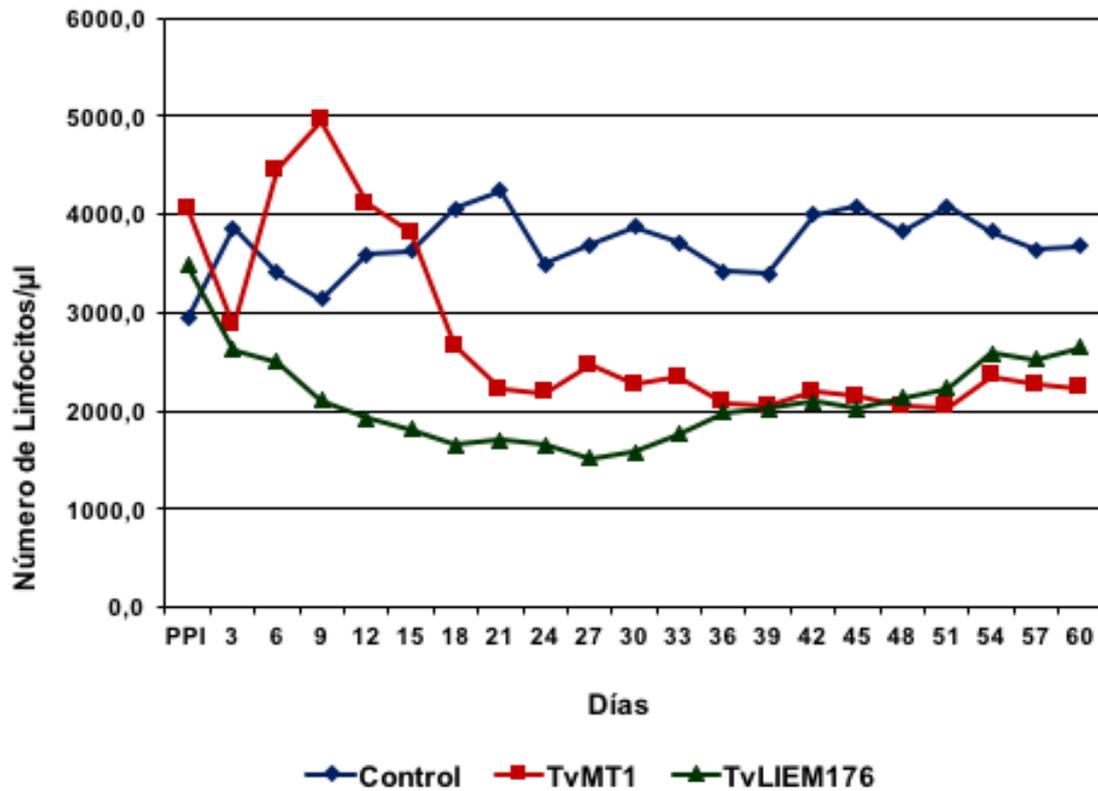


Figura 11. Valores promedio del número total de linfocitos (cel/μl) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el periodo pre y post-infección

En cuanto al número de neutrófilos segmentados, monocitos y eosinófilos, en las Tablas 18, 19 y 20 y en las Figuras 12, 13 y 14 se puede ver que estas células sufrieron variaciones durante todo el periodo que duró el experimento, pero siempre se mantuvieron dentro de los parámetros considerados fisiológicos para la especie ovina (Neutrófilos segmentados: 700 a 6000 cel/μl, monocitos: 0 a 750 cel/μl, y eosinófilos: 0 a 1000 cel/μl) según Byers y Kramer (2010). Es importante mencionar que en ninguno de los animales evaluados se encontraron basófilos o neutrófilos en banda durante toda la fase de experimentación.

Tabla 18. Variación del número total de neutrófilos segmentados (cel/ μ l) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección

Días	Grupo		
	Control Promedio	TvMT1 Promedio	TvLIEM Promedio
PPI	3360,0	2685,6	2429,7
3	2736,5	3066,7	3078,5
6	3273,7	1483,5	2937,5
9	3495,3	847,0	2775,3
12	3312,0	1349,3	2827,8
15	3552,0	1290,7	3042,0
18	3442,5	2213,3	2860,0
21	3185,0	2119,3	2796,5
24	3648,0	1956,5	2923,8
27	3399,7	2126,7	2677,5
30	2835,8	2040,0	2499,0
33	2947,0	1890,0	2525,0
36	3075,0	1957,5	2592,5
39	3321,3	1738,0	2432,0
42	2996,0	1928,7	2148,7
45	2743,0	1813,2	2326,5
48	2849,5	2008,0	2235,0
51	2538,0	1789,3	2092,7
54	2904,2	1554,0	1837,7
57	3017,2	1612,0	1831,5
60	2975,0	1626,7	1750,0

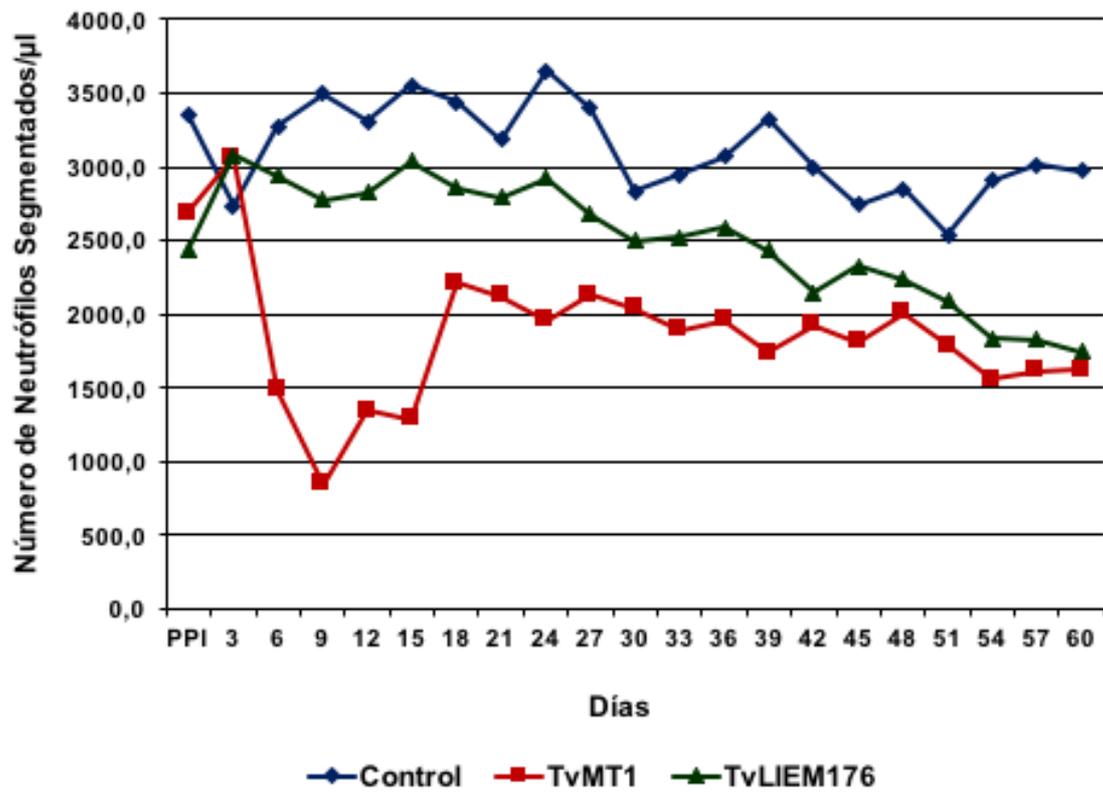


Figura 12. Valores promedios del número total de neutrófilos segmentados (cel/μl) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección

Tabla 19. Variación del número total de monocitos (cel/ μ l) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección

Días	Grupo		
	Control Promedio	TvMT1 Promedio	TvLIEM Promedio
PPI	490,0	435,5	591,0
3	421,0	533,3	655,0
6	427,0	451,5	687,5
9	428,0	242,0	784,3
12	288,0	613,3	722,0
15	222,0	704,0	585,0
18	153,0	553,3	660,0
21	151,7	385,3	658,0
24	304,0	318,5	496,5
27	72,3	193,3	682,5
30	207,5	181,3	612,0
33	350,8	180,0	454,5
36	341,7	261,0	355,8
39	282,7	79,0	456,0
42	142,7	175,3	537,2
45	70,3	168,7	495,0
48	208,5	83,7	447,0
51	282,0	162,7	486,7
54	212,5	210,0	496,7
57	280,7	206,7	445,5
60	354,2	162,7	450,0

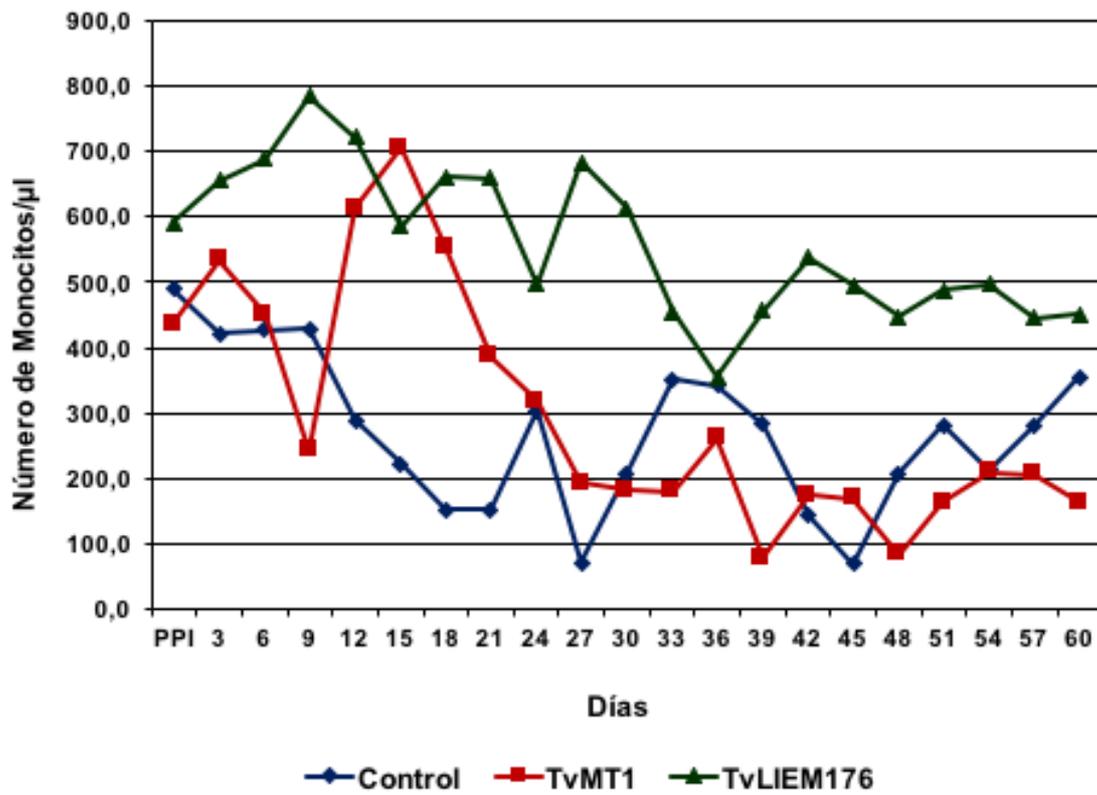


Figura 13. Valores promedios del número total de monocitos (cel/μl) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección

Tabla 20. Variación del número total de eosinófilos (cel/ μ l) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección

Dia	Grupo		
	Control Promedio	TvMT1 Promedio	TvLIEM Promedio
PPI	210,0	72,6	65,7
3	0,0	200,0	196,5
6	0,0	64,5	125,0
9	71,3	0,0	362,0
12	0,0	61,3	541,5
15	0,0	58,7	409,5
18	0,0	110,7	330,0
21	0,0	96,3	329,0
24	152,0	91,0	441,3
27	72,3	48,3	367,5
30	0,0	45,3	408,0
33	0,0	90,0	303,0
36	0,0	43,5	152,5
39	70,7	79,0	152,0
42	0,0	87,7	97,7
45	140,7	84,3	99,0
48	69,5	41,8	149,0
51	141,0	81,3	48,7
54	141,7	84,0	49,7
57	70,2	41,3	148,5
60	70,8	40,7	150,0

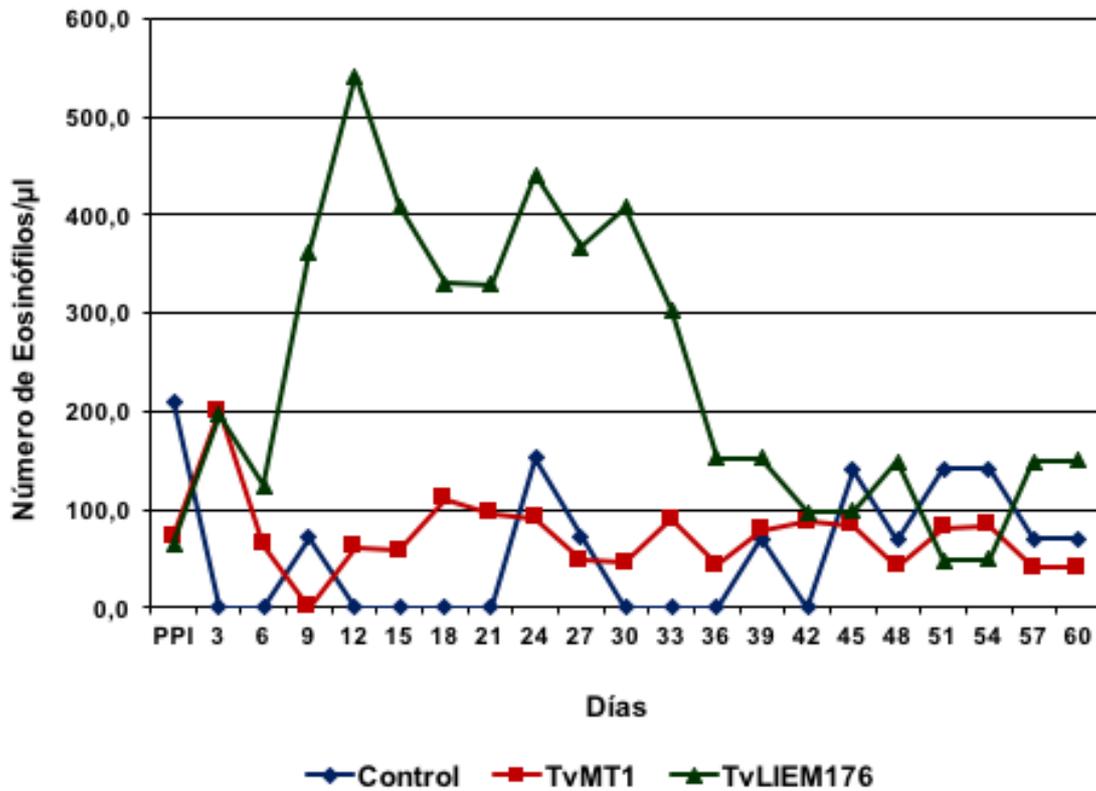


Figura 14. Valores promedios del número total de eosinófilos (cel/μl) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección

4.1.2.6- Proteínas Totales (PT)

Los valores de PT previos a la infección en todos los animales estuvieron dentro del rango de 6,0 a 7,5 gr/dl, el cual se considera como fisiológico para los ovinos (Byers y Kramer, 2010). En este caso, el grupo control presentó un promedio de 6,5 gr/dl; mientras que el valor mostrado por grupo TvMT1 fue de 6,4 gr/dl; y de 6,6 gr/dl para el grupo TvLIEM176, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos.

Posterior a la infección, las PT mostraron una serie de variaciones que se muestran en la Tabla 21 y en la Figura 15. En los ovinos inoculados con el aislado TvLIEM176 se observó una ligera disminución en la concentración de las PT detectándose su valor mínimo los días 27 a 33 PI, cuando se determinó un promedio de 5,1 gr/dl, estando por debajo del rango señalado como normal para esta especie (6,0-7,5 gr/dl). A partir de este momento los valores de PT mostraron una ligera remontada hasta el final de la infección, logrando casi alcanzar los valores normales nuevamente (5,9 gr/dl).

Tabla 21. Variación de las proteínas totales (gr/dl) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección

Días	Grupo		
	Control Promedio \pm DS	TvMT1 Promedio \pm DS	TvLIEM Promedio \pm DS
PPI	6,5 \pm 0,3a	6,4 \pm 0,2a	6,2 \pm 0,2
3	6,2 \pm 0,2a	6,3 \pm 0,5a	6,2 \pm 0,2a
6	6,3 \pm 0,2a	5,7 \pm 0,3b	6,1 \pm 0,2ab
9	6,4 \pm 0,4a	5,9 \pm 0,1b	6,1 \pm 0,1ab
12	6,3 \pm 0,1a	5,7 \pm 0,4b	5,7 \pm 0,3b
15	6,1 \pm 0,5a	5,3 \pm 0,1b	5,7 \pm 0,2b
18	5,7 \pm 0,3a	5,4 \pm 0,3a	5,7 \pm 0,4a
21	5,5 \pm 0,4a	5,3 \pm 0,4a	5,4 \pm 0,5a
24	5,7 \pm 0,2a	5,2 \pm 0,3b	5,5 \pm 0,3a
27	5,9 \pm 0,3a	5,1 \pm 0,1b	5,1 \pm 0,2b
30	6,4 \pm 0,3a	5,5 \pm 0,3b	5,2 \pm 0,5b
33	6,5 \pm 0,3a	5,5 \pm 0,3b	5,1 \pm 0,1b
36	6,3 \pm 0,5a	5,4 \pm 0,2b	5,2 \pm 0,2b
39	6,4 \pm 0,3a	5,3 \pm 0,2b	5,2 \pm 0,2b
42	6,2 \pm 0,0a	5,1 \pm 0,8b	5,3 \pm 0,3b
45	6,2 \pm 0,0a	4,8 \pm 0,3b	5,4 \pm 0,2c
48	6,4 \pm 0,2a	4,9 \pm 0,5b	5,5 \pm 0,3c
51	6,5 \pm 0,3a	5,4 \pm 0,0b	5,5 \pm 0,4b
54	6,3 \pm 0,5a	4,7 \pm 0,3b	5,7 \pm 0,3c
57	6,4 \pm 0,3a	4,6 \pm 0,4b	5,8 \pm 0,4c
60	6,2 \pm 0,0a	4,7 \pm 0,3b	5,9 \pm 0,2c

PPI: Período preinfección

DS: Desviación estándar

a, b, c: Valores de la misma fila con letras diferentes, difieren significativamente ($P < 0,05$)

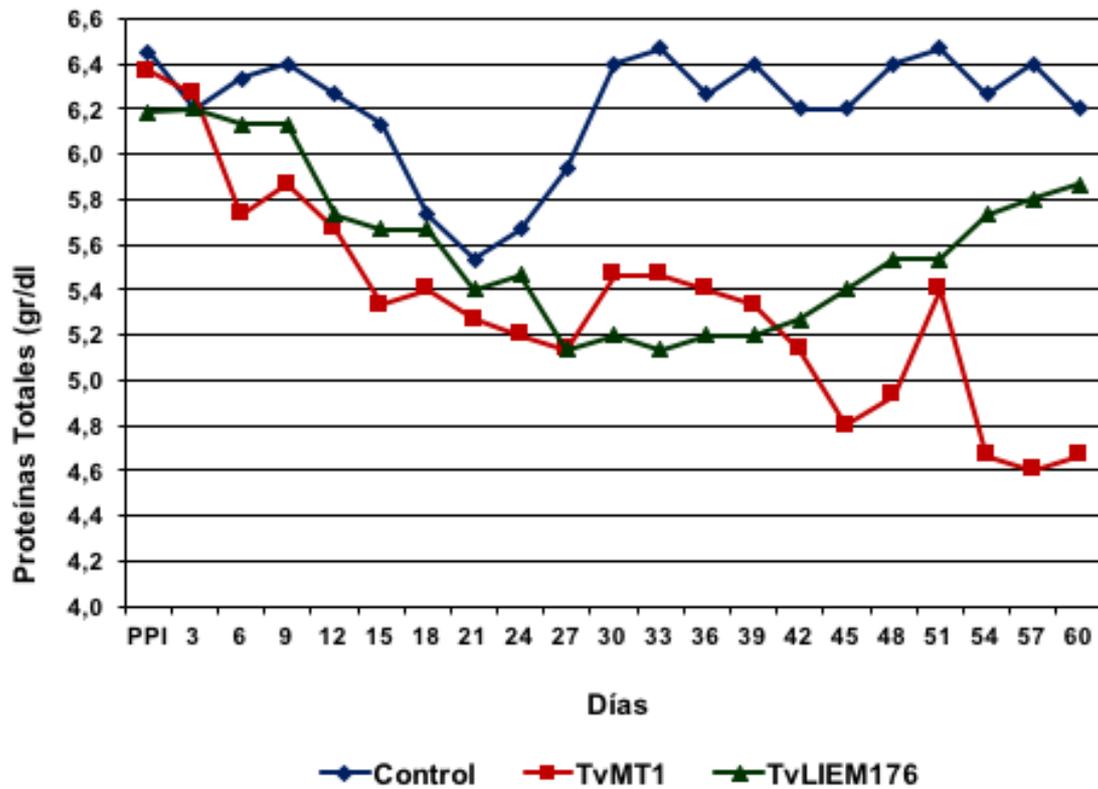


Figura 15. Valores promedio de las proteínas totales (gr/dl) en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección

Por otra parte, en los animales infectados con el aislado TvMT1 se observó una disminución más rápida en la concentración de las PT, siendo el promedio para el día 6 PI de 5,7 gr/dl, lo cual está por debajo del rango normal, considerándose como una hipoproteïnemia. En este grupo experimental, los valores de PT continuaron bajando progresivamente durante la infección observándose diferencias significativas a partir del día 45 PI con el grupo inoculado con el aislado TvLIEM176, finalizando la fase experimental con un promedio de PT de 4,7 gr/dl.

También es importante mencionar que durante el experimento, los animales del grupo control evidenciaron un corto periodo de hipoproteinemia, detectándose valores promedios los días 18, 21 y 24 PI de 5,7, 5,5 y 5,7 gr/dl, respectivamente.

El análisis de varianza demostró que las proteínas totales sufrieron una disminución en los ovinos infectados con ambos aislados de *T. vivax*, principalmente a partir del día 12 PI, cuando se comparó con el grupo control, resultando ser significativas estas diferencias ($P < 0,05$). El comportamiento de esta variable durante el experimento reveló que los valores promedio de las proteínas totales sufrieron unas diferencias considerablemente significativas ($P < 0,0001$) a medida que avanzaba la enfermedad, obteniéndose los menores valores a partir de la 5ta semana PI.

La prueba de comparación de medias reveló diferencias significativas ($P < 0,05$) para los promedios de proteínas totales entre los animales infectados y los del grupo control; sin embargo, no se observaron diferencias entre los promedios de ambos grupos inoculados, Tabla 22.

Tabla 22. Prueba de comparación múltiple de medias en la variable proteínas totales (gr/dl)

Grupo	Promedio
Control	6,23 ± 0,1a
TvMT1	5,46 ± 0,1b
TvLIEM176	5,67 ± 0,1b

a, b: Valores con letras diferentes, difieren significativamente ($P < 0,05$)

4.1.3 Estudio histopatológico

Circunstancias ajenas a la voluntad del investigador no permitieron que se realizara el estudio histopatológico de los animales experimentales. Luego de

tres meses de enviadas las muestras para el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Policlínica Veterinaria de la Universidad del Zulia, de allí informaron que las mismas se habían perdido y solamente se habían encontrado los órganos correspondientes a dos animales del grupo control.

4.1.4.- Evaluación serológica

4.1.4.1.- Anticuerpos anti *T. vivax*

Al realizar la estandarización de la técnica de ELISA para detectar los niveles de anticuerpos anti *T. vivax* en los animales estudiados, se obtuvo un punto de corte correspondiente a una densidad óptica (DO_{405}) de 0,217, lo que indica que cualquier DO_{405} superior a este valor corresponde a un animal positivo. En la Tabla 23 y Figura 16 se puede observar que previo a la inoculación todos los animales presentaron valores de DO_{405} por debajo del punto de corte, es decir, no presentaban anticuerpos contra *T. vivax*. De la misma manera los ovinos del grupo control permanecieron por debajo del punto de corte durante los 60 días del ensayo.

Tabla 23. Variación de la densidad óptica (DO₄₀₅) a través de la técnica de ELISA en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período de pre y post-infección

Días	Grupo		
	Control Promedio ± DS	TvMT1 Promedio ± DS	TvLIEM Promedio ± DS
PPI	0,066 ± 0,02a	0,081 ± 0,01a	0,072 ± 0,02a
3	0,071 ± 0,02a	0,112 ± 0,04b	0,150 ± 0,01b
6	0,080 ± 0,04a	0,163 ± 0,02b	0,187 ± 0,08b
9	0,093 ± 0,05a	0,164 ± 0,01b	0,173 ± 0,06b
12	0,092 ± 0,03a	0,168 ± 0,03b	0,198 ± 0,05b
15	0,086 ± 0,01a	0,234 ± 0,02b	0,189 ± 0,02c
18	0,080 ± 0,04a	0,257 ± 0,06b	0,220 ± 0,03c
21	0,079 ± 0,01a	0,251 ± 0,05b	0,194 ± 0,03c
24	0,070 ± 0,01a	0,299 ± 0,01b	0,232 ± 0,01c
27	0,066 ± 0,01a	0,263 ± 0,00b	0,221 ± 0,03c
30	0,092 ± 0,01a	0,293 ± 0,05b	0,189 ± 0,01c
33	0,074 ± 0,01a	0,304 ± 0,02b	0,239 ± 0,01c
36	0,121 ± 0,01a	0,255 ± 0,01b	0,282 ± 0,02b
39	0,101 ± 0,01a	0,293 ± 0,02b	0,262 ± 0,02c
42	0,096 ± 0,01a	0,293 ± 0,03b	0,213 ± 0,01c
45	0,098 ± 0,03a	0,256 ± 0,00b	0,231 ± 0,01b
48	0,096 ± 0,01a	0,312 ± 0,03b	0,258 ± 0,01c
51	0,083 ± 0,02a	0,269 ± 0,03b	0,262 ± 0,01b
54	0,101 ± 0,01a	0,292 ± 0,01b	0,250 ± 0,01c
57	0,086 ± 0,02a	0,288 ± 0,01b	0,241 ± 0,01c
60	0,103 ± 0,02a	0,305 ± 0,01b	0,277 ± 0,03b

PPI: Período preinfección

DS: Desviación estándar

a, b, c: Valores de la misma fila con letras diferentes, difieren significativamente (P<0,05)

En cuanto a los animales infectados con el aislado TvMT1, los valores de DO₄₀₅ comenzaron a aumentar de manera progresiva luego de la infección, cruzándose el punto de corte a partir del día 15 PI (DO₄₀₅ promedio de 0,234). Posteriormente, la DO₄₀₅ en este grupo experimental se mantuvo siempre por encima del punto de corte, además de presentarse valores superiores a los niveles de DO₄₀₅ del grupo inoculado con el aislado TvLIEM176.

Por su parte, una vez realizada la infección experimental con el aislado TvLIEM176, se pudo detectar que el punto de corte se cruzó el día 18 PI, obteniéndose un valor promedio de DO_{405} de 0,220. Durante el resto del ensayo los valores promedio de DO_{405} para el aislado TvLIEM176 estuvieron por encima del punto de corte excepto los días 21, 30 y 42, Figura 16, pero en general, los valores de $DO_{(405)}$ fueron significativamente menores ($P < 0,001$) durante el resto del período de infección, comparados con los animales del grupo TvMT1.

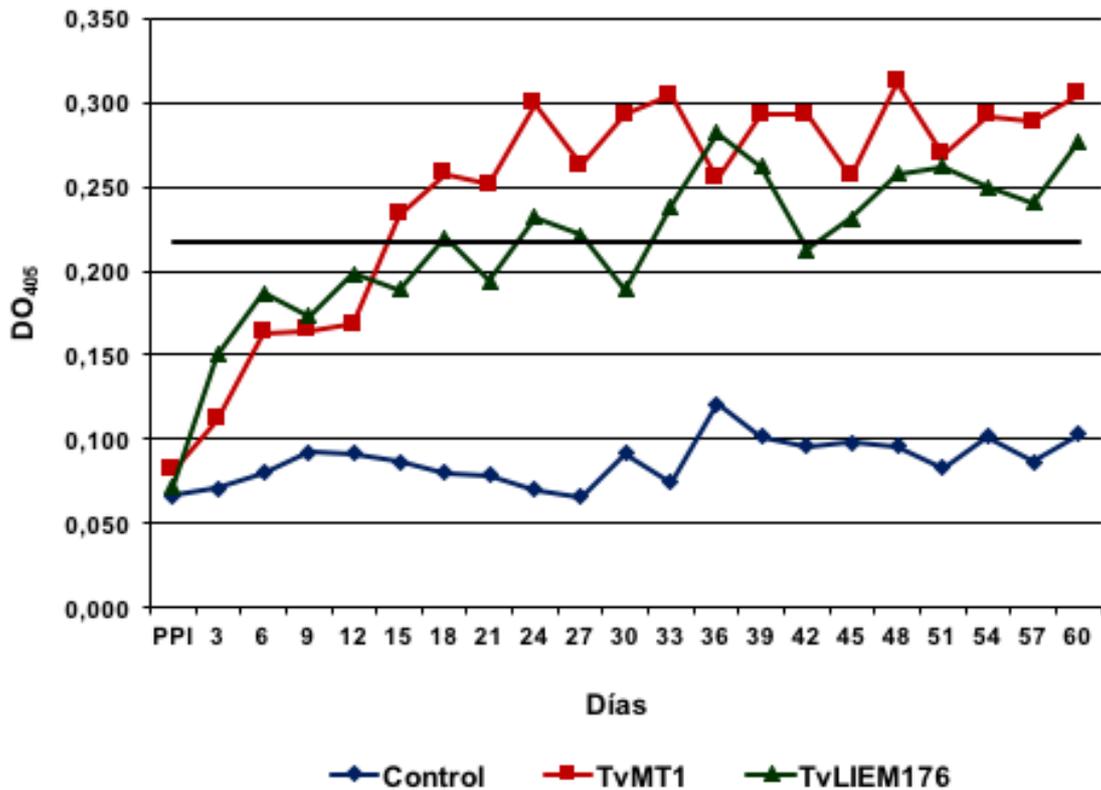


Figura 16. Variación de la densidad óptica (DO_{405}) a través de la técnica de ELISA en ovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176) y el grupo control, durante el período pre y post-infección

En las Figuras 17 y 18 se expone de manera gráfica la relación entre los niveles de parasitemia y niveles de DO_{405} correspondientes a ambos grupos experimentales (TvLIEM176 y TvMT1). Allí se puede ver que tal como se mostró en la sección 4.1.2.1.-, los animales inoculados con el aislado TvLIEM176 tuvieron mayores niveles de parasitemia con respecto al grupo infectado con TvMT1; sin embargo, los mayores valores de DO_{405} correspondieron al aislado TvTM1. Es decir, que este aislado (TvMT1) a pesar de producir menores niveles de parásitos, produjo mayores niveles de anticuerpos cuando se comparó con el grupo TvLIEM176.

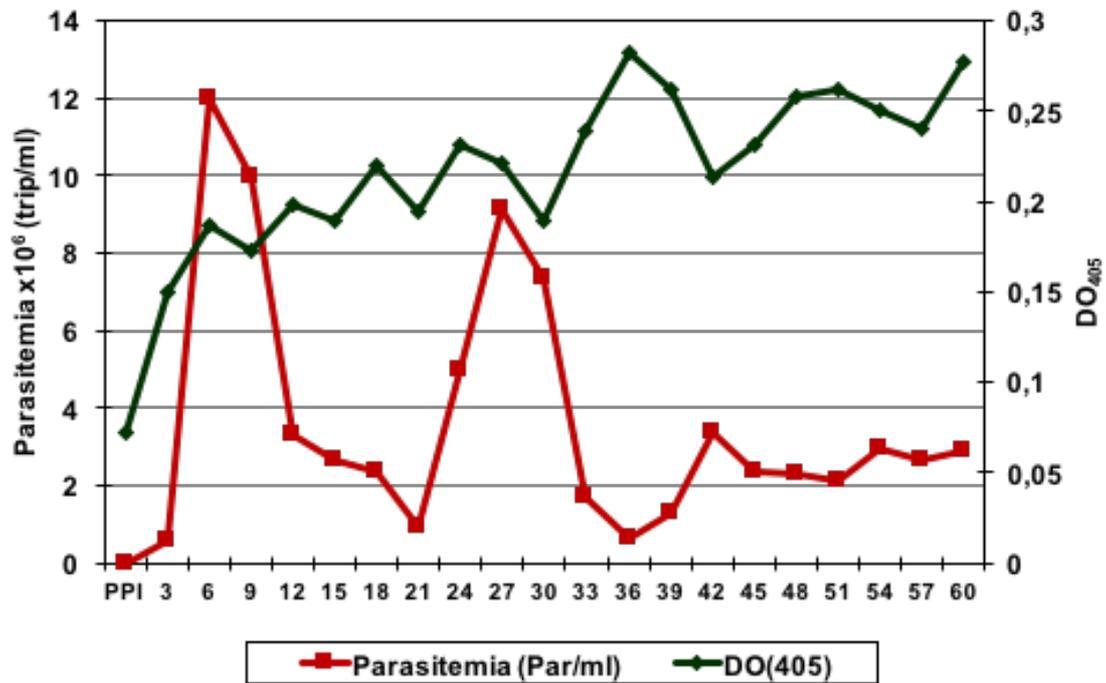


Figura 17. Comparación de los valores promedio de parasitemia x 10⁶ (tripanosomas/ml) y niveles de anticuerpos (DO₄₀₅) medidos a través de la técnica de ELISA en los ovinos infectados experimentalmente con el aislado TvLIEM176, durante el período pre y post-infección

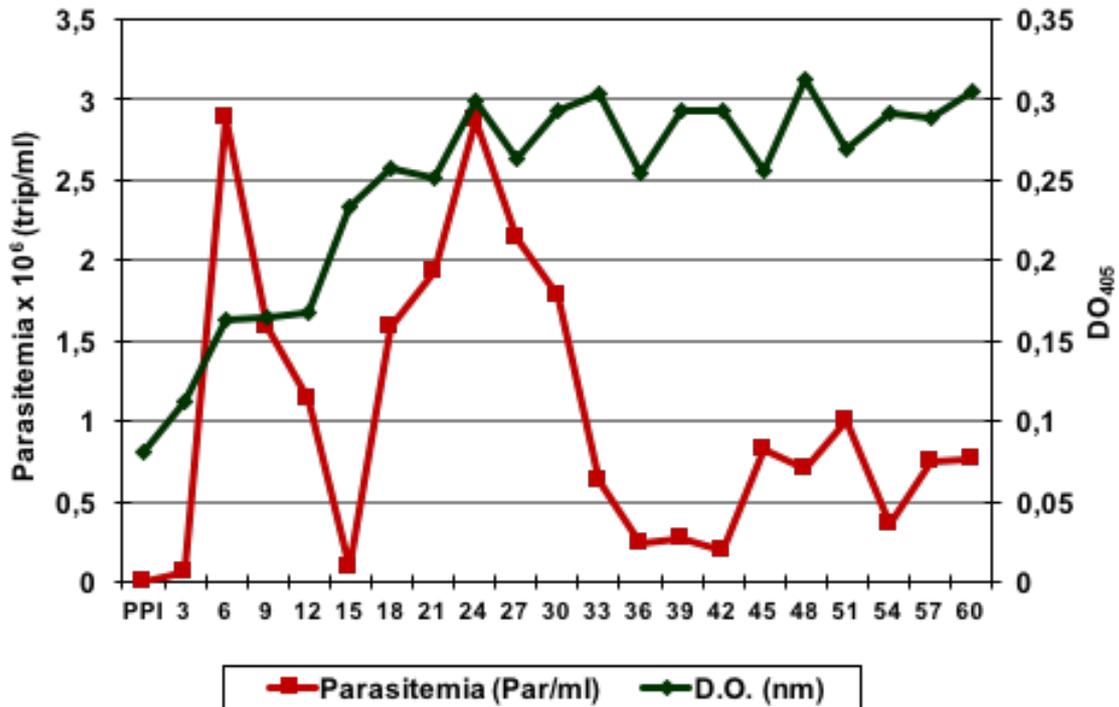


Figura 18. Comparación de los valores promedio de parasitemia x 10⁶ (tripanosomas/ml) y niveles de anticuerpos (DO₄₀₅) medidos a través de la técnica de ELISA en los ovinos infectados experimentalmente con el aislado TvMT1, durante el período pre y post-infección

4.2.- Estudio proteómico de los aislados de *T. vivax*

Una vez realizada la inoculación experimental de los 4 ovinos para realizar la obtención del proteoma (Sección 3.1.2.-), se logró la purificación de los parásitos y extracción del proteoma de los dos ovinos infectados con el aislado TvLIEM176, pero solamente de uno de los animales inoculados con el aislado TvMT1. Esto resultó en la obtención de tres proteomas, identificados como Liem 1, Liem 2 (provenientes de los dos animales inoculados con TvLIEM176) y

Monagas (proveniente del animal infectado con el aislado TvMT1). La concentración de proteínas obtenida de cada uno de estos proteomas se muestra en la Tabla 24.

Tabla 24. Concentración de proteínas obtenida de los purificados de *T. vivax* (aislados TvMT1 y TvLIEM176)

Proteoma	Concentración de proteínas (mg/ml)
Liem 1	14
Liem 2	17
Monagas	17

4.2.1.- Análisis de los geles 2D DIGE

El análisis de los geles 2D DIGE a través del programa Progenesis SameSpots™ permitió la identificación de un aproximado de 2000 spots. Sin embargo, se hizo una revisión manual de cada spot y se fueron seleccionando de acuerdo al volumen normalizado y al valor del ANOVA, para seleccionar los spots que tuvieran expresión diferencial entre los 3 purificados de *T. vivax* (Liem 1, Liem 2, Monagas) y el purificado de *T. evansi* (El Frío). El nivel de intensidad de los spots fue normalizado por el programa Progenesis SameSpots™ usando el control estándar interno marcado con el colorante Cy2. En este paso se obtuvo una selección de 109 spots, tal como se muestra en la Figura 19 (La tabla con el valor normalizado y el ANOVA se muestra en el Anexo 1).

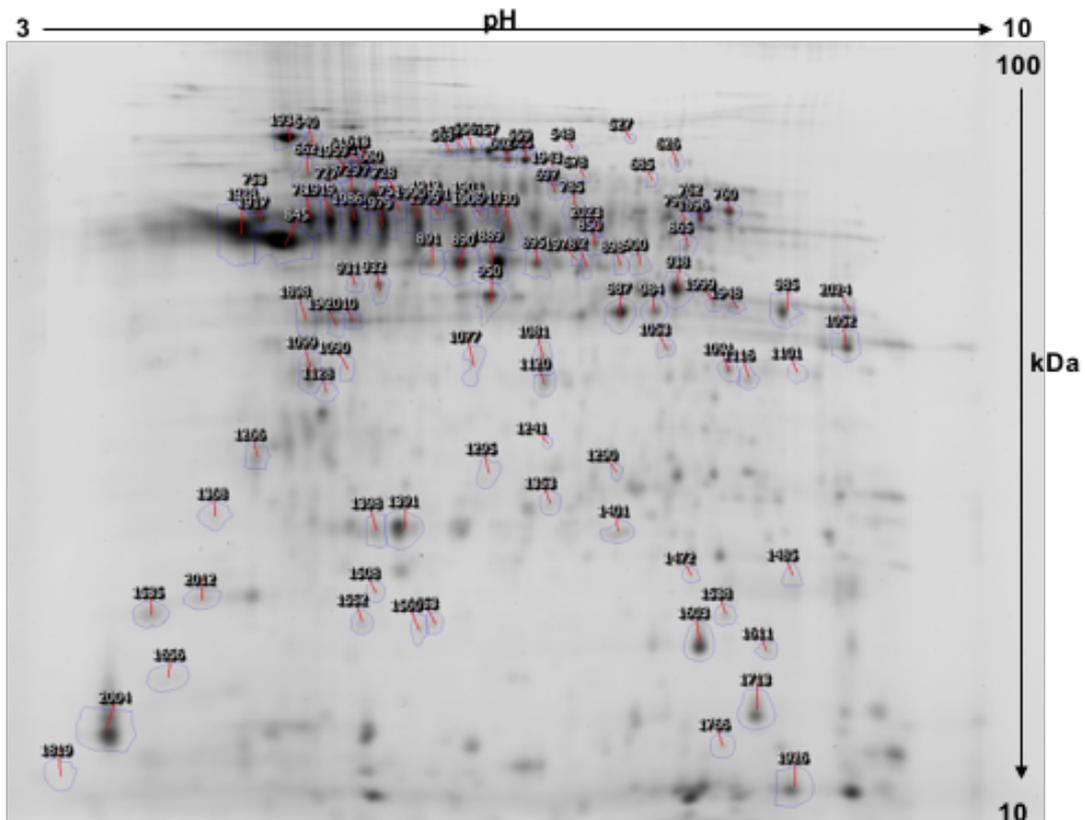


Figura 19. Mapa bidimensional del contenido proteico del proteoma de los 3 purificados de *T. vivax* (Liem 1, Liem 2, Monagas) y del purificado de *T. evansi* (El Frío) a través de la técnica de 2D DIGE, mostrando los 109 spots resultantes en el primer análisis computarizado. La imagen es la superposición automática de los 4 geles mostrando las coincidencias entre proteínas comunes con diferencias en su expresión

Una segunda revisión permitió seleccionar a partir de estos 109 spots, aquellos que fueran específicos para *T. vivax* (que solo se expresaran en *T. vivax* pero no en *T. evansi*) pero que además tuvieran una expresión diferencial entre los purificados de *T. vivax*. En esta última revisión, también basada en los volúmenes normalizados y en los patrones de intensidad de expresión de las proteínas, se seleccionaron finalmente 17 spots que corresponden a las

proteínas comunes pero con expresión diferencial entre los purificados proteicos de *T. vivax*. Solamente se seleccionaron aquellos spots con valor estadístico significativo ($p < 0,05$; power $> 0,8$), Figura 20.

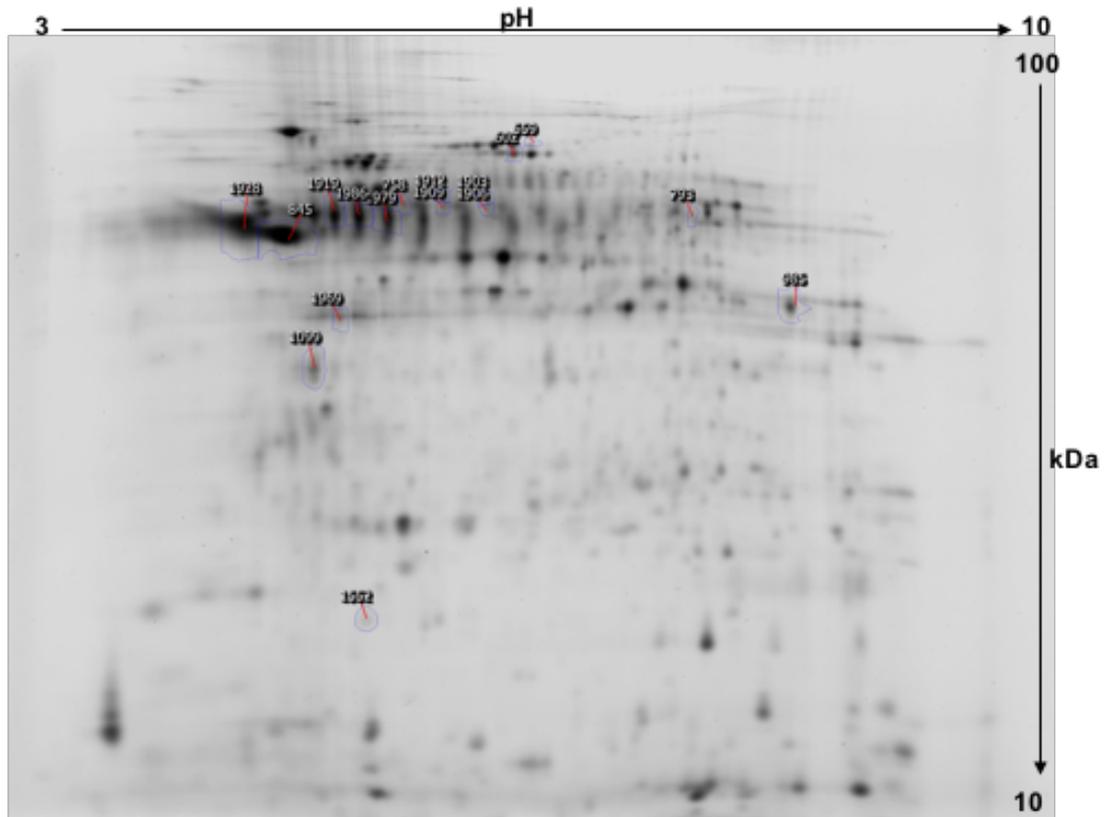


Figura 20. Mapa bidimensional del contenido proteico del proteoma de los 3 purificados de *T. vivax* (Liem 1, Liem 2, Monagas) y del purificado de *T. evansi* (El Frío) a través de la técnica de 2D DIGE, mostrando los 17 spots que corresponden a proteínas comunes pero con expresión diferencial entre los purificados de *T. vivax*. La imagen es la superposición automática de los 4 geles mostrando las coincidencias entre proteínas comunes con diferencias en su expresión

La Tabla 25 y la Figura 21 muestran la media de los volúmenes normalizados de los 17 spots seleccionados. Como puede observarse, tomando en cuenta los

volúmenes normalizados, los spots pueden clasificarse en 3 categorías: Específicos para *T. vivax* (comunes a los 2 aislados): 7 spots; específicos para el aislado TvLIEM176 (Liem): 4 spots; y específicos para el aislado TvMT1 (Monagas): 6 spots.

Tabla 25. Media de valores normalizados de los 17 spots seleccionados mostrando su nivel de intensidad diferencial entre los aislados

Spot	Media del Volumen Normalizado			
	Liem 1	Liem 2	Monagas	El Frio
1552	1,315	1,132	1,083	0,236
758	0,660	0,543	3,701	0,109
1099	1,063	1,098	1,160	0,233
793	0,563	0,320	2,831	0,416
985	1,111	1,110	1,034	0,170
1912	0,419	0,393	3,643	0,172
1909	0,977	0,584	4,523	0,181
602	1,166	1,034	1,146	0,209
845	1,221	1,088	1,176	0,134
1928	1,142	1,019	1,194	0,130
1903	0,371	0,351	4,226	0,172
1969	1,045	0,946	0,950	0,235
1919	1,215	1,443	0,472	0,124
1979	1,405	1,295	0,601	0,138
1906	1,190	1,012	5,634	0,334
1986	1,332	1,489	0,552	0,147
559	1,249	1,137	0,683	0,363

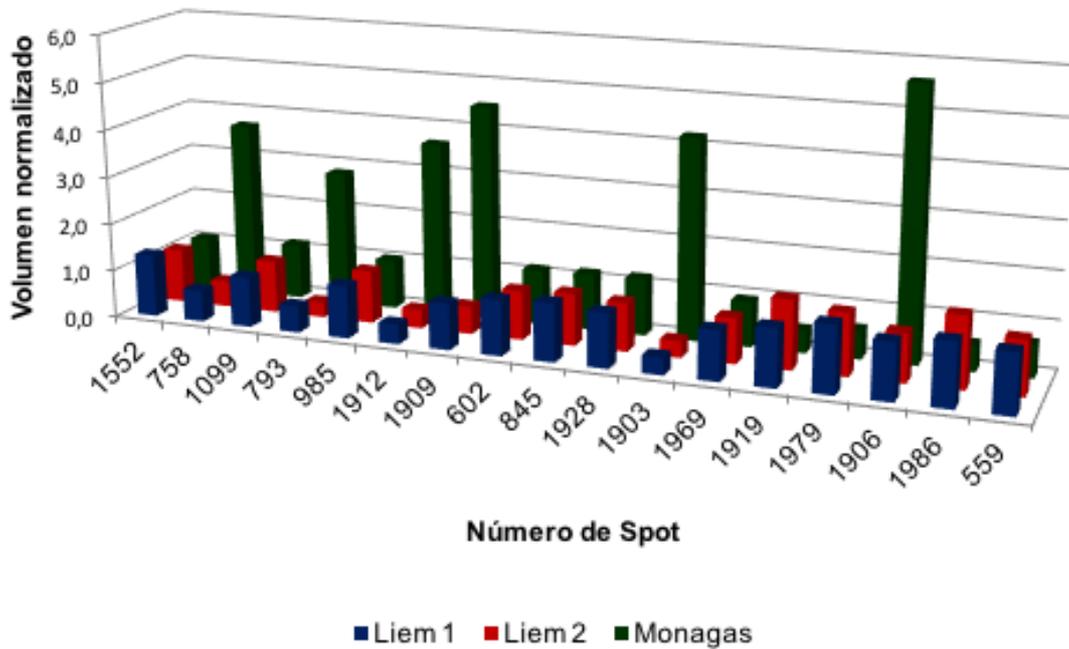


Figura 21. Volumen normalizado de la intensidad de expresión de los spots seleccionados

Adicionalmente, cada spot fue revisado de manera individual, revisándose el nivel de expresión en cada aislado del estudio y observándose cuidadosamente los patrones de intensidad, lo cual se muestra en las Figuras 22 a 38. Cada figura muestra un spot en el mapa superpuesto de los 4 geles y el logaritmo del volumen normalizado, indicando en cual aislado la expresión es mayor.

4.2.1.1.- Spots específicos para *T. vivax*

Se corresponden con aquellos spots que presentan una intensidad de expresión similar en los dos aislados.

Spot 1552:

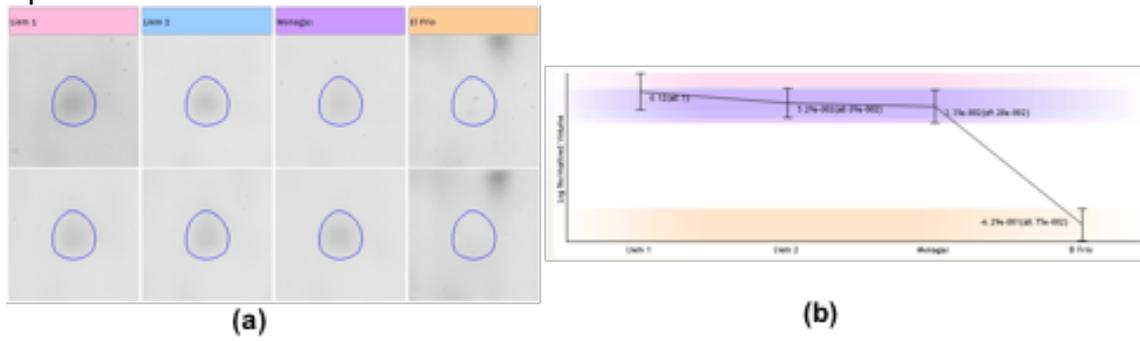


Figura 22. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1552. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1552

Spot 1099:

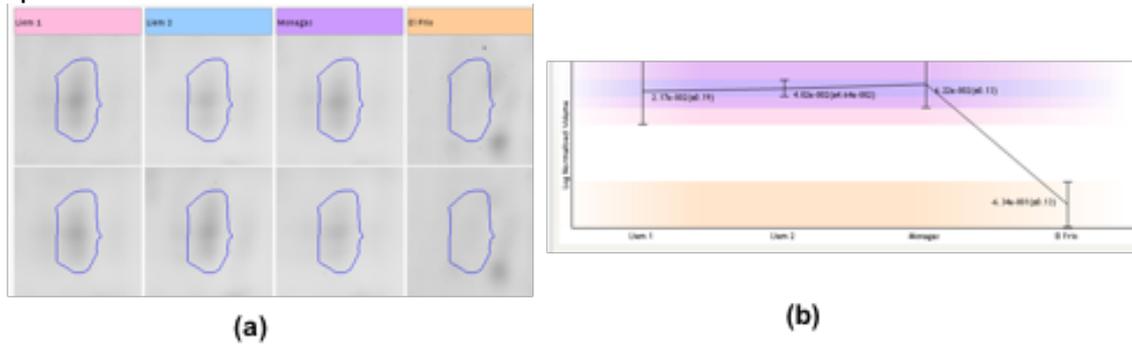


Figura 23. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1099. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1099

Spot 985:

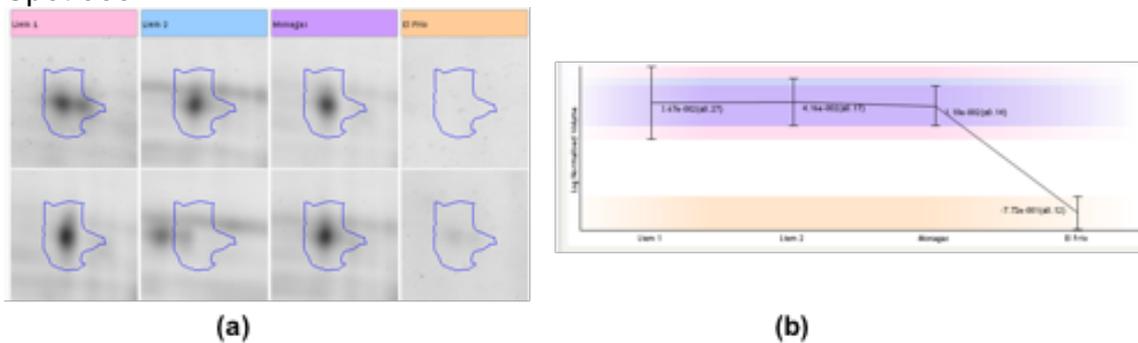


Figura 24. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 985. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 985

Spot 602:

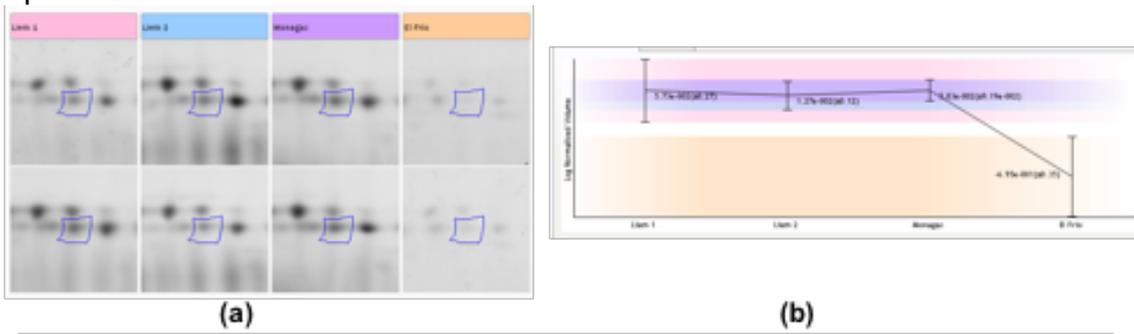


Figura 25. Figura 25. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 602. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 602

Spot 845:

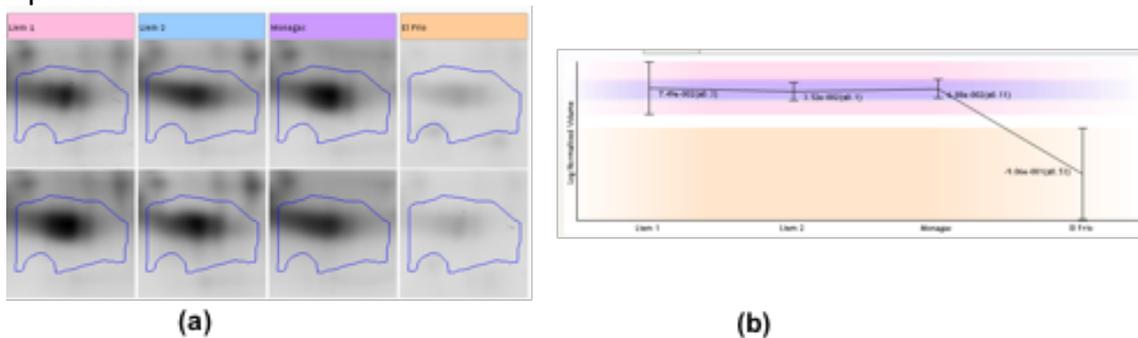


Figura 26. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 845. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 845

Spot 1928:

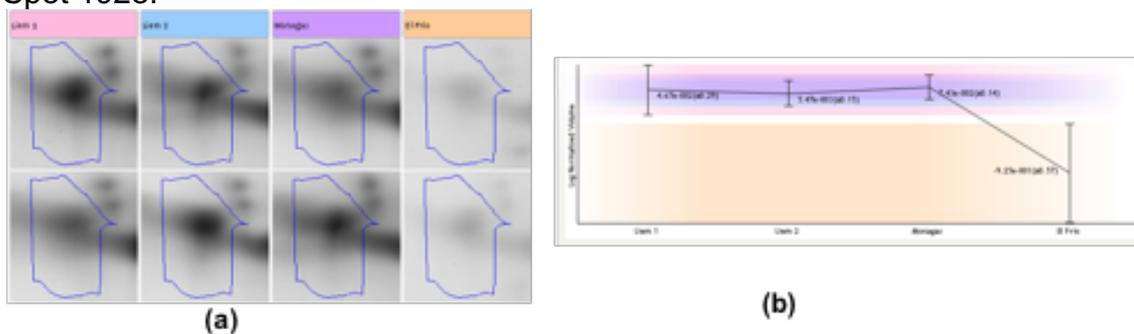


Figura 27. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1928. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1928

Spot 1969:

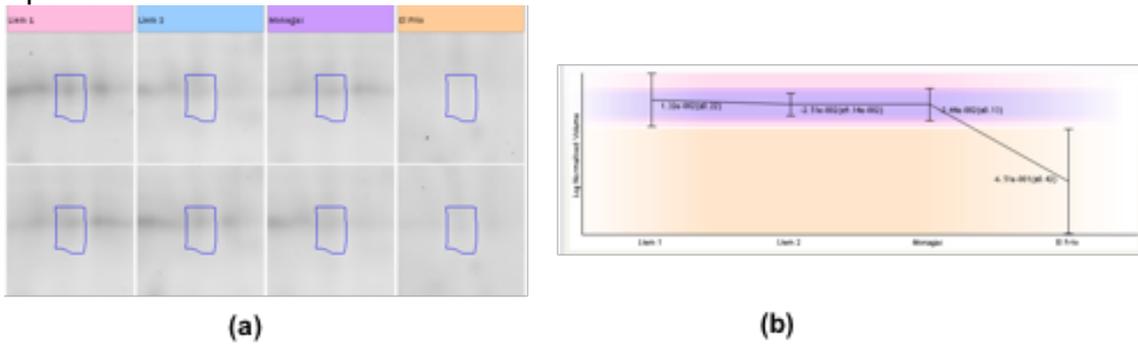


Figura 28. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1969. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1969

4.2.1.2.- Spots específicos para aislado TvMT1

Son aquellos spots que se expresan particularmente en el aislado TvMT1. Se indica la intensidad de expresión diferencial vs el aislado TvLIEM176.

Spot 758:

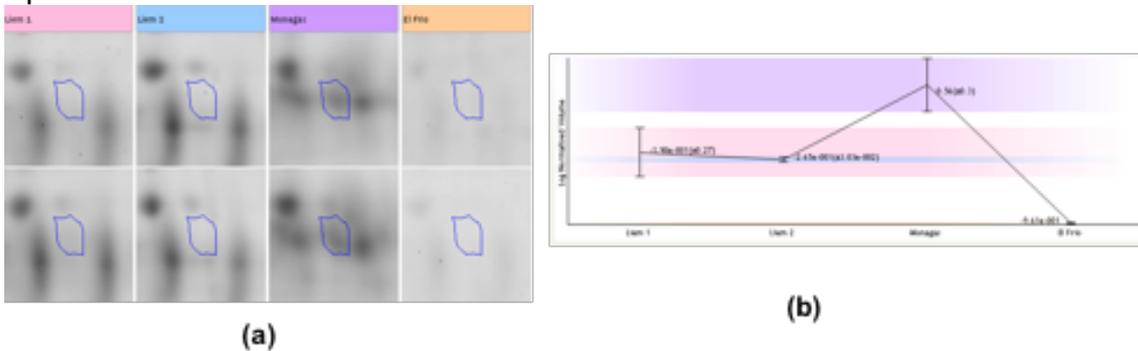
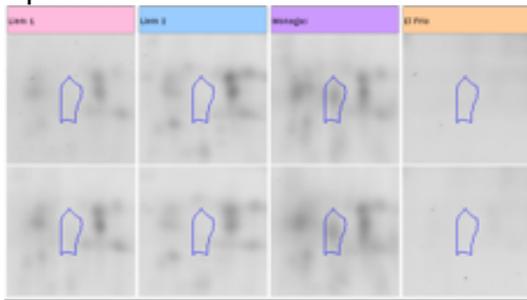
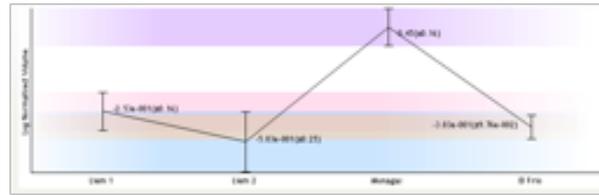


Figura 29. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 758. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 758

Spot 793:



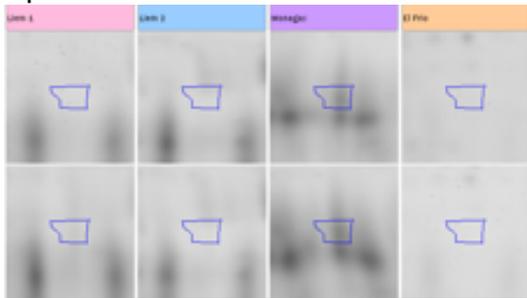
(a)



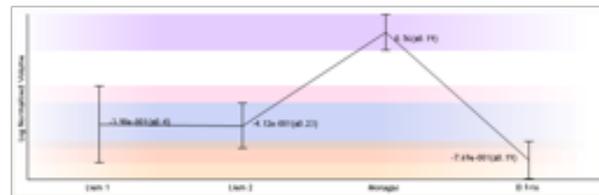
(b)

Figura 30. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 793. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 793

Spot 1912:



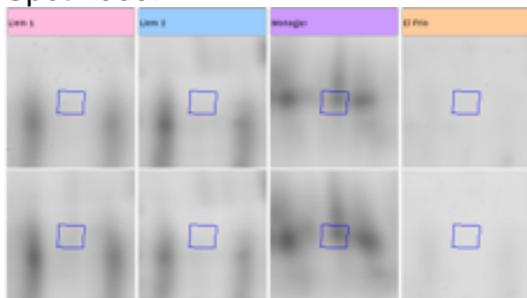
(a)



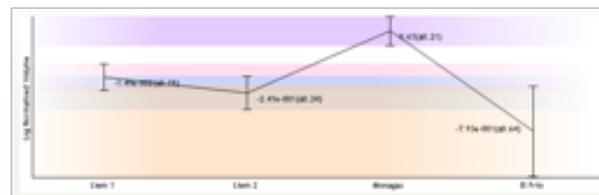
(b)

Figura 31. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1912. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1912

Spot 1909:



(a)



(b)

Figura 32. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1909. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1909

Spot 1903:

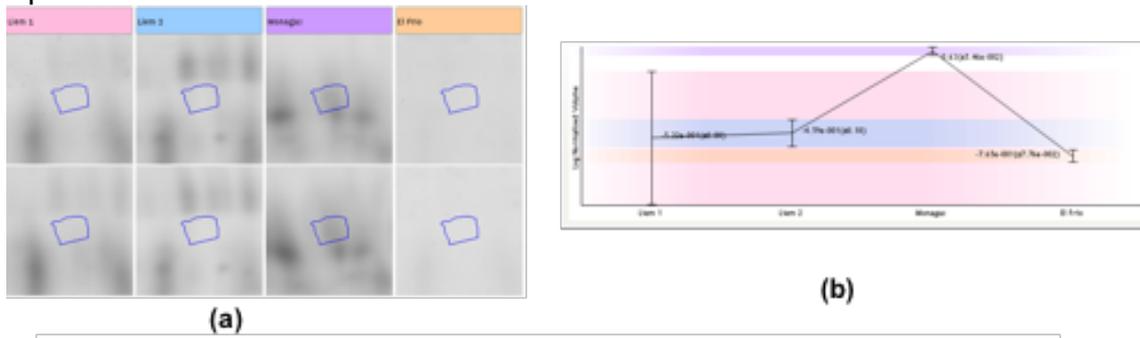


Figura 33. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1903. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1903

Spot 1906:

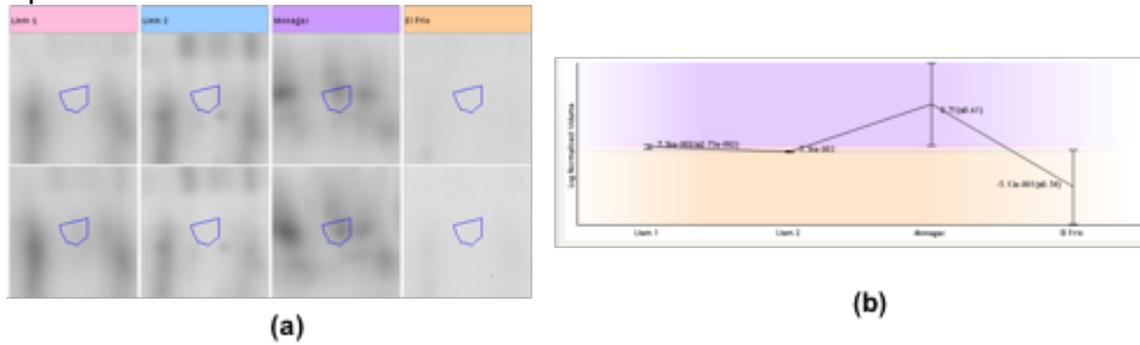


Figura 34. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1906. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1906

4.2.1.3.- Spots específicos para aislado TvLIEM176

Son aquellos spots que se expresan particularmente en el aislado TvLIEM176.

Se indica la intensidad de expresión diferencial vs el aislado TvMT1.

Spot 1919:

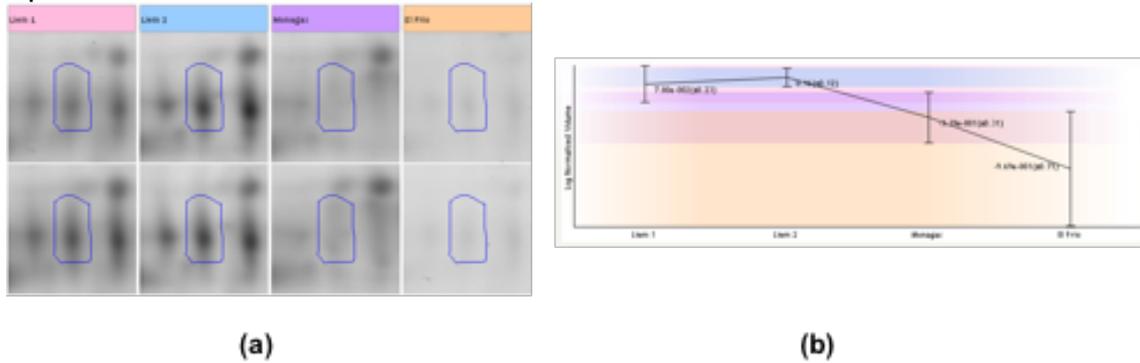


Figura 35. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1919. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1919

Spot 1979:

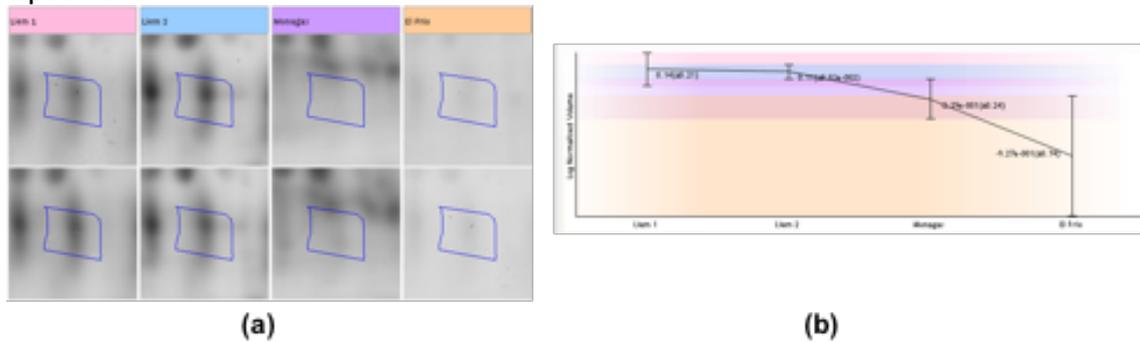


Figura 36. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1979. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1979

Spot 1986:

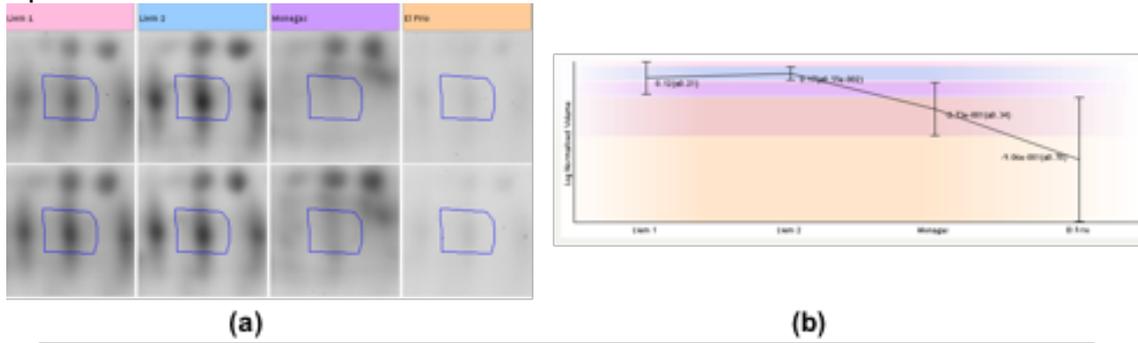


Figura 37. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 1986. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 1986

Spot 559:

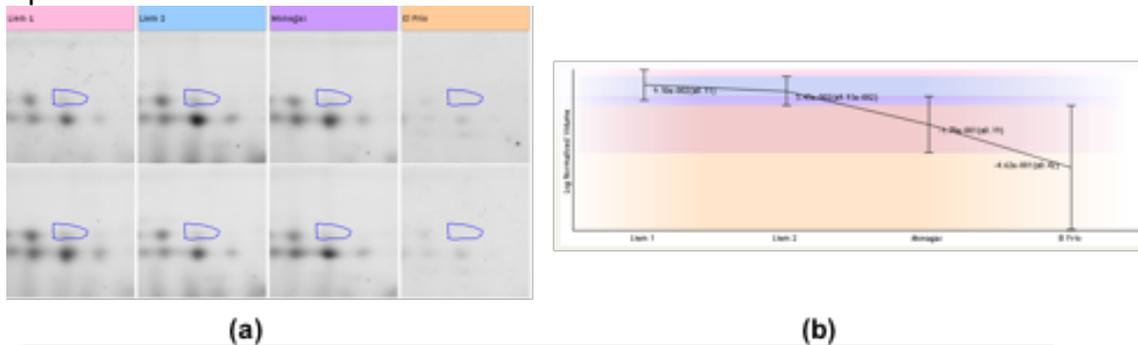


Figura 38. (a) Intensidad de expresión diferencial del spot 559. (b) Logaritmo del volumen normalizado del spot 559

4.2.2.- Espectrofotometría de masas

Una vez seleccionados los 17 spots de interés, se procedió a su extracción en los 4 geles para ser procesados a través de espectrometría de masas. La Tabla 26 muestra las proteínas identificadas de cada spot a través de la base de datos SwissProt/TrEMBL. Ahí puede observarse que en total se identificaron 26 proteínas, existiendo en algunos casos diferentes isoformas (con diferentes peso molecular o diferente punto isoeléctrico). El 23% de ellas (6 proteínas tuvieron

una caracterización putativa en TrEMBL, las cuales corresponden a transcritos ya identificados. El 7,6% son proteínas putativas en TrEMBL pero no han sido caracterizadas, cuyas secuencias de ADN, teóricamente podrían conducir a identificar su secuencia proteica.

Tabla 26. Proteínas identificadas por espectrometría de masa en los proteomas de los dos aislados de *Trypanosoma vivax*

NS ^a	Proteína ^b	Acceso ^c	Esp. ^d	PM ^e [kDa]	pl ^f calc	Péptidos ^g
1552	Tryparedoxin peroxidasa	C9ZUX7	<i>Tbg</i>	25,6	7,40	3
1552	Tryparedoxin peroxidasa, putativa	E7LM19	<i>Tc</i>	12,2	8,76	2
1099	Piruvato deshidrogenasa E1, subunidad beta, putativa	C9ZK62	<i>Tbg</i>	37,5	5,62	3
985	Fructosa-bisfosfato aldolasa	D0A2V3	<i>Tbg</i>	41,0	8,78	2
602	Proteína mayor rod paraflagelar	B5U6T6	<i>Tc</i>	69,5	6,18	6
602	Proteína Rod Paraflagelar 2 (PFR 2)	C7FLQ3	<i>Te</i>	69,5	6,02	8
602	Proteína Paraflagelar 3 (PAR3)	O18658	<i>Tc</i>	68,7	6,18	8
845	Alfa tubulina	P04106	<i>Tbr</i>	49,8	5,06	24
845	Beta tubulina	A1XXJ2	<i>Te</i>	49,6	4,87	12
845	ATP sintetasa, subunidad beta	Q9GPE9	<i>Tbb</i>	55,6	5,49	6
845	Factor de elongación 1 alfa	Q26913	<i>Tc</i>	43,5	7,66	4
1928	Beta Tubulina	P04107	<i>Tbr</i>	49,7	4,83	25
1928	Beta tubulina 1.9	Q8STF3	<i>Tc</i>	49,7	4,84	22
1928	Alfa Tubulina	P04106	<i>Tbr</i>	49,8	5,06	17
1969	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) glicosomal	O97107	<i>Tv</i>	37,1	8,37	14
1969	CMRP (Componente Flagelar)	C9ZRE1	<i>Tbg</i>	40,7	5,52	6
1969	Nucleosido hidrolasa, putativa	E7KX02	<i>Tc</i>	39,7	4,92	2
1969	Proteína no caracterizada putativa	C9ZIG7	<i>Tbg</i>	38,4	5,52	2
1919	Beta tubulina	A1XXJ2	<i>Te</i>	49,6	4,87	15
1919	Beta tubulina 1.9	Q8STF3	<i>Tc</i>	49,7	4,84	14
1919	Proteína de Choque Térmico 60 (Chaperonina HSP60), mitocondrial	D0A349	<i>Tbg</i>	59,5	5,44	6
1919	Proteína de Choque Térmico 70 (HSP70), fragmento	A4GVT7	<i>Tr</i>	71,0	5,81	3
1919	Arginina quinasa, putativa	E7LM38	<i>Tc</i>	40,2	6,74	4

Resultados

NS ^a	Proteína ^b	Acceso ^c	Esp. ^d	PM ^e [kDa]	pl ^f calc	Péptidos ^g
1979	Beta tubulina	A1XXJ2	<i>Te</i>	49,6	4,87	14
1979	Beta tubulina 1.9	Q8STF3	<i>Tc</i>	49,7	4,84	14
1979	Proteína de Choque Térmico 60 (Chaperonina HSP60), mitocondrial	D0A349	<i>Tbg</i>	59,5	5,44	7
1979	Alfa Tubulina	P04106	<i>Tbr</i>	49,8	5,06	7
1979	ADN-Helicasa semejante a RuvB (ADN- Helicasa dependiente de ATP)	C9ZM62	<i>Tbg</i>	52,6	5,54	2
1986	Proteína de Choque Térmico 60 (Chaperonina HSP60), mitocondrial	D0A349	<i>Tbg</i>	59,5	5,44	9
1986	Beta tubulina	A1XXJ2	<i>Te</i>	49,6	4,87	14
1986	Beta tubulina 1.9	Q8STF3	<i>Tc</i>	49,7	4,84	13
1986	Alfa Tubulina	P04106	<i>Tbr</i>	49,8	5,06	10
1986	Proteína de Choque Térmico 70-4 (HSP70- 4)	P11145	<i>Tbb</i>	71,4	5,39	5
1986	Proteína 78 regulada por glucosa, putativa (Proteína de unión luminal 1 (Bip), putativa)	D0A7U5	<i>Tbg</i>	65,2	5,52	2
1986	Proteína del Complejo T, subunidad theta, putativa (CCT-theta, putativa)	D0A3R6	<i>Tbg</i>	58,1	5,53	2
1986	Proteína no caracterizada, putativa	C9ZMJ1	<i>Tbg</i>	66,8	5,08	2
559	Proteína Paraflagelar 3 (PAR3)	O18658	<i>Tc</i>	68,7	6,18	6
758	Proteína de Choque Térmico 60 (Chaperonina HSP60), mitocondrial	D0A349	<i>Tbg</i>	59,5	5,44	6
758	Proteína del Complejo-T 1, subunidad alfa	D0AAR8	<i>Tbg</i>	59,4	5,92	2
758	Proteína del Complejo-T 1, subunidad alfa	E7LBH6	<i>Tc</i>	59,3	6,16	3
758	Piruvato quinasa	E7LIX9	<i>Tc</i>	54,6	7,39	3
793	Glicerol quinasa	B0I530	<i>Tv</i>	56,4	8,37	6
793	Inosin-5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH)	E7LIA8	<i>Tc</i>	55,6	8,50	2
1912	Proteína de Choque Térmico 60 (Chaperonina HSP60), mitocondrial	D0A349	<i>Tbg</i>	59,5	5,44	2
1909	Ninguna					
1903	Proteína Rod Paraflagelar 1 de 73 kDa (PFR1)	C9ZLC2	<i>Tbg</i>	59,6	6,11	4
1906	ATP sintetasa vacuolar, subunidad b, putativa	D0A941	<i>Tbg</i>	55,6	5,60	10

NS ^a	Proteína ^b	Acceso ^c	Esp. ^d	PM ^e [kDa]	pI ^f calc	Péptidos ^g
1906	Proteína Rod Paraflagelar 1 de 73 kDa (PFR1)	C9ZLC2	<i>Tbg</i>	59,6	6,11	4

^aNúmero del spot marcado en el gel

^bNombre de la proteína

^cNúmero de acceso de acuerdo a las bases de datos (UniprotKB y Swiss-Prot/TrEMBL)

^dEspecie: *Tbb*, *Trypanosoma brucei brucei*; *Tbg*, *Trypanosoma brucei gambiense*; *Tbr*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*; *Tc*, *Trypanosoma cruzi*; *Te*, *Trypanosoma evansi*; *Tr*, *Trypanosoma rangeli*; *Tv*, *Trypanosoma vivax*

^ePeso Molecular teórico (No determinado por los fragmentos de proteína)

^fPunto Isoeléctrico teórico (No determinado por los fragmentos de proteína)

^gNúmero de péptidos identificados en el spot para la identificación de la(s) proteína(s)

Como se puede observar en la Tabla 26, existen proteínas con la misma identificación en diferentes spots (diferente localización en el gel), lo cual evidencia la presencia de diferentes isoformas de las proteínas.

4.2.3.- Funcionalidad protéica y correlación entre aislados

Luego de recibir los resultados de la espectrometría de masas, los péptidos obtenidos fueron introducidos en la base de datos donde se encuentra el transcriptoma de *T. vivax* (<http://www.bioinformatica.fcien.edu.uy/Tvivax/>) con la finalidad de obtener la secuencia aminoacídica completa de cada una de las proteínas. Posteriormente, se hizo un Blast de cada proteína para conocer el porcentaje (%) de homología con otros tripanosomas. Por otra parte, se hizo una correlación de las proteínas identificadas y su nivel de expresión en los dos aislados en estudio, así como una búsqueda en las bases de datos UniprotKB (www.uniprot.org) y CombFunc (www.sbg.bio.ic.ac.uk) para encontrar sus funciones biológicas y moleculares. Un resumen de todos estos hallazgos se muestra en la Tabla 27.

Tabla 27. Resumen de las proteínas identificadas en los proteomas de los dos aislados de *Trypanosoma vivax*, indicando el nivel de expresión en cada uno de los aislados

Proteína ^a	Identificador en el transcriptoma de <i>T. vivax</i> ^b	Localización ^c	Residuos aminoácidos ^d	Homología con otros tripanosomatídeos ^e	Función Molecular ^f	Función Biológica ^g	Prop ^h	Referencia ⁱ	TvLIEM176 ^j	TvMT1 ^k
CMRP (Componente Flagelar)	TvMiraNov_c11299	Flagelo	164	<i>T. vivax</i> Y486: 97% <i>T. b. brucei</i> : 92% <i>T. b. gambiense</i> : 92%	Actividad aldolasa, actividad liasa	Respuesta al estrés oxidativo	?		++	++
Factor de elongación 1 alfa	TvMiraNov_c33	Citoplasma / Núcleo	449	<i>T. vivax</i> Y486: 100% <i>T. brucei</i> : 98% <i>T. congolense</i> : 98%	Actividad GTPasa, unión de ácidos nucleicos	Síntesis de Proteínas	V y P	Kaur y Ruben, 1994	++	++
Fructosa-bisfosfato aldolasa	TvMiraNov_c92	Glicosoma	372	<i>T. vivax</i> Y486: 100% <i>T. cruzi</i> : 87% <i>T. brucei</i> : 87%	Actividad liasa	Glicólisis	CV	Kumari y col., 2008	++	++
Gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) glicosomal	TvMiraNov_c216	Glicosoma	359	<i>T. vivax</i> Y486: 100% <i>T. congolense</i> : 96% <i>T. b. gambiense</i> : 95%	Actividad óxido-reductasa	Metabolismo de glucosa	CD BT CV V	Tanaka y col., 2004 Callens y Hannaert, 1995; Cáceres y col., 2010 Balaban y col., 1995 Grébaud y col., 2009	++	++
Nucleósido hidrolasa	No aparece	Citoplasma	?	?	Actividad hidrolasa, actividad glicosidasa	Síntesis de purinas	?		++	++
Piruvato deshidrogenasa	GCI4HUN02JS2IX	Mitocondria	175	<i>T. congolense</i> : 83% <i>T. cruzi</i> : 81% <i>T. brucei</i> : 81%	Actividad óxido-reductasa	Defensa celular	?		++	++
Proteína mayor rod paraflagelar	TvMiraNov_c30	Citoesqueleto y flagelo	599	<i>T. vivax</i> Y486: 100% <i>T. brucei</i> : 92% <i>T. evansi</i> 92%	Unión de proteínas	Organización celular y del citoesqueleto	CV	Morell y col., 2006	++	++
Proteína Rod Paraflagelar 2 (PFR 2)	TvMiraNov_c818	Citoesqueleto y flagelo	362	<i>T. vivax</i> Y486: 100% <i>T. brucei</i> : 93% <i>T. evansi</i> 93%	Unión de proteínas	Organización celular y del citoesqueleto	CV	Abdille y col., 2008a; 2008b	++	++
Tryparedoxin peroxidasa	TvMiraNov_c207	Mitocondria, citoplasma	226	<i>T. vivax</i> Y486 99% <i>T. congolense</i> 83% <i>T. b. gambiense</i> 82%	Actividad peroxidasa, actividad óxidoreductasa	Respuesta al estrés oxidativo	V CV BT	Díaz y col., 2011 Stober y col., 2007 Flohé, 2012	++	++

Proteína ^a	Identificador en el transcriptoma de <i>T. vivax</i> ^b	Localización ^c	Residuos aminoacídicos ^d	Homología con otros tripanosomatídeos ^e	Función Molecular ^f	Función Biológica ^g	Prop ^h	Referencia ⁱ	TvLIEM176 ^j	TvMT1 ^j
ADN-Helicasa semejante a RuvB (ADN-Helicasa dependiente de ATP)	No aparece	Núcleo	?	?	Unión de proteínas, función helicasa, función hidrolasa	Replicación del ADN	V	Lim y col., 2000; Ahmad y Tuteja, 2012	+++	+
Proteína 78 regulada por glucosa, putativa (Proteína de unión luminal 1 (Bip))	TvMiraNov_c155 (HSP70)	Reticulo endoplásmico	668	<i>T. vivax</i> Y486: 99% <i>T. congolense</i> : 93% <i>T. cruzi</i> : 92%	Chaperona, unión ATP	Plegamiento de proteínas	CV	Jensen y col., 2001	+++	+
Proteína Paraflagelar 3 (PAR3)	TvMiraNov_c274	Citoesqueleto y flagelo	595	<i>T. vivax</i> Y486: 99% <i>T. b. gambiense</i> : 94% <i>T. evansi</i> : 94%	Unión de proteínas	Organización celular y del citoesqueleto	CV	Morell y col., 2006	+++	+
Arginina quinasa	TvMiraNov_c1046	Localización subcelular	387	<i>T. vivax</i> Y486: 99% <i>T. cruzi</i> : 86% <i>T. b. gambiense</i> : 85%	Actividad quinasa, actividad transferasa	Metabolismo de aminoácidos, Transducción de señales, fosforilación	V y P BT	Grébaut y col., 2009 Pereira y col., 2002	+++	+
Alfa tubulina	TvMiraNov_c43	Citoesqueleto y flagelo	455	<i>T. vivax</i> Y486: 100% <i>T. congolense</i> : 99% <i>T. brucei</i> : 99%	Actividad GTPasa	Organización celular y del citoesqueleto	BT CV V	Yakovich y col., 2006 Plouffe y Belosevic, 2006 Grébaut y col., 2009	+++	+
Beta tubulina	TvMiraNov_rep_c526_3	Citoesqueleto y flagelo	442	<i>T. vivax</i> Y486: 100% <i>T. b. gambiense</i> : 99% <i>T. b. brucei</i> : 99%	Actividad GTPasa	Organización celular y del citoesqueleto	BT CV V	Yakovich y col., 2006 Li y col., 2007. Grébaut y col., 2009	+++	+

Proteína ^a	Identificador en el transcriptoma de <i>T. vivax</i> ^b	Localización ^c	Residuos aminoacídicos ^d	Homología con otros tripanosomatídeos ^e	Función Molecular ^f	Función Biológica ^g	Prop ^h	Referencia ⁱ	TvLIEM176 ^j	TvMT1 ^j
Proteína de Choque Térmico 70 (HSP70)	TvMiraNov_c155	Mitocondria, citoplasma	668	<i>T. vivax</i> Y486: 99% <i>T. congolense</i> : 93% <i>T. cruzi</i> : 92%	Chaperona, unión ATP	Plegamiento de proteínas, respuesta al estrés	CD CV BT	Bosard y col., 2010 Kumari y col., 2008 Evans y col., 2010.	+++	+
Proteína del Complejo T, subunidad theta (CCT-theta, putativa)	TvMiraNov_rep_c12168	Citoplasma	244	<i>T. vivax</i> Y486: 95% <i>T. congolense</i> : 88% <i>T. brucei</i> : 88%	Chaperona, actividad hidrolasa, unión ATP	Plegamiento de proteínas	V	Grébaut y col., 2009	+++	+
Proteína de Choque Térmico 60 (Chaperonina HSP60), mitocondrial	TvMiraNov_c5617	Mitocondria	471	<i>T. vivax</i> Y486: 100% <i>T. brucei</i> : 95% <i>T. congolense</i> : 94%	Chaperona, unión ATP	Plegamiento de proteínas, respuesta al estrés	?		+++	++
ATP sintetasa vacuolar, subunidad β	TvMiraNov_c15113	Mitocondria, acidocalciosoma	240	<i>T. cruzi</i> : 100% <i>T. rangeli</i> : 99% <i>T. b. brucei</i> : 99	Transporte transmembrana, transporte de sustratos específicos, actividad hidrolasa	Metabolismo energético	V y P	Grébaut y col., 2009.	+	+++
Proteína del Complejo-T 1, subunidad alfa	GCI4HUN02JWIRF	Citoplasma	160	<i>T. vivax</i> Y486: 100% <i>T. congolense</i> : 82% <i>T. b. brucei</i> : 82%	Chaperona, Unión ATP, metabolismo de proteínas	Plegamiento de proteínas	BT	Liang y MacRae, 1997	+	+++
Proteína Rod Paraflagelar 1 de 73 kDa (PFR1)	TvMiraNov_c959	Citoesqueleto y flagelo	221	<i>T. vivax</i> Y486: 100% <i>T. b. gambiense</i> : 92% <i>T. cruzi</i> : 92%	Unión de proteínas	Organización celular y del citoesqueleto	CV	Abdille y col., 2008a	+	+++
Glicerol quinasa	TvMiraNov_c7270	Glicosoma	240	<i>T. vivax</i> Y486: 100% <i>T. b. brucei</i> : 80% <i>T. b. gambiense</i> : 79%	Actividad quinasa, actividad transferasa	Metabolismo de carbohidratos	BT	Ohashi-Suzuki y col., 2011	+	+++

Proteína ^a	Identificador en el transcriptoma de <i>T. vivax</i> ^b	Localización ^c	Residuos aminoácidos ^d	Homología con otros tripanosomatídeos ^e	Función Molecular ^f	Función Biológica ^g	Prop ^h	Referencia ⁱ	TvLIEM176 ^j	TvMT1 ^j
Inosin-5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH)	TvMiraNov_c8463	Glicosoma	374	<i>T. vivax</i> Y486: 95% <i>T. b. brucei</i> : 80% <i>T. b. gambiense</i> : 80%	Actividad óxido-reductasa, unión de nucleótidos, crecimiento celular	Síntesis de purinas y síntesis de GMP	BT	Wilson y col., 1994	+	+++
Piruvato quinasa	TvMiraNov_c516	Glicosoma	499	<i>T. congolense</i> : 89% <i>T. b. gambiense</i> : 86% <i>T. b. brucei</i> : 86%	Actividad transferasa	Glicólisis	CV CD	Shin y col., 2004 Shin y col., 2004	+	+++

^aNombre de la proteína

^bIdentificador de la proteína en la base de datos del transcriptoma de *T. vivax* TvLIEM176 (<http://www.bioinformatica.fcien.edu.uy/Tvivax/>)

^cLocalización de la proteína dentro del parásito

^dNúmero de aminoácidos que forma la proteína de acuerdo al transcriptoma de *T. vivax* TvLIEM176 (<http://www.bioinformatica.fcien.edu.uy/Tvivax/>)

^eHomología de la proteína con la misma proteína de otros tripanosomatídeos, de acuerdo a la base de datos UniprotKB (www.uniprot.org)

^fFunción molecular de acuerdo a las bases de datos UniprotKB (www.uniprot.org) y CombFunc (www.sbg.bio.ic.ac.uk)

^gFunción biológica de acuerdo a las bases de datos UniprotKB (www.uniprot.org) y CombFunc (www.sbg.bio.ic.ac.uk)

^hPropiedades moleculares seleccionada de acuerdo a la literatura: V, virulencia; P, patogenicidad, CV, candidato a vacuna; BT, blanco terapéutico; CD, candidato a diagnóstico (antigenicidad e inmunogenicidad)

ⁱLiteratura principal que refiere las propiedades de la proteína

^jNivel de expresión de las proteínas en cada aislado de *Trypanosoma vivax*: +, poco expresada; ++, medianamente expresada; +++, muy expresada

V. DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

5.1.- Determinación de los patrones de virulencia y patogenicidad de los aislados de *T. vivax*

La tripanosomosis causada por *T. vivax* es una enfermedad con características clínicas-patológicas muy variables, debido en parte a factores tales como: virulencia de la cepa, susceptibilidad de las especies hospedadoras, inmunidad del animal infectado, entre otros (Masake, 1980; Ventura y col., 2001). Se describe que diferentes aislados son capaces de producir desde un cuadro agudo, pasando a crónico, hasta el estado de portador o animales asintomáticos (Gardiner, 1989). Cepas de *T. vivax* del este de África provocan un cuadro clínico diferente a cepas del oeste Africano. En América del Sur la tripanosomosis causada por *T. vivax* varía en severidad, desde un síndrome agudo a una enfermedad crónica (Dirie y col., 1993).

En el presente estudio, el curso de las infecciones experimentales con dos aislados venezolanos de *T. vivax* permitió la **identificación de tres fases de la enfermedad**, tal como se ha reportado previamente (Gómez, 2010; Valera y col., 2005; Suárez, 2000). La primera fase o de prepatencia correspondió al período desde la infección experimental hasta que se detectaron por primera vez los parásitos en sangre.

Posteriormente, durante la infección se pudo observar una fase aguda en la cual los animales infectados presentaron altos niveles de parasitemia, además de fiebre de tipo recurrente, descensos significativos en los valores del hematocrito, inapetencia y palidez de mucosas, coincidiendo con lo reportado por Anosa e

Isoun, 1980; Maikaje y col., 1991; Sandoval y col., 1995a; 1995b; Suarez y col., 2003; Valera y col., 2005; cuando realizaron evaluaciones de los parámetros hematológicos en ovinos infectados experimentalmente con este protozoario.

Por último, los animales desarrollaron una fase sub-aguda de la enfermedad, durante la cual la parasitemia se volvió de tipo ondulante, con niveles inferiores a los encontrados durante la fase aguda, algunos episodios febriles, mucosas pálidas con ligero tinte icterico, deterioro progresivo de la condición corporal, además de la persistencia de bajos valores en el porcentaje de hematocrito con ligera tendencia a su recuperación. Estas observaciones son similares a las descritas por Murray y Dexter, 1988; Maikaje y col., 1991 y Katunguka-Rwakishaya y col., 1992; concordantes con la fisiopatología de la tripanosomosis en bovinos y ovinos.

La presentación de la enfermedad fue similar en ambos grupos infectados, referidos a las tres fases mencionadas anteriormente; sin embargo, las principales diferencias entre ambos aislados fueron observadas en cuanto a los niveles de parasitemia, temperatura y valores hematológicos, los cuales se van a ir discutiendo a continuación.

En los animales infectados experimentalmente con los dos aislados de *T. vivax* en la presente investigación, se determinó **un aumento de la temperatura corporal coincidiendo con la aparición de los parásitos en sangre circulante** a partir del tercer día PI. Estos resultados son concordantes con otro estudio realizado en Venezuela por Valera y col. (2005) quienes reportaron los efectos de la infección experimental de ovinos con un aislado zuliano de *T. vivax*

durante 90 días. Estos autores señalaron que todos los animales presentaron tripanosomas en sangre a partir del día 2 PI, desarrollando una parasitemia de tipo ondulante y un cuadro de anemia severa persistente hasta el final del experimento. Por otra parte, Suarez y col. (2003), evaluando el comportamiento parasitológico de un aislado proveniente del estado Falcón, reportaron un periodo de incubación que osciló entre 4 y 5 días.

Otras investigaciones en Venezuela, como las de Sandoval y col. (1995a); Espinoza y Tortolero (1990) y González y col. (1996), trabajaron con un mismo aislado de *T. vivax* procedente del estado Guárico, detectándose un periodo de incubación promedio de 4 (5 y 7) días en ovinos y bovinos infectados, respectivamente. De igual manera, Batista y col. (2006), en Brasil, reportaron 4 a 15 días como los intervalos de duración para esta fase de la enfermedad en ovinos infectados experimentalmente.

En este sentido, Osório y col. (2008) señalan que el periodo de incubación en infecciones por *T. vivax* es variable, dependiendo del hospedador o especie animal afectada y el aislado parasitario. En las ovejas y cabras, este periodo de tiempo puede tardar entre 4 a 12 días, respectivamente.

En el presente estudio, con ambos aislados de *T. vivax*, una vez detectados los parásitos en sangre, se observó la aparición de varias ondas de parasitemia durante el tiempo de evaluación, lo cual reflejó el comportamiento típico reportado para estos tripanosomatídeos y coincidiendo con los resultados reportados por Suárez y col. (2003) y Valera y col. (2005) en Venezuela, cuando realizaron infecciones experimentales de ovinos con *T. vivax*.

Por otra parte, con respecto a la **evolución de la parasitemia**, diferentes trabajos realizados en Venezuela han evidenciado un comportamiento ondulante durante el período experimental, además de considerables variaciones individuales entre los animales, en los registros de parasitemia y en los períodos aparasitémicos (Sandoval y col. 1995a). Por su parte, Batista y col. (2006) confirmaron la patogenicidad de un aislado en Brasil, realizando infecciones experimentales en ovinos a partir de $1,85 \times 10^5$ tripanosomas/ml en sangre. Además reportaron que el curso de la infección puede ser dividido en dos fases: la fase aguda la cual persiste aproximadamente por dos semanas caracterizada por alta parasitemia y fiebre. Mientras que la fase crónica se caracterizó por temperatura corporal normal y parasitemia baja o ausente. También reportaron anemia, leucopenia con linfocitosis y ausencia de ganancia de peso.

En este sentido, la parasitemia ha sido un complemento importante para detectar los tripanosomas en sangre, permitiendo además el estudio de la patogénesis de la enfermedad. Es decir, como regla general, las altas parasitemias están asociadas a la fase aguda de la enfermedad, mientras que los bajos niveles son observados en la fase crónica. En este punto es importante destacar que la virulencia de un aislado está determinada según el nivel de parasitemia desarrollada (Holzmüller y col., 2008). Los tripanosomas circulantes representan la principal población causante de la infección, aunque en algunas ocasiones pudieran ser simplemente una fracción del total (una sub población), la cual puede ser o no representativa del número y el comportamiento de toda la población (Losos, 1986).

Observando los resultados del presente estudio, se puede determinar que los ovinos infectados con el aislado TvLIEM176 desarrollaron las mayores ondas de parasitemia, las cuales estuvieron por el orden de 10^7 trip/ml, mientras que los infectados con TvMT1 desarrollaron menores elevaciones de este parámetro durante todo el período experimental (cerca a 10^6 trip/ml), incluso con algunos animales mostrando parasitemias muy bajas.

Por otra parte se ha demostrado que *T. vivax*, igual que otros tripanosomas pertenecientes a la sección salivaria, manifiestan el mecanismo de variación antigénica, el cual representa la capacidad de las poblaciones de estos parásitos de expresar el repertorio de glicoproteínas variantes de superficie (VSG) durante la infección. Esto hace que estos patógenos evadan la respuesta inmunitaria en los animales infectados, por lo tanto, la variación antigénica permite subsistir al parásito en la sangre de su hospedador, conduciendo a la cronicidad de la infección y aumentando la probabilidad de transmisión de los flagelados a nuevos hospedadores (Gardiner y col. 1996).

En la mayoría de los animales infectados, las ondas de parasitemia estuvieron asociadas con alzas de la temperatura corporal en la fase aguda de la enfermedad, lo cual evidenció el fuerte grado de asociación entre estas variables, coincidiendo con las descripciones de otros estudios efectuados sobre tripanosomosis experimental en ovejas (Katunguka-Rwakishaya y col., 1992; Losos, 1986; Sandoval y col., 1995a; Suárez y col., 2003; Valera y col., 2005).

Con respecto a la temperatura corporal, durante el tiempo de las evaluaciones, los ovinos infectados con ambos aislados de *T. vivax* presentaron fuertes

variaciones de temperatura superiores al grupo control, con largos períodos febriles alternados con periodos afebriles, lo cual demostró un carácter recurrente, y en algunos casos remitente.

En este sentido, Sandoval y col. (1995a), estudiando la parasitemia y el comportamiento clínico durante 120 días, en ovejas infectadas experimentalmente con *T. vivax*, reportaron alteraciones considerables en la temperatura corporal, las cuales alcanzaron valores tan altos como 42 °C, coincidiendo la primera elevación con la detección de parásitos en sangre.

En cuanto a los **signos clínicos**, los animales infectados en el presente estudio presentaron durante todo el periodo de experimentación: fiebre de tipo remitente, parasitemia ondulante, inapetencia, palidez de las mucosas, ligero tinte icterico de las mucosas, pelo hirsuto, agrandamiento de los nódulos linfáticos, secreción ocular serosa, edemas en miembros posteriores y pabellón auricular, inflamación testicular, disnea, pérdida de peso y enflaquecimiento progresivo. Estas manifestaciones clínicas se relacionan con las citadas por otros autores, que han estudiado el comportamiento de aislados africanos o americanos de *T. vivax* (Mwongela y col., 1981; Luckins, 1992; Maikaje y col., 1991; Sandoval y col., 1995b; Silva y col., 1998a., 1999; Holmes y col., 2000; Suárez, 2000). Aunque no hubo un parámetro claro para medir la intensidad de estos signos clínicos, la severidad de los mismos fue mayor en los animales del grupo inoculado con el aislado TvMT1, considerándose que el grado de enfermedad fue mayor en estos animales cuando se comparó con el grupo inoculado con el aislado TvLIEM176.

Los animales infectados con los aislados de *T. vivax* empleados de este trabajo, desarrollaron rápidamente un cuadro de **anemia**, el cual se mantuvo hasta el final de la investigación. Los valores del hematocrito y de la hemoglobina descendieron drásticamente en las dos a tres primeras semanas PI, en el curso de la fase aguda de la enfermedad. En los ovinos infectados con el aislado TvMT1 se manifestó una importante disminución del hematocrito y de la hemoglobina a partir el día 9 PI, luego de lo cual se observaron variaciones de estos parámetros, evidenciándose la instauración de cuadros anémicos de diferente intensidad para cada uno de los aislados en estudio, los cuales persistieron durante todo el periodo experimental. Estos resultados coinciden con los descritos por Anosa e Isoun (1980); Igbokwe y Anosa (1989); Katunguka-Rwakishaya y col. (1992).

El porcentaje de disminución del hematocrito para los ovinos infectados con TvLIEM176 fue de aproximadamente 13,0%, señalándolo como el que causó el menor efecto anemizante durante la infección, lo cual fue similar al reportado por Sandoval y col. (1995b), quienes señalaron una disminución de 20% en ovejas infectadas experimentalmente con *T. vivax*. Contrariamente, utilizando un aislado del suroeste de la región del Pantanal, en el estado de Mato Grosso del Sur, Brasil, Paiva y col. (2000) reportaron que el hematocrito de los bovinos se mantuvo dentro de los parámetros para la categoría animal, aunque mostró una adecuada disminución entre los días 1 a 18 PI elevándose posteriormente.

La hemoglobina disminuyó concomitantemente con el hematocrito en todos los ovinos infectados y estas disminuciones drásticas de ambas variables

hematológicas coinciden con las reportadas en infecciones naturales y experimentales de ovinos y bovinos con *T. vivax* (Anosa e Isoun, 1980; Igbokwe y Anosa, 1989; Maikaje y col., 1991; Schenk y col., 2001; Suarez y col., 2003; Valera y col., 2005; Batista y col., 2006; 2008). Los cambios hematológicos como la disminución del hematocrito se evidenciaron desde la aparición de los parásitos, coincidiendo con los resultados de Sandoval y col. (1995b), en ovinos infectados experimentales con *T. vivax*, y Espinoza y col. (2000), en ovejas y cabras infectadas, quienes reportaron disminuciones significativas del hematocrito.

Con respecto a estudios similares empleando otras especies de tripanosomas, Bengaly y col. (2002), estudiaron los cambios clínicos y hematológicos en bovinos infectados experimentalmente con tres tipos distintos de *Trypanosoma congolense* (Savannah, Forest y Kilifi). En el caso del tipo Savannah, mostró altos niveles de parasitemia y bajos porcentajes de hematocrito, además de detectarse un síndrome hemorrágico severo, mientras que los animales infectados con los tipos Forest y Kilifi se recuperaron más rápidamente. Estos resultados indicaron claras diferencias en la patogenicidad entre estos tres tipos de *T. congolense*, señalando al tipo Savannah como el más virulento, mientras el tipo Forest presentó baja patogenicidad y el Kilifi tuvo un comportamiento no patógeno.

En este sentido, muchas hipótesis han sido emitidas para explicar por qué ocurre la anemia en la tripanosomosis en rumiantes y otras especies animales; entre ellas se señalan: hemodilución, mecanismos inmunológicos, enzimas generadas

por los tripanosomas (proteasas, fosfolipasas y neuraminidasas), activación del complemento, daños microangiopáticos, fiebre, así como también la activación y expansión del sistema fagocítico mononuclear (Murray y Dexter, 1988; Igbokwe y Anosa, 1989).

Es decir, la etio-patogenia de la anemia es muy compleja. En este sentido, uno de los mecanismos básicos es la hemólisis, basada en la reducción de la masa eritrocítica, reducción de la vida media de los eritrocitos, la cual ocurre de manera intravascular en la fase aguda y también extravascular en las fases subaguda y crónica de la enfermedad. Así como también de la eritrofagocitosis y otros mecanismos importantes que involucran la inhibición de la eritropoyesis (Facer y col., 1982; Losos, 1986; Murray y Dexter, 1988; Igbokwe y Anosa, 1989; Witola y Lovelace, 2001; Biryomumaisho y Katunguka-Rwakishaya, 2007).

La anemia ha sido considerada como el principal y el más importante hallazgo clínico en animales con tripanosomosis, siendo catalogada como de origen multifactorial, sin que exista hasta la actualidad una certeza científica del mecanismo exacto de su origen (Osório y col., 2008, Antoine-Moussiaux y col., 2009). Aunque el mecanismo de desarrollo de anemia no fue investigado en este estudio, se pueden plantear algunas hipótesis al respecto. Está demostrado que las inmunoglobulinas específicas contra el parásito participan formando complejos con el antígeno y con el complemento en la superficie de los eritrocitos conllevando a su secuestro y destrucción por el sistema fagocítico mononuclear (Kobayashi y Tizard, 1976, Murray y Dexter, 1988; Stijlemans y col., 2007). Esto coincide con las observaciones hechas por Anosa e Isoun (1980) y Murray y

Dexter (1988) quienes han demostrado eritrofagocitosis en ovejas infectadas con *T. vivax*, concluyendo que la hemólisis es inmunomediada. De igual forma, una eritrofagocitosis inespecífica debido a hiperactividad del sistema fagocítico o fagocitosis específica de células deterioradas pudiera contribuir a la anemia (Taylor, 1998).

Sin embargo, es de destacar la ausencia en este estudio de formas regenerativas como respuesta a una anemia hemolítica (reticulocitos), lo cual pudiera sugerir que también hay una inhibición de la eritropoyesis, tal como se ha reportado previamente (Anosa e Isoun, 1980; Facer y col., 1982; Igbokwe y Anosa, 1989).

Estos mecanismos de producción de anemia tienen una mayor o menor importancia dependiendo de la especie de tripanosoma involucrada. A este respecto, en infecciones por *T. congolense*, *T. vivax* y *T. evansi* es de esperarse una directa alteración de los eritrocitos como un importante mecanismo en la producción de anemia, ya que estos tripanosomas secretan unas enzimas, las sialidasas, que juegan un rol principal en esta patología. Estas sialidasas alteran la superficie de los glóbulos rojos, favoreciendo aún más su fagocitosis (Esievo y col., 1982; Engstler y Schauer, 1993; Buratai y col., 2006; Antoine-Moussiaux y col., 2009).

Las diferencias en el grado de anemia encontrado entre los grupos exoerimentales de este estudio tienen gran importancia en la evaluación de la patogenicidad de cada aislado, lo cual conlleva a la mayor o menor posibilidad de supervivencia y/o capacidad productiva y reproductiva de los animales. Estas diferencias, además de poder ser explicadas debido a posibles divergencias

genotípicas y fenotípicas de cada uno de los aislados evaluados, también podrían ser analizadas desde el punto de vista de la respuesta inmunitaria del hospedador, tal como ha sido referido en algunas investigaciones (Naessens, 2006; Stijlemans y col., 2007; Morrison y col., 2010).

Con respecto al **número total de leucocitos**, los valores promedios variaron a lo largo de las infecciones experimentales con los dos aislados de *T. vivax*, reflejándose temporalmente disminuciones en el número de estas células. Particularmente, los ovinos infectados con el aislado TvMT1 manifestaron disminución de sus valores promedios principalmente durante las dos primeras semanas PI, tiempo en el cual se desarrollaron las primeras ondas de parasitemia en este aislado. Para el caso de TvLIEM176, se observó la particularidad en desarrollar variaciones hacia el aumento y disminución en el número leucocitos. Hallazgos similares han sido descritos por Sandoval y col. (1996) y Valera y col. (2005), quienes reportaron no detectar una verdadera leucopenia durante la fase aguda y subaguda de la enfermedad, por el hecho de que los ovinos infectados mostraron valores que siempre oscilaron dentro de los intervalos considerados como normales para la especie.

Similarmente, en bovinos infectados con *T. vivax* se ha observado leucopenia, la cual tiende a coincidir con el desarrollo del cuadro anémico característico de la enfermedad. Adicionalmente, se ha reportado que la leucopenia va seguida de leucocitosis. En este sentido, se ha sugerido que la leucopenia en las infecciones con tripanosomas patógenos, podría deberse a una masiva leucofagocitosis a nivel hepático, como consecuencia del revestimiento de estas células con

antígenos de los parásitos y pérdidas de precursores a nivel de médula ósea. Todo esto podría ser causado por la liberación de factores tóxicos por parte de los tripanosomas, en especial neuraminidasas como las sialidasas las cuales marcan el ácido siálico de los leucocitos y posteriormente son destruidos a nivel de bazo e hígado (Esievo, 1979; Esievo y Saror, 1983).

En este sentido, varios autores han señalado que el criterio de leucopenia se presenta en concordancia con la primera onda de parasitemia y luego los leucocitos tienden a retornar a niveles de pre infección o cercanos a ellos. Sin embargo, es posible que la leucopenia desarrollada contribuya con la inmunosupresión, con la cual usualmente coexiste la enfermedad (Anosa e Isoun, 1980; Igbokwe y Anosa, 1989).

Por otra parte, el desarrollo de la pancitopenia se ha señalado en vacunos infectados con *T. congolense* y *T. vivax*, disminuyendo entre el 30 a 50 % el total de leucocitos. Además de la anemia, puede presentarse también trombocitopenia. En la mayoría de los casos, la leucopenia se presenta principalmente debido a disminuciones en los linfocitos y neutrófilos, la cual es seguida por una leucocitosis (Murray y Dexter, 1988).

En general, durante toda la fase aguda en las infecciones ovinas con los dos aislados parasitarios (TvMT1 y TvLIEM176), la cuenta leucocitaria estuvo por debajo del grupo control, detectándose incluso una ligera leucopenia en los animales del grupo inoculado con el aislado TvMT1 el día 39 PI. Estas variaciones en el número total de leucocitos estuvieron acompañadas de modificaciones también en el número de linfocitos. En el caso de los animales

infectados con el aislado TvMT1, aunque sufrieron leucopenia durante la fase aguda de la enfermedad, la subpoblación infocitaria no se vio alterada. Por el contrario, el aislado TvLIEM176 aunque no afectó el número total de leucocitos, produjo una disminución del número de linfocitos (linfopenia) entre la semana 2 y 5 PI.

En infecciones experimentales de ovinos con *T. vivax* en Brasil, Batista y col. (2006), señalaron leucopenia con linfocitosis a partir del día 30 PI, siendo estos hallazgos la principal característica del leucograma en esa investigación. Sin embargo, otras investigaciones han reportado un marcado aumento en el NTL, empleando ovejas infectadas experimentalmente con *T. congolense*, atribuyéndose estos efectos principalmente a una linfocitosis (Katunguka-Rwakishaya y col. 1992).

En otros estudios, utilizando bovinos infectados experimentalmente con *T. vivax*, los leucogramas reportaron leucocitosis con predominancia de linfocitos, sugiriendo la capacidad de reacción orgánica del sistema inmunológico de forma eficiente contra el agente invasor (Paiva y col. 2000). Mientras, los cambios hematológicos en las infecciones experimentales en ovejas, empleando *T. evansi*, indicaron leucocitosis como resultado de una marcada linfocitosis, probablemente por la incapacidad de los animales para eliminar los parásitos de su sistema (Onah y col. 1996). En infecciones de equinos con *T. evansi*, se ha reportado leucocitosis debido a la linfocitosis (Rorigues y col. 2005). Contrariamente, otros estudios han revelado disminución en el conteo total de

leucocitos en bovinos infectados experimentalmente con diferentes tipos de *T. congolense* (Bengaly y col., 2002).

La disminución de linfocitos en el presente estudio es concordante con los hallazgos reportados en varias investigaciones (Anosa e Isoun, 1980; Bengaly y col., 1992; Chamond y col., 2010). La linfopenia podría ser debida a una despoblación de los nódulos linfoides y la transformación de los linfocitos en células plasmáticas. También es posible que la linfopenia que se desarrolla durante la enfermedad pueda contribuir a la inmunosupresión que usualmente coexiste con la tripanosomosis (Anosa e Isoun, 1980; Taylor, 1998; Blom-Potar y col., 2010; Chamond y col., 2010). Sin embargo, es conveniente aclarar que en líneas generales no existe un patrón definido en las variaciones de los glóbulos blancos y sus poblaciones en animales infectados con *T. vivax*.

No obstante, es importante mencionar que las diferencias descritas en los valores de parasitemia están directamente correlacionadas con los niveles de linfocitos. Aunque en ambos grupos infectados hubo una baja del NTL, no hubo leucopenia significativa en ninguno de los dos grupos. No obstante, se pudo demostrar que el aislado TvLIEM176 produjo linfopenia, hallazgo que no pudo ser detectado en el grupo infectado con el aislado TvMT1. Los bajos niveles de linfocitos pudieran estar relacionados con la inmunosupresión descrita en la tripanosomosis (Gardiner, 1989; Taylor, 1998; Taylor y Mertens, 1999). Es evidente la significancia de un sistema inmunitario funcional en la eliminación de los parásitos de la sangre. El rol de los linfocitos y anticuerpos en la disminución de la parasitemia ha sido establecida con anterioridad en infecciones de ratones

con *T. brucei rhodesiense* (Dempsey y Mansfield, 1983). Estos autores reportaron que, a medida que aumentaban los títulos serológicos de anticuerpos contra los tripanosomas, los ratones lograban controlar mejor la parasitemia. Sin embargo, la cinética de aparición de anticuerpos relacionada con el primer pico de parasitemia sugiere que la IgM pudiera ser la responsable de la eliminación de los parásitos. También ha sido reportado que una activación del sistema fagocítico mononuclear por los tripanosomas no tiene un efecto directo en la velocidad de eliminación de los parásitos (Taylor y Mertens, 1999).

En referencia a las **proteínas totales**, la mayoría de los ovinos infectados con los dos aislados mostraron disminución en los valores dentro de los intervalos normales para la especie. Los animales infectados con el aislado TvMT1 arrojaron resultados de disminución de PT en la primera semana PI, mientras que en los ovinos inoculados con TvLIEM176 el descenso comenzó a observarse en la segunda semana PI. Consecuentemente, se evidenció una disminución de los valores de PT hasta el final de la experimentación en los animales inoculados con ambos aislados, sin mostrar valores de recuperación con respecto a esta variable.

Las disminuciones significativas en la concentración de proteínas totales también son señaladas por Audu y col. (1999) en infecciones ovinas con *T. evansi*; sugiriendo que los mecanismos involucrados en el descenso de las PT serían: el incremento de la destrucción de proteínas o pérdida de urea, hemodilución y extravasación de plasma, lo cual pudiera causar edema en los animales infectados. Por otra parte, se ha reportado hiperproteinemia de variable

intensidad en equinos infectados naturalmente con *T. evansi*, probablemente debido a incrementos en los niveles de inmunoglobulinas (Rodrigues y col., 2005).

Aunque a través del tiempo se ha considerado que virulencia y patogenicidad son sinónimos, es importante hacer una distinción entre estos términos. Al estudiar las interacciones hospedador-patógeno, Casadevall y Pirofski (1999) han realizado una revisión exhaustiva de los conceptos de virulencia y patogenicidad, además de otros conceptos relacionados con las interacciones hospedador-patógeno (Casadevall y Pirofski, 2000). Estos autores han propuesto la redefinición de varios términos en base al daño producido por un microorganismo en un hospedador y en función de la respuesta inmunitaria del hospedador, llegando luego a proponer la teoría de la respuesta-daño dentro del contexto de la patogénesis de una enfermedad (Casadevall y Pirofski, 2003).

Siguiendo con los conceptos de virulencia y patogenicidad, es comúnmente aceptado que un microorganismo patógeno es aquel que tiene la capacidad de causar enfermedad en un individuo. Sin embargo, esta definición excluye aquellos microorganismos que no causan una enfermedad clínicamente evidente en todos los hospedadores. Un problema significativo con los conceptos históricos es que han sido usualmente dependientes del tipo de agente patógeno. Por ejemplo, los conceptos de virulencia y patogenicidad derivados del estudio de enfermedades virales no son necesariamente aplicables a las enfermedades bacterianas ni a las parasitarias, y viceversa (Casadevall y Pirofski, 1999, 2000, 2003; Soriano y col., 2006).

Por esta razón se ha propuesto que un microorganismo patógeno es aquel que tiene la capacidad de producir daño en un hospedador. Esta capacidad viene a representar a la patogenicidad. En otras palabras, la patogenicidad es la capacidad de un microorganismo para causar daño en un hospedador. Bajo este precepto, un microorganismo patógeno causa enfermedad solamente cuando el daño incurrido en el hospedador es suficiente para afectar la homeostasis. El daño en el hospedador puede ocurrir como resultado de la acción directa del microorganismo en los tejidos, como resultado de la respuesta inmunitaria del hospedador o ambos.

Por otro lado, la virulencia ha sido difícil de definir desde el inicio de la teoría de la enfermedad. De hecho, desde hace más de medio siglo Watson y Brandly (1949) concluyeron que no había un acuerdo entre los investigadores de las enfermedades infecciosas acerca del significado de la palabra virulencia. Estos problemas siguen persitiendo hoy en día debido a que aún existe una importante confusión acerca de la definición de este término. El problema radica en que la virulencia es una propiedad del microorganismo que solamente se puede expresar en un hospedador susceptible. De esta manera, la virulencia no es una propiedad independiente, debido a que no puede ser definida independientemente del hospedador; es decir, más que una variable independiente, la virulencia es una variable dependiente de la disponibilidad de un hospedador susceptible y del contexto y naturaleza de la interacción hospedador-patógeno.

Tomando en cuenta los conceptos anteriores, se puede concluir que la virulencia no es una característica separada del microorganismo, sino más bien un fenómeno complejo y dinámico que incluye aspectos tanto del hospedador como del patógeno. En conclusión, hoy en día se considera un término muy relativo, y frecuentemente está asociado a “cantidad”, definiéndose de esta manera como la habilidad de un patógeno para multiplicarse dentro de su hospedador (Casadevall, 2007; Casadevall y Pirofski, 1999; 2000; 2001; 2009; Casadevall y col., 2011; Holzmuller y col., 2008).

Una vez definidos los términos virulencia y patogenicidad, se pudo establecer que el aislado TvLIEM176 fue el más virulento, debido a que los niveles de parasitemia (capacidad para reproducirse dentro de su hospedador) alcanzados en los animales infectados con este aislado fueron considerablemente mayores que los niveles alcanzados en los animales infectados con el aislado TvMT1. Por otra parte el aislado TvMT1 resultó ser el más patógeno, cuando se asociaron los efectos de la infección correlacionados con los principales indicadores clínicos y hematológicos, provocando los cuadros clínicos más severos y las disminuciones más significativas en el hematocrito y en la hemoglobina. Se ha sugerido que la virulencia de los tripanosomas pudiera estar relacionada con el tipo de variable antigénica (VAT), lo cual se ha demostrado en infecciones empleando, por ejemplo, *T. brucei* a través de pasajes sucesivos en animales de laboratorio, manifestando cambios en los aislados, los cuales van de moderados a extremadamente virulentos. Mientras, otros aspectos de la virulencia se han asociado con la capacidad que tiene la membrana subcelular para inducir inmunosupresión (Anosa y Isoun, 1980; Murray y Dexter, 1988).

Al realizar el **análisis de los anticuerpos** anti *T. vivax*, a través de la técnica de ELISA, se evidenció que los animales comenzaron a ser serológicamente positivos para los aislados TvMT1 y TvLIEM176, a partir del día 15 y 18 PI, respectivamente, lo cual coincide con Tizard (2013), quien menciona que los anticuerpos antiparasitarios son detectados por la técnica de ELISA aproximadamente cuando termina la segunda semana PI. Adicionalmente, es importante destacar que a pesar de que el aislado TvLIEM176 produjo parasitemias significativamente superiores a las producidas por el aislado TvMT1, los niveles de anticuerpos expresados a través de los valores de la DO₄₀₅ se comportaron de manera inversa. Es decir, los niveles de anticuerpos fueron mayores en los animales inoculados con el aislado TvMT1, lo cual pudiera ser explicado por varias razones.

Por una parte es bien documentada la diferencia en la intensidad de la respuesta inmunitaria de distintos aislados de tripanosomas tal cual lo reportan Bengaly y col. (2002), quienes consiguieron diversas respuestas patogénicas en ganado vacuno infectado con tres tipos diferentes de *Trypanosoma congolense*. Además de lo anterior se ha demostrado que *T. vivax*, al igual que otros tripanosomas pertenecientes a la sección salivaria presentan variación antigénica, la cual es la capacidad que tienen las poblaciones de estos parásitos de variar el repertorio de VSG durante la infección, evadiendo de esta manera la respuesta inmunitaria de los animales infectados. En tal sentido, la variación antigénica permite al parásito subsistir en la sangre de su hospedador conduciendo de esta manera a la cronicidad de la infección y aumentando la probabilidad de transmisión de los hemogflagelados a nuevos hospedadores (Gardiner y col. 1996). Sin embargo,

también es importante tomar en cuenta que durante la tripanosomosis es común una inmunosupresión del hospedador (Nantulya y col., 1992, Taylor, 1998; De Baetselier y col., 2001). En algunas ocasiones la inmunosupresión es específica, involucrando solamente la respuesta al parásito; en otras, la inmunosupresión es generalizada en los animales infectados, caracterizada por una disminución en la proliferación de células T y producción de citocinas (Taylor, 1998; Taylor y Mertens, 1999).

Es de hacer notar que el aislado TvLIEM176 aunque produjo mayores parasitemias que el aislado TvMT1, también fue el produjo un mayor efecto en la disminución de la población de linfocitos y así mismo menores niveles de anticuerpos medidos a través de la técnica de ELISA. Aunque su causa no fue investigada de manera precisa en el presente estudio, se podría especular que este aislado (TvLIEM176) pudo haber tenido un efecto inmunosupresor mayor que el otro aislado. Por su parte, el aislado TvMT1 podría ser considerado más antigénico que el aislado TvLIEM176, además de tener un menos efecto inmunosupresor sobre los animales infectados.

En inmunología se estima que a mayor desafío inmunogénico, en este caso sería gran cantidad de parásitos en sangre, debería existir una mayor estimulación del sistema inmunológico (Tizard, 2013) por lo que a mayor cantidad de tripanosomas circulantes, debería haber mayor respuesta humoral; sin embargo, en el caso de la presente investigación, el aislado TvLIEM176 resultó ser menos inmunogénico que el aislado TvMT1. La inmunobiología de la infección con tripanosomas africanos representa un panorama muy complejo e interesante,

rompiendo el paradigma descrito anteriormente. En este caso, la respuesta inmunológica depende de muchos factores y no solamente de la cantidad de antígeno (parasitemia), especialmente cuando se evalúan parásitos que son organismos vivos multiantigénicos. Algunos de estos factores pueden ser la presentación de los antígenos, el tipo de células que entran en el juego para el reconocimiento de estos antígenos y el patrón de liberación de citoquinas, lo cual trae como resultado la respuesta inmunológica responsable de la eliminación de los parásitos (Mansfield y col., 2014).

De hecho, los resultados presentados acá son coincidentes con algunos hallazgos en la respuesta de niveles de anticuerpos de diferentes aislados de *T. evansi* (Queiroz y col., 2001), donde se ha reportado que no existe una correlación entre los títulos serológicos (medidos a través de inmunofluorescencia indirecta) y la dosis de desafío utilizada para infectar ratas con esta especie. Sin embargo, en estudios hecho sobre infecciones experimentales de ratones con *T. brucei gambiense* (Holzmuller y col., 2008), los niveles de parasitemia han demostrado ser mucho más afectados por los diferentes patrones de virulencia de los aislados, lo cual podría explicar las diferencias vistas en el presente estudio. Al igual que *T. evansi*, *T. vivax* es considerado como una especie homogénea (Duffy y col., 2009; Tait y col., 2011; García y col., 2014) considerándose incluso que la diversidad genética existente en *T. vivax* es limitada, lo cual es compatible con una reproducción de tipo clonal en el continente americano (García y col., 2014). A pesar de su homogeneidad, en la presente investigación se observaron diferencias importantes en los patrones de virulencia y patogenicidad de los dos aislados de *T. vivax* utilizados.

Esto pudiera relacionarse con una investigación sobre la morfología comparativa de cinco aislados venezolanos de *T. vivax* (entre ellos, los dos usados en esta investigación), donde se demostró que existía variabilidad y heterogeneidad en el tamaño de los aislados (Gómez-Piñeres y col., 2014). Por esta razón, no debe descartarse la posibilidad que la variabilidad entre estos aislados afecte los patrones de virulencia y/o patogenicidad y por consiguiente los niveles de anticuerpos producidos por el hospedador.

Además, se ha demostrado que existe poca evidencia de activación linfocitaria en infecciones experimentales de bovinos con *T. vivax* y *T. congolense*, existiendo una disminución en los niveles de anticuerpos, lo cual podría ser un reflejo del agotamiento de la respuesta inmune policlonal o del estado de inmunosupresión que mantienen los animales infectados (Tabel y col., 1981). Por su parte, en infecciones de dos cepas diferentes de ratones con *T. brucei rhodesiense*, se ha encontrado que en la cepa de ratones donde se presentaron mayores parasitemias hubo menores títulos de anticuerpos, mientras que en la cepa de ratones donde las parasitemias fueron más bajas, la cantidad de anticuerpos fueron altos durante todo el estudio (Finerty y col., 1984).

Estas diferencias en los niveles de anticuerpos en los animales infectados por ambos aislados, pudieran estar directamente vinculadas con la capacidad de reproducción del parásito (virulencia) y su capacidad de producir inmunosupresión (una expresión de su patogenicidad). Empero, el control de la población de los tripanosomas no debe ser analizado solamente desde el punto de vista del hospedador, sino que también las diferencias genómicas y post-

genómicas que pudieran existir entre los diferentes aislados deben ser consideradas (Morrison y col., 2010; Gómez-Piñeres y col., 2014).

Por otra parte, históricamente siempre se ha pensado que el control de las parasitemias es completamente mediado por los anticuerpos anti-VSG (glicoproteínas variables de superficie). Sin embargo, este paradigma ha ido cambiando en vista de nuevos trabajos que demuestran por una parte, que ratones *knockout* (KO) del gen IFN- γ , son idénticamente susceptibles a aquellos con delección del sistema de inmunidad adaptativa y por otra parte, estos ratones KO IFN- γ , presentaron igualmente anticuerpos anti-VSG que ratones genéticamente enteros (Hertz y col., 1998; Mansfield y col., 2014). Esto ha permitido postular que la activación de los macrófagos por el IFN- γ permite la secreción de factores parasiticidas tales como el nitrógeno reactivo intermedio (RNI por sus siglas en inglés), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), que están directamente asociados a la resistencia de ratones a *T. brucei rhodesiense* y este fenómeno es independiente a la cantidad de anticuerpos anti-VSG (Mansfield y col., 2014).

Aunque estos estudios no han sido realizados en *T. vivax*, se puede inferir que la observación esperada de mayor parasitemia, mayor títulos de anticuerpos, es realmente al revés, debido a que quizás el aislado que logre modular mejor la respuesta inmunológica del hospedador a su favor (en la presente investigación fue TvLIEM176), inhibiendo la producción de los factores tripanolíticos como RNI,

TNF- α y ROS, podrá colonizar mejor la sangre del ovino infectado, lo que se pudiera traducir en mayor virulencia.

5.2.- Estudio proteómico de los dos aislados de *T. vivax* con diferente virulencia y patogenicidad

Con la intención de controlar la tripanosomosis bovina, se han desarrollado varios métodos de control, aunque el uso de drogas tripanocidas sigue siendo el principal método utilizado. Debido a la permanente aparición de cepas de tripanosomas resistentes a drogas, se han intensificado las investigaciones para métodos alternativos de control. Entre estas medidas, el desarrollo de una vacuna ha sido impedido por la existencia de las VSG, lo cual probablemente seguirá frustrando este proyecto por muchos años (Pays, 2006). Por otro lado, la utilización de razas tripanotolerantes representa una real esperanza para el desarrollo de ganado con producción más eficiente en zonas endémicas a la tripanosomosis.

Debido a que la completa eliminación del parásito del organismo es imposible por la presencia de las VSG, estos animales que muestran cierta habilidad para limitar las consecuencias de la infección (tripanotolerancia) son entonces favorecidos a través de un proceso de selección natural. Por esta razón, el novedoso concepto de una vacuna antienfermedad ha ganado popularidad desde su introducción décadas atrás por Playfar y col. (1990) en la lucha contra la malaria. En el contexto de la tripanosomosis, el objetivo de tal vacuna ya no sería una rápida eliminación del parásito sino más bien neutralizar los efectos patológicos de los tripanosomas.

Además, cuando la quimioterapia clásica falla o es poco sostenible, tratamientos de soporte pudieran estar contemplados, los cuales irían encaminados a contrarrestar parte de la patogénesis. Para estas llamadas "estrategias anti-enfermedad," se necesita un conocimiento preciso de las interacciones hospedador-parásito y de los factores parasitarios implicados en la patogénesis. Antoine-Moussiaux y col. (2009) realizaron una revisión profunda sobre algunos productos biológicamente activos de los tripanosomas que están implicados en la patogénesis de la enfermedad. El estudio de estos factores comienza por el conocimiento del "diálogo" que ocurre en la interacción hospedador-patógeno, para lo cual las técnicas proteómicas representan la mejor alternativa hoy en día.

La utilización de la electroforesis diferencial en doble dimensión (2D-DIGE) para el estudio de los aislados TvMT1 y TvLIEM176 permitió la identificación de algunas proteínas que son comunes en los dos aislados de *T. vivax*, pero que tienen expresión diferencial entre los mismos. Además, es muy importante recalcar que en el DIGE se utilizó también un aislado de *T. evansi* para seleccionar aquellas proteínas que tuvieran una mínima expresión en esta última especie.

Al analizar la Figura 20 y la Tabla 26, se puede observar que algunas proteínas fueron detectadas en más de un spot, lo cual indica que se están consiguiendo diferentes isoformas de la misma proteína debido a modificaciones postraduccionales. Es decir, las mismas secuencias polipeptídicas pero con algunas modificaciones postranscripcionales que alteran el pI o el PM de la proteína, cambiando la proteína *per se*. Las principales modificaciones

postraduccionales que se pueden conseguir en estos casos son la fosforilación, modificando el pI de la proteína y la glicosilación, modificando el PM de la misma (Rabilloud y col., 2010; Rabilloud y Lelong, 2011).

Cuando se analizaron las proteínas y su nivel de expresión para cada aislado se obtuvo información muy importante, ya que esto permitió clasificarlas de acuerdo a sus propiedades, estableciendo 4 grupos de proteínas: candidatas a vacunas o asociadas con inmunoprotección, asociadas a virulencia y/o patogenicidad, posibles blancos terapéuticos y candidatas para diagnóstico o con gran antigenicidad e inmunogenicidad. Esta clasificación fue realizada de acuerdo a la revisión en la literatura (Wang y Hewick, 1999; De Groot, 2006; Latterich y col., 2008; Silberring y Ciborowsky, 2009; Bumann, 2010; Cuervo y col., 2010), pero debido al conocimiento que se tiene de la fisiología de estos parásitos y de sus requerimientos para defenderse de los mecanismos de ataque del hospedador, estos grupos no son restrictivos. Por esta razón, al profundizar un poco sobre estas propiedades y algunas de las funciones mencionadas anteriormente, se encontrará que una misma proteína puede tener más de una propiedad, evidenciándose la multifuncionalidad de la mayoría de ellas.

La clasificación se realizó de la siguiente manera:

Proteínas candidatas a vacunas (Proteínas asociadas a inmunoprotección):

a) Con mayor expresión en el aislado TvLIEM176:

Proteína de choque térmico 70 o HSP70 (Spots 1979, 1986), Proteína 78 regulada por glucosa (spot 1986), Proteína paraflagelar 3 o PAR3 (Spot 559), Alfa tubulina (Spots 1919, 1979), Beta tubulina (Spots 1919, 1979, 1986).

b) Con mayor expresión en el aislado TvMT1:

Proteína rod paraflagelar 1 de 73 kDa o PFR1 (Spots 1903, 1906), Piruvato quinasa (Spot 758).

c) Con igual expresión para ambos aislados:

Tryparedoxin peroxidasa (Spot 1552), Proteína rod paraflagelar 2 o PFR2 (Spot 602), Proteína mayor rod paraflagelar (Spot 602), GADPH (Spot 1969), Fructosa-bifosfato aldolasa (Spot 985).

Proteínas asociadas a virulencia y/o patogenicidad:

a) Con mayor expresión en el aislado TvLIEM176:

ADN helicasa semejante a RuvB (Spot 1979), Arginina quinasa (Spot 1919), Proteína del complejo T, subunidad Theta (Spot 1986), Alfa tubulina (Spots 1919, 1979), Beta tubulina (Spots 1919, 1979, 1986).

b) Con mayor expresión en el aislado TvMT1:

ATP sintetasa vacuolar (Spot 1906).

c) Con igual expresión para ambos aislados:

Tryparedoxin peroxidasa (Spot 1552), GADPH (Spot 1969), Factor de elongación 1 alfa (Spot 845).

Proteínas posibles blancos terapéuticos:

a) Con mayor expresión en el aislado TvLIEM176:

Arginina quinasa (Spot 1919), Alfa tubulina (Spots 1919, 1979), Beta tubulina (Spots 1919, 1979, 1986), Proteína de choque térmico 70 o HSP70 (Spots 1979, 1986).

b) Con mayor expresión en el aislado TvMT1:

Proteína del complejo-T 1, subunidad alfa (Spot 758), Glicerol quinasa (Spot 793)

Inosin-5'-monofosfato deshidrogenasa o IMPDH (Spot 793).

c) Con igual expresión para ambos aislados:

Tryparedoxin peroxidasa (Spot 1552), GADPH (Spot 1969).

Proteínas Candidatas para diagnóstico (antigenicidad e inmunogenicidad):

a) Con mayor expresión en el aislado TvLIEM176:

Proteína de choque térmico 70 o HSP70 (Spots 1979, 1986).

b) Con mayor expresión en el aislado TvMT1:

Piruvato quinasa (Spot 758).

c) Con igual expresión para ambos aislados:

GADPH (Spot 1969).

Por esta razón, se irá haciendo una revisión de las proteínas más importantes y de las que existe mayor información acerca de su multifuncionalidad.

5.2.1.- Proteínas de choque térmico

Las proteínas pertenecientes a la familia HSP70 (Heat shock protein 70) son componentes centrales de muchos procesos celulares fundamentales, incluyendo empaquetamiento y ensamblaje de proteínas posterior a su síntesis, traslocación a través de membranas de proteínas secretorias, degradación proteolítica, entre otras, y para realizar funciones específicas requieren de la acción coordinada de chaperonas, como por ejemplo HSP90. A través de estas interacciones, estas chaperonas están involucradas en señales de transducción, regulación del ciclo celular, diferenciación y muerte celular programada. Este grupo de proteínas constituye uno de los más conservados en todos los organismos y se encuentra localizado en una variedad de compartimientos celulares como el citoplasma, retículo endoplasmático, mitocondria y cloroplastos (Folgueira y Requena, 2007). Particularmente en los tripanosomatídeos, los miembros de esta familia están localizados en el citoplasma (cy-hsp70), en mitocondria (mt-hsp70) y en retículo endoplasmático (grp78) (Krautz y col., 1998).

Las HSP70 son bien conocidas por su inmunogenicidad en muchas infecciones parasitarias, tales como leishmaniasis, malaria, shistosomiasis y oncocercosis. Son proteínas altamente abundantes y aun cuando son bastante similares a sus homólogas humanas debido a su alta conservación, poseen muchos determinantes extraños que inducen una fuerte respuesta inmune humoral y

celular durante la infección. En estudios realizados en *T. cruzi* se han detectado anticuerpos anti HSP70 en sueros de pacientes con infección crónica (Krautz y col., 1998; Flechas y col., 2009).

A pesar de su alto grado de conservación en eucariotas y procariotas, las proteínas de choque térmico 70 son altamente antigénicas y al menos dos miembros de esta familia han sido propuestos como candidatos para diagnóstico de la tripanosomosis en animales. Una HSP70 mitocondrial de *T. congolense* podría tener un potencial diagnóstico ya que se ha demostrado que provoca la producción de anticuerpos en ratones infectados (Bannai y col., 2003). Además, el principal antígeno invariante reconocido por bovinos infectados con *T. congolense* es una proteína de la familia de las HSP70, la proteína 78 regulada por glucosa (GPR78), también llamada proteína de unión luminal (BiP) (Authié y col., 1993; Boulangé y Authié, 1994). La BiP de *T. congolense* está estrechamente relacionada con otros miembros de la subfamilia de las BiP y tiene poca homología con la HSP70 mitocondrial descrita por Bannai y col. (2003). La antigenicidad de la HSP70/BiP de los tripanosomas en el hospedador mamífero parece resultar de un tramo C-terminal de 40 aminoácidos el cual es específico para el género *Trypanosoma*. Homólogos de BiP han sido reportados en *T. brucei* y *T. vivax* (Boulangé y col., 2002; Bangs y col., 1993; Boulangé y Authié, 1994).

En kinetoplastidos, el primer homólogo de BiP fue caracterizado en *T. brucei* por Bangs y col. (1993), quienes demostraron que esta proteína estaba localizada específicamente en el retículo endoplasmático de este tripanosoma. Poco tiempo

después, la homóloga en *T. cruzi*, llamada GRP78, fue también caracterizada (Tibbetts y col., 1994); y posteriormente la caracterización de un homólogo en *L. donovani*, igualmente llamada GRP78, también ha sido reportada (Jensen y col., 2001).

En los proteomas evaluados en esta investigación, la expresión de la HSP70 y la proteína 78 regulada por glucosa (GRP78) fue observada en el aislado TvLIEM176, el cual se considera el aislado más virulento de los dos estudiados, debido a los altos niveles de parasitemia presentados, lo cual hace suponer que estas proteínas pudieran actuar como agentes inmunomoduladores en el hospedador, y/o igualmente fungir como factor de virulencia para *T. vivax*. Las proteínas de choque térmico han sido descritas como antígenos inmunodominantes en muchos procesos autoinmunes, infecciosos y tumorales. Probablemente, la abundancia y conservación de estas proteínas contribuye a que sean unos blancos tan atractivos para el sistema inmunitario. Igualmente su actividad inmunomoduladora las convierten en candidatas a ser utilizadas como adyuvantes de vacunas (Rico y col., 1999; Planelles y col., 2001). Igualmente, siendo la HSP70 y la GRP78 antigénicas e inmunogénicas, son consideradas hoy en día como unas proteínas potenciales para el diagnóstico (Cooley y col., 2008; Bossard y col., 2010). En el caso específico de la GRP78, Jensen y col. (2001) lograron protección de ratones ante el desafío con *L. major*, por lo que es razonable considerar que esta proteína tiene el potencial para ser utilizado como vacuna.

En los parásitos, la respuesta de choque térmico juega un papel fundamental durante la invasión al hospedador, donde el aumento en la producción de HSP por parte del parásito se correlaciona con un incremento en su infectividad y patogenicidad. En infecciones producidas por parásitos como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Giardia*, *Schistosoma* y por algunos hongos patógenos como *Candida* o *Histoplasma*, se han encontrado HSP de los parásitos. Durante la invasión, los parásitos experimentan un cambio de temperatura que va desde los 22-28 °C en el vector transmisor hasta los 37 °C o más del hospedador mamífero. Es de suponer que no solo deben adaptarse al aumento de temperatura sino también a las diferentes condiciones del medio, como son el potencial redox (potencial óxidorreducción) y la presencia o ausencia de nutrientes y hormonas (Van der Ploeg y col., 1985; Maresca y Carratu, 1992).

Por otro lado, el parásito también se enfrenta a mecanismos de resistencia natural del hospedador como la fagocitosis, y dentro del fagocito a los productos oxidativos y las enzimas lisosomales. Puesto que los parásitos sufren un repentino y drástico cambio de la temperatura ambiental tras la infección, donde no hay tiempo de desarrollar la termotolerancia, la expresión constitutiva de las HSP, preadapta al parásito a las condiciones del hospedador mamífero, pero durante la respuesta de choque térmico, el parásito induce rápidamente los genes HSP, incrementando su síntesis e inhibiendo la de la mayoría de las proteínas (Folgueira y Requena, 2007).

En tripanosomatídeos como *Leishmania*, estos genes están implicados en la diferenciación de promastigotes a amastigotes (Van der Ploeg y col., 1985). La HSP70 es una de las HSP que participa en la protección de los eventos de *splicing* de los precursores policistrónicos de ARNm, así como en la prevención de la desnaturalización protéica debida a las altas temperaturas.

Recientemente, Evans y col. (2010) han propuesto que debido a la complejidad de las funciones realizadas por las HSP70 en las enfermedades, podría ser una buena estrategia inhibir o re-dirigir las funciones moleculares de estas chaperonas con agentes químicos, sugiriendo como vía prioritaria la modulación de su actividad ATPasa. En parte, este entusiasmo por las HSP70 como blancos terapéuticos se debe al éxito que se ha tenido con otras chaperonas, tales como la HSP90 (Powers y col., 2009). Sin embargo, hay muchas cuestiones aún sin resolver antes que las HSP70 sean consideradas completamente como blancos terapéuticos válidos. Por ejemplo, existen investigaciones acerca de las funciones *in vitro* de las HSP70 (actividad ATPasa, señales anti-apoptóticas, plegamiento proteico, entre otras), pero las relaciones entre cualquiera de estas funciones y el rol de las chaperonas HSP70 *in vivo* no están claras aún. Además, en cuanto a los compuestos utilizados hasta la fecha, hay mucha falta de información sobre su selectividad, por lo que parece probable que alguno de estos compuestos produzca su efecto por más de una vía lo cual podría excluir a las HSP70 como el blanco terapéutico específico.

Por otra parte, la familia de las HSP60, también llamadas chaperoninas, se encuentran en la mitocondria. La principal función de las chaperoninas es

secuestrar polipéptidos desplegados, ayudar en su plegamiento y prevenir su agregación molecular (Hartl y Hayer-Hartl, 2002; Folgueira y Requena, 2007). Su primera caracterización en kinetoplastidos fue hecha en *T. cruzi* por De Marval y col. (1993), y se determinó que su localización es en la matriz mitocondrial (Sullivan y col., 1994). Posteriormente, la HSP60 de *T. brucei* fue caracterizada y se preparó un anticuerpo monoclonal, a través del cual se demostró que esta proteína es de dos a cuatro veces más abundante en las formas procíclicas (en los insectos) que en los tripomastigotes sanguíneos (en los hospedadores mamíferos). La mayor expresión de la HSP60 en las formas procíclicas (las cuales contienen mitocondrias completamente activas) sugiere que la expresión de estas proteínas está adaptada a la función mitocondrial del parásito (Bringaud y col., 1995). Una HSP60 de *L. major* fue clonada y mostró ser un prominente antígeno en pacientes con leishmaniasis (Rey-Ladino y col., 1997).

En los proteomas de *T. vivax* analizados en este estudio, la HSP60 fue expresada por ambos aislados con una leve diferencia (mayor en TvLIEM176) en el aislado más virulento. Sin embargo, debido a la falta de información acerca de las propiedades de esta proteína, sería casi imposible especular el significado de esta expresión.

Dentro de la familia de las HSP60 o chaperoninas también se encuentran las proteínas del complejo T 1 o TCP1 (por su nombre en inglés, *T-complex protein 1*), las cuales tienen en su estructura cuaternaria una distintiva forma de anillo (Ellis y van der Vies, 1991). La principal función de estas chaperoninas consiste en el modelamiento y plegamiento de las tubulinas α y β , siendo necesarias para

el normal funcionamiento de estas últimas (Liang y MacRae, 1997). Sin embargo se ha propuesto que las tubulinas no son los únicos substratos importantes de la TCP1 y se conoce poco de las funciones de sus diferentes formas (TCP-1 α , TCP-1 β , TCP-1 ϵ , TCP-1 θ y TCP-1 γ).

En los proteomas de ambos aislados de *T. vivax* fueron detectadas las proteínas del complejo T 1; encontrándose en el aislado TvLIEM176 mayor expresión de la subunidad theta (θ); y en el aislado TvMT1 más expresada la subunidad alfa (α). Este hallazgo contrasta con los resultados reportados por Grébaut y col. (2009), quienes compararon la expresión de proteínas de secreción entre dos aislados de *T. congolense* que tenían diferencias en su virulencia y patogenicidad, encontrando que la subunidad theta estaba asociada con baja virulencia. En el caso de la presente investigación, la subunidad theta fue mayormente expresada en el aislado considerado más virulento (TvLIEM176), por lo que se puede suponer que en *T. vivax*, a diferencia de *T. congolense*, esta proteína podría ser un marcador de virulencia. Por otra parte, la subunidad alfa ha sido también reportada en *T. evansi* por Parra (2011) y en *T. brucei gambiense* por Geiger y col. (2010), quienes tampoco encontraron relación de esta proteína con virulencia ni con patogenicidad. Es conveniente destacar que en la presente investigación la subunidad alfa se expresó mayormente en el aislado considerado más patógeno (TvMT1), por lo que se consideraría un marcador de patogenicidad en *T. vivax*.

Algunas de estas moléculas, bajo condiciones de estrés, son capaces de prevenir la desnaturalización de las proteínas mientras que otras pueden disociar

agregados proteicos, reensamblar monómeros o dirigir la destrucción proetolítica (Liang y MacRae, 1997). Dada esta función, las TCP-1 se convierten en un atractivo blanco para el diseño de drogas tripanocidas. El diseño de drogas efectivas dirigidas hacia componentes del citoesqueleto del parásito o hacia moléculas cooperadoras en su ensamblaje, conllevaría a la disminución tanto de la vitalidad como de la proliferación de las formas circulantes en el hospedador.

5.2.2.- Proteínas de la barra paraflagelar (Rod paraflagelar)

En los tripanosomas, el flagelo es una estructura vital no solo para la motilidad del parásito y por ende para su supervivencia, sino también para la morfogénesis celular, división celular, evasión de la respuesta inmune, infección y patogénesis (Ralston y col., 2009; Cuervo y col., 2010; Koyfman y col., 2011) y hoy por hoy es considerado un importante factor de virulencia y blanco terapéutico (Ginger y col., 2008). A todo lo largo del flagelo, corre una estructura estrechamente relacionada, llamada la barra paraflagelar, la cual es uno de los pocos componentes únicos que caracterizan a los kinetoplastos y ha sido motivo de muchas especulaciones desde su descubrimiento en 1962 (Vickerman, 1962). La barra paraflagelar de los tripanosomatídeos es una estructura compleja, trilaminar, semejante a un enrejado con unos dominios proximal, medio y distal bastante definidos, la cual se encuentra fijada a través de proteínas al cuerpo del protozoario.

A través de estudios con anticuerpos monoclonales y estudios proteómicos se han identificado más de 40 proteínas de la barra paraflagelar (Bastin y col., 1998; Broadhead y col., 2006; Portman y col., 2009). Entre ellas, la proteína rod

paraflagelar 1 o PFR1 (73 kDa) y la proteína rod paraflagelar 2 o PFR2 (69 kDa) son los principales componentes estructurales de la barra paraflagelar (Deflorin y col., 1994; Gadelha y col., 2004).

La proteína PFR1 es uno de los principales componentes estructurales del flagelo de los tripanosomas y ha sido identificado como un complejo formado por filamentos que se expresa en todos los estadios de este protozoario donde se encuentra presente el flagelo (Michailowsky y col., 2003). Esta proteína ha sido identificada como un blanco atractivo capaz de generar una respuesta inmune protectora contra algunas especies de tripanosomas. También se ha descrito que la PFR2 tiene potencial como vacuna contra infecciones causadas por *Leishmania mexicana* (Saravia y col., 2005), dado que la vacunación con PFR2-DNA retarda la aparición o reduce significativamente las lesiones en hámsteres. Además, las proteínas paraflagelares no tienen homología en secuencia de aminoácidos, similitud ultraestructural ni reactividad cruzada con la tubulina, actina o ninguna otra proteína presente en las células de los mamíferos (Michailowsky y col., 2003).

Estos hallazgos de que las proteínas paraflagelares pudieran servir como potenciales candidatos a vacunas fueron confirmados también en *T. cruzi*, donde la inmunización de ratones produjo una respuesta protectora contra la infección experimental con este protozoario, aumentando la expresión de IL-2 e IFN- γ (Morell y col., 2006) y disminuyendo la parasitemia considerablemente (Luhrs y col., 2003). Así mismo, en *T. evansi* se ha demostrado que la PFR1 y la PFR2

son esencialmente antigénicas e inmunogénicas, existiendo una gran homología entre ambas (Abdille y col., 2008a; 2008b).

Se ha determinado que la inmunización con PFR purificada a partir de epimastigotes de *T. cruzi* genera una protección completa en ratones (Portman y Gull, 2010). Particularmente en esta especie de tripanosoma, la PFR ha sido descrita como un antígeno intracelular que está asociado a una estructura (flagelo) que solo está presente en las formas extracelulares y no en los amastigotes intracelulares. Sin embargo, se ha encontrado que sueros de humanos y animales infectados con el parásito son capaces de reconocer a la PFR.

En *L. mexicana* se ha sugerido que esto podría ocurrir tras la degradación del flagelo durante la transición de promastigote a amastigote (Saravia y col., 2005). Sin embargo, es importante recordar que en *T. vivax* no existe ninguna forma evolutiva intracelular ni carente de flagelo, por lo que es lógico suponer que no se pueden seguir las mismas reglas en esta especie que en otros tripanosomatídeos. Además de lo anterior y considerando el hallazgo de las proteínas paraflagelares en los aislados estudiados en esta investigación, sería interesante evaluar el papel real que ellas juegan en la virulencia y patogenicidad de *T. vivax*, además de su posible utilización en la inmunización.

Además de potenciales candidatos a vacunas, recientemente las proteínas paraflagelares han cobrado interés especial como posibles blancos terapéuticos (Ralston y Hill, 2008; Portman y Gull, 2010; Hughes y col., 2012).

5.2.3.- Tubulina

Los microtúbulos son proteínas del citoesqueleto que están presentes en todas las células eucariotas y son especialmente abundantes en los tripanosomatídeos (Rasooly y Balaban, 2004; Li y col., 2007). Están compuestos de tubulina y otras proteínas asociadas a los microtúbulos. La tubulina es un constituyente fundamental del citoesqueleto de los kinetoplastidos, de la maquinaria de división celular y de los organelos móviles (Gull, 2001). Hay una gran familia de proteínas de tubulina pero el heterodímero α/β es el material esencial para la construcción del citoesqueleto de microtúbulos (McKean y col., 2001; Jackson y col., 2006). Los parásitos tripanosomatídeos poseen una amplia gama de microtúbulos citoplasmáticos, mitóticos y flagelares y reciente evidencia sugiere que la expresión de la tubulina varía ampliamente durante el ciclo de vida de *Trypanosoma* spp. y *Leishmania* spp., posiblemente debido a la variación de la demanda relativa de estas estructuras (Coulson y col., 1996; Gonzalez-Pino y col., 1999). De hecho, en algunas especies, diferentes isoformas de tubulina pueden tener perfiles de expresión específicos relacionados con el ciclo de vida parasitaria, por ejemplo, *L. mexicana* tiene una isoforma de β -tubulina única para la fase de amastigote encontrado dentro de los macrófagos humanos (Bellatin y col., 2002).

Se ha demostrado en *T. brucei* que α y β tubulina comparten regiones antigénicas homólogas, presumiblemente correspondientes a una región de aproximadamente 40% de sus aminoácidos que son homólogos entre ellas (Woods y col., 1989).

En el presente estudio se encontraron diferentes isoformas de ambas tubulinas, hecho demostrado por la identificación de estas proteínas en diferentes spots (variaciones en su peso molecular y/o punto isoeléctrico). Es bien sabido que cada una de las dos tubulinas pueden estar codificadas por uno o por varios genes (familias de genes), produciendo tubulinas idénticas o no idénticas. Incluso la detección de diferentes isoformas mediante métodos electroforéticos pudiera significar diferentes isoformas debido a diferentes secuencias de aminoácidos o debido a modificaciones postranscripcionales (Schneider y col., 1987).

En general se conoce muy poco de la real significancia que pudieran tener estas modificaciones. Se ha postulado que la generación de distintas isoformas está íntimamente ligada a la cinética de los microtúbulos de ensamblaje; sin embargo su verdadera importancia pudiera estar en el pool de la tubulina no polimerizada. Según esta hipótesis, las isoformas proporcionarían un medio por el cual el parásito podría dividir la tubulina en subgrupos de diferente importancia con respecto a algunas propiedades tales como ensamblaje, regulación o degradación. Aunque existe poca evidencia para apoyar dicha afirmación debe seguir siendo una posibilidad (Sasse y Gull, 1988).

Debido a su imprescindible rol en la organización celular y del citoesqueleto, en los últimos años se han realizado algunas investigaciones procurando utilizar a las tubulinas de los kinetoplastidos como importantes blancos terapéuticos, bloqueando su función tal y como se ha venido haciendo en el tratamiento de

algunas formas de cáncer y en las helmintosis (Werbovets y col., 2003; Yakovich y col., 2006; Morgan y Werbovets, 2008).

Por otra parte, debido a su gran antigenicidad, su uso como potenciales vacunas ha resultado en algunos éxitos relativos que deben ser considerados al estudiar estas proteínas. Lubega y col. (2002) demostraron que ratones vacunados con tubulina nativa purificada de *T. brucei* tuvieron protección contra infecciones de *T. brucei*, *T. congolense* y *T. rhodesiense*. Igualmente, Li y col. (2007) inmunizaron ratones con una beta tubulina recombinante de *T. evansi* lo cual produjo protección contra desafíos experimentales de *T. evansi*, *T. equiperdum* y *T. b. brucei*. Aunque estos estudios confirman que la tubulina por sí sola es suficiente para inducir una respuesta inmune protectora, en ninguno de los ensayos se determinó con certeza cuál componente exacto de la proteína es la que tiene dicha propiedad ni quedó claro el mecanismo por el cual es inducida esta protección.

Hay que recordar que la tubulina es un antígeno interno (subcelular) por lo que cuesta comprender cómo induce una inmunidad protectora. Sin embargo, hay suficiente evidencia que algunos de estos antígenos subcelulares, en su forma pura, inducen una respuesta inmune fuerte y protectora. Aunque las células del sistema inmunitario pudieran no tener acceso a ellos, los anticuerpos que inducen pudieran ser internados a la célula por mecanismos aún no comprendidos (Balaban y col., 1995).

En la presente investigación, tanto la alfa como la beta tubulina tuvieron una mayor expresión en el aislado TvLIEM176, considerado el más virulento de los

dos estudiados, por lo que es comprensible la sospecha de que estas proteínas pudieran ser señaladas como marcadores de virulencia para *T. vivax*. Estos resultados coinciden con los reportados por Grébaut y col. (2009), quienes al estudiar proteínas secretadas de dos aislados de *T. congolense* con diferencias en su virulencia y patogenicidad, encontraron que ambas tubulinas tuvieron una alta correlación con la virulencia, teniendo una expresión significativamente mayor en el aislado más virulento.

5.2.4.- Arginina Quinasa

Los sistemas ATP basados en fosfágenos (fosfocreatina y fosfoarginina) mantienen la homeostasis del ATP durante los períodos de alta demanda energética celular. La fosfoarginina es la principal reserva de energía en invertebrados, siendo catalizada por la arginina quinasa (AK), una enzima que no se consigue en células de mamíferos. La AK es una enzima que cataliza la transferencia reversible de un grupo fosforilo (PO_4) de la fosforilarginina a una adenosina difosfato (ADP), generando adenosina trifosfato (ATP) y arginina. La AK pertenece a la familia de fosfágenos (guanidinio) quinasas, enzimas altamente conservadas, que presentan dos dominios ATP-guanido fosfotransferasa: uno en la región N-terminal y otro en la región C-terminal. Se halla involucrada en procesos biológicos que requieren de gran demanda energética, como el movimiento flagelar y transporte de iones, resultando imprescindible para la supervivencia del parásito (Ellington, 2001).

La arginina quinasa ha sido demostrada en *T. cruzi* y *T. brucei* previamente (Pereira y col., 1999, 2000, 2002), localizándose de manera subcelular en

estructuras aún no definidas con forma y cantidad similar a los glicosomas (Miranda y col., 2009). La arginina quinasa ha sido vinculada como factor de virulencia en *T. congolense* y en *T. cruzi* ya que se ha visto que la sobreexpresión de esta proteína mejora la capacidad infectante del parásito, permitiéndole crecer y sobrevivir bajo condiciones de estrés nutricional y de pH (Grébaud y col., 2009; Pereira y col., 2003). Además, el tratamiento de epimastigotes de *T. cruzi* con peróxido de hidrógeno ha mostrado un incremento tiempo-dependiente en la expresión de arginina quinasa, sugiriendo la participación de este sistema de fosfágeno en la respuesta al estrés oxidativo (Miranda y col., 2006).

En la presente investigación, la arginina quinasa tuvo una expresión mucho mayor en el aislado TvLIEM176, considerado como de mayor virulencia, por lo que es probable que esta enzima represente un factor de virulencia para *T. vivax* tal como lo hace para otras especies de tripanosomas.

Por otra parte, el hecho de conseguir en estos protozoarios un sistema fosfágeno y su vía biosintética, el cual es totalmente diferente a los encontrados en células de mamíferos, pone a la arginina quinasa en la mira como un posible blanco terapéutico (Pereira y col., 2002).

5.2.5.- Proteínas asociadas al metabolismo energético

El metabolismo energético de los tripanosomatídeos ocurre principalmente en unos organelos intracelulares llamados glicosomas (Michels y col., 2006). Los glicosomas fueron descubiertos inicialmente en *T. brucei* (Opperdoes y Borst, 1977). Estos organelos contienen la mayoría de las enzimas glicolíticas y de ahí proviene su designación como glicosomas. Esta compartimentalización de la

glicólisis dentro de organelos es única, ya que en otros organismos este proceso metabólico es esencialmente citosólico. Posteriormente al hallazgo de Oppendoes y Borst (1977), los glicosomas fueron encontrados en otros protozoarios, todos pertenecientes al orden Kinetoplastida (Moyersoen y col., 2004). Estos organelos pertenecen a la familia de los peroxisomas y el 90 % de las proteínas que contienen son enzimas glicolíticas. Dentro de estas enzimas están la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), glicerol quinasa y la inosin-5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH).

Las enzimas que se encuentran dentro de los glicosomas han recibido gran atención últimamente debido a lo especializado de este compartimento y tomando en cuenta también que son la principal fuente de energía de los tripanosomas cuando se encuentran dentro del hospedador mamífero (Michels y col., 2006).

La GADPH es considerada como un prometedor blanco terapéutico (Callens y Hannaert, 1995; Cáceres y col., 2010), así como un excelente candidato para diagnóstico en *T. brucei*, debido a su gran antigenicidad e inmunogenicidad (Tanaka y col., 2004). En el presente estudio esta enzima presentó igual nivel de expresión en ambos aislados (TvMT1 y TvLIEM176) por lo que pudiera pensarse que en *T. vivax* también pudiera tener ambas propiedades.

Por otra parte, la glicerol quinasa ha sido objeto de estudio principalmente en *T. congolense* como un blanco terapéutico. Sin embargo, un estudio realizado por Ohashi-Suzuki y col. (2011) demostró que las propiedades y los niveles de expresión de la glicerol quinasa fueron diferentes entre *T. congolense* y *T. vivax*.

De hecho, el efecto *in vitro* del ascofuranone, un potente inhibidor de esta enzima, fue mucho mayor en *T. congolense*, indicando que la actividad de esta enzima fue mucho menor en *T. vivax* que en *T. congolense*. Sin embargo, es importante aclarar que en la presente investigación, la glicerol quinasa tuvo un nivel de expresión mayor en el aislado TvMT1, considerado más patógeno que TvLIEM176, por lo que probablemente su expresión esté relacionada con niveles de patogenicidad en *T. vivax*.

Igualmente, la IMPDH es una enzima imprescindible para la supervivencia de los tripanosomas por lo que ha sido estudiada como un posible blanco terapéutico, procurando su inhibición (Wilson y col., 1994; Bessho y col., 2013). En los aislados estudiados en esta investigación la IMPDH tuvo mayor expresión en el aislado TvMT1 por lo que podría ser, al igual que la glicerol quinasa, un marcador de patogenicidad.

Como puede inferirse a partir de los resultados presentados acá, son muchos los desafíos y retos que quedan en cuanto a la investigación relacionada con la proteómica de *T. vivax*. Es de extraordinaria importancia la distancia genética y por lo tanto fenotípica observada entre diferentes aislados de *T. vivax* (Dirie y col., 1993; Cortez y col., 2006; Hamilton, 2012). Esta divergencia podría ser la principal causa de las grandes diferencias en niveles de expresión de proteínas tales como las observadas en la presente investigación por lo que resulta imperativo el análisis muy cuidadoso de diferentes aislados de *T. vivax* en aras de obtener conclusiones definitivas que puedan conllevar a establecer con certeza patrones de virulencia y patogenicidad específicos.

En líneas generales, durante la presente investigación se demostraron diferencias en la presentación y severidad de la enfermedad en ovinos inoculados con dos aislados de *T. vivax*. Estas diferencias bien podrían deberse a diferencias genéticas entre ambos aislados, así como a diferencias en las respuestas inmunitarias de los hospedadores. Sin embargo, a nivel proteómico también se demostraron diferencias en la expresión de proteínas que pudieran estar asociadas a la virulencia o la patogenicidad demostradas por cada aislado de *T. vivax*.

VI. CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

1.- La infección experimental de ovinos con dos aislados de *T. vivax* produjo diferencias entre ambos grupos experimentales.

2.- Los niveles de parasitemia fueron más elevados en los animales inoculados con el aislado TvLIEM176, observándose diferencias significativas tanto con el grupo control como con el grupo infectado con el aislado TvMT1.

3.- Los signos clínicos presentados en los animales infectados con el aislado TvMT1 fueron más severos que los presentados por los animales inoculados con el aislado TvLIEM176, apreciándose diferencias significativas en los valores clínicos (temperatura corporal, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria) entre los grupos estudiados.

4.- Los animales infectados con TvMT1 sufrieron una importante disminución del hematocrito y la hemoglobina, con presentación de anemia mucho más severa que los animales del grupo TvLIEM176. Se demostraron diferencias significativas entre los tres grupos de la investigación en estas dos variables hematológicas.

5.- En ambos grupos infectados hubo una disminución en la concentración de las proteínas totales y en el número de leucocitos circulantes, sin que se encontrasen diferencias significativas entre los grupos experimentales, pero sí entre éstos y el grupo control.

6.- En ambos grupos también se produjo una clara producción de anticuerpos específicos anti-*T. vivax*. Los niveles de anticuerpos fueron mayores en el aislado

TvMT1, por lo que se considera que este aislado fue el más antigénico de los dos aislados evaluados.

7.- Como consecuencia de lo anterior, puede considerarse que el aislado TvLIEM176 fue más virulento que el aislado TvMT1, en tanto que el aislado TvMT1 fue más patógeno que el aislado TvLIEM176.

8.- El análisis proteómico de ambos aislados de *T. vivax* permitió la identificación de proteínas de gran importancia para la biología del parásito, particularmente para el establecimiento de la infección, encontrándose diferencias importantes en la expresión de proteínas entre los dos aislados.

9.- Las proteínas con mayor expresión en el aislado TvLIEM76 (factores asociados a virulencia) fueron: GRP78, PAR3, alfa tubulina, beta tubulina, HSP70, arginina quinasa, TCP1 θ .

10.- Las proteínas con mayor expresión en el aislado TvMT1 (factores asociados a patogenicidad) fueron: PFR1, piruvato quinasa, ATA sintetasa vacuolar, TCP1 α , glicerol quinasa, IMPDH.

11.- Las proteínas con expresión similar entre ambos aislados de *T. vivax* fueron: Tryparedoxin peroxidasa, PFR2, GADPH, Factor de elongación 1 α .

12.- Se ha podido constatar por primera vez una expresión proteica diferencial entre aislados venezolanos de *T. vivax* con diferencias en su virulencia y patogenicidad.

VII. RESUMEN

7.- RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue realizar una evaluación clínica, patológica y proteómica de dos aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*.

Para el estudio se utilizaron dos aislados venezolanos de *T. vivax* identificados como TvLIEM176 y TvMT1. Los criopreservados fueron expandidos inicialmente en cuatro ovinos de dos años de edad (dos animales para cada aislado). De estos animales se obtuvo sangre para la inoculación de los animales experimentales y además se realizó la purificación de cada aislado para su análisis proteómico.

Los grupos experimentales estuvieron conformados por 9 ovejos mestizos de 18 meses de edad los cuales se dividieron en tres grupos de 3 animales cada uno: inoculados con el aislado TvLIEM176 (grupo 1), inoculados con el aislado TvMT1 (grupo 2) y animales controles (grupo 3). Las inoculaciones se realizaron con 10^6 tripanosomas/animal por vía intravenosa para cada animal respectivamente.

Se realizaron evaluaciones clínicas (determinación de la temperatura corporal, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, además de cualquier otro signo clínico que pudiera presentarse), hematológicas (determinación de la parasitemia, hematocrito, hemoglobina, proteínas totales, conteo de glóbulos blancos y conteo diferencial de los mismos) y serológicas mediante la técnica de ELISA. El análisis proteómico se realizó a través de electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) acoplado a espectrometría de masas.

Se observó mayor aumento de la temperatura (hasta 40 °C) en los animales infectados con el aislado TvMT1, aunque la parasitemia fue mayor ($1,2 \times 10^7$ tripanosomas/ml) en los animales infectados con TvLIEM176. Los signos clínicos observados en los animales experimentales incluyeron letargia, anorexia, debilidad, palidez de mucosas con tinte icterico, linfadenomegalia, secreciones oculares, edemas, orquitis y enflaquecimiento progresivo, siendo más graves en los animales infectados con el aislado TvMT1. Igualmente, las alteraciones en los demás signos vitales (frecuencia cardiaca y respiratoria) fueron más severas en los animales inoculados con el aislado TvMT1.

Se obtuvieron 17 spots que correspondieron a proteínas comunes pero con expresión diferencial entre ambos aislados. Las proteínas identificadas fueron clasificadas de acuerdo a sus propiedades como: candidatas a vacunas (asociadas a inmunoprotección), asociadas a virulencia y/o patogenicidad, posibles blancos terapéuticos y candidatas para diagnóstico (con alta antigenicidad e inmunogenicidad). Las proteínas con mayor expresión en el aislado TvLIEM176 (factores asociados a virulencia) fueron: proteína 78 regulada por glucosa (GRP78), proteína paraflagelar 3 (Par3), alfa tubulina, beta tubulina, proteína de choque térmico 70 (HSP70), arginina quinasa, proteína del Complejo T 1, subunidad theta (TCP1 θ); las de mayor expresión en el aislado TvMT1 (factores asociados a patogenicidad) fueron: proteína rod paraflagelar 1 (PFR1), piruvato quinasa, ATP sintetasa vacuolar, proteína del Complejo T 1, subunidad alfa (TCP1 α), glicerol quinasa, Inosin-5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH); y las que presentaron expresión similar entre ambos aislados de *T. vivax* fueron: Tryparedoxin peroxidasa, proteína rod paraflagelar 2 (PFR2),

Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), Factor de elongación 1 α .

Se concluye que el aislado TvMT1 es más patógeno, mientras que el aislado TvLIEM176 es más virulento.

VIII. SUMMARY

8.- SUMMARY

The aim of this study was to perform a clinical, pathological and proteomic evaluation of two Venezuelan isolates of *Trypanosoma vivax*.

For this, two Venezuelan isolates of *T. vivax* from different geographical areas were used, identified as TvLIEM176 and TvMT1. These isolates were expanded in four sheep (two animals for each isolate). Blood from these animals was obtained for experimental inoculation and for parasite purification and proteomic analysis.

Experimental groups were conformed for nine (9) mixed-breed sheep about eighteen (18) months old, divided into three groups: TvLIEM176 (group 1), TvMT1 (group 2) and control (group 3). Each animal was inoculated with 10^6 trypanosomes by intravenous injection.

Clinical (body temperature, heart rate, respiratory rate and any other clinical sign) blood (parasitemia, hematocrit, hemoglobin, serum total protein, white blood cell count and leukogram) and serological (ELISA) evaluations were performed. Proteomes were analyzed by two-dimensional differential in-gel electrophoresis (2D-DIGE) coupled to mass spectrometry.

Higher increase in temperature (up to 40 ° C) was observed in the TvMT1-infected animals but parasitaemia was higher (1.2×10^7 trypanosomes/ml) in TvLIEM176-infected animals. The clinical signs observed in experimental animals included lethargy, anorexia, weakness, pale mucous membranes jaundiced, lymphadenopathy, ocular secretions, edema, orchitis and progressive

emaciation, being more severe in infected animals with TvMT1 isolate. Similarly, alterations in other vital signs (heart and respiratory rate) were more severe in animals infected with TvMT1 isolate.

We obtained 17 spots corresponding to common proteins but differential expression between both isolates. The proteins were classified according their properties as: vaccine candidates (associated to immunoprotection), associated to virulence and/or pathogenicity, chemotherapeutic targets and diagnostic candidates (antigenicity and immunogenicity). The proteins with higher expression in TvLIEM176 isolate (virulence factors) were: glucose-regulated protein 78 (GRP78), paraflagellar 3 protein (Par3), tubulin alpha, beta tubulin, heat shock protein 70 (HSP70), arginine kinase, T-complex protein 1 theta subunit (TCP1 θ). The proteins with higher expression in TvMT1 isolate (pathogenicity factors) were: 73 kDa paraflagellar rod protein (PFR1), pyruvate kinase, vacuolar ATP synthase, T-complex protein 1 subunit alpha (TCP1 α), glycerol kinase, Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH). The proteins with similar expression level in both isolates were: Tryparedoxin peroxidase, paraflagellar rod protein 2 (PFR2), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH), elongation factor 1-alpha.

We conclude that TvMT1 is the most pathogen isolated, while the TvLIEM176 was the most virulent isolate.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdille, M. H.; Li, S. Y.; Ding, J.; Suo, X. 2008a. *Trypanosoma evansi*: Paraflagellar rod protein 1 and 2 are similar but lack common B cell epitopes. *Exp. Parasitol.* 120, 411-416.
- Abdille, M. H.; Li, S.Y.; Jia, Y.; Suo, X.; Mkoji, G. 2008b. Evidence for the existence of paraflagellar rod protein 2 (PFR2) gene in *Trypanosoma evansi* and its conservation among other kinetoplastid parasites. *Exp. Parasitol.* 118(4): 614-618. doi: 10.1016/j.exppara.2007.11.011.
- Abrão, D. C.; de Carvalho, A. U.; Filho, E. J. F.; Saturnino, H. M.; Ribeiro, M. F. B. 2009. Impacto econômico causado por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino leiteiro no Estado de Minas Gerais. *Ciência Animal Brasileira - Suplemento 1*: 672-676. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria
- Ahmad, M.; Tuteja, R. 2012. *Plasmodium falciparum* RuvB proteins: Emerging importance and expectations beyond cell cycle progression. *Commun. Integr. Biol.* 5(4): 350-361.
- Ahn, N. G.; Wang, A. H. 2008. Proteomics and genomics: perspectives on drug and target discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12(1): 1-3. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.02.016.
- Alban, A.; David, S. O.; Bjorkesten, L.; Anderson, C.; Sloge, E.; Lewis, S.; Currie, I. 2003. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics.* 3: 36-44.
- Andersen, J. S.; Mann M. 2000. Functional proteomics by mass spectrometry. *FEBS Lett.* 480(1): 25-31.
- Anderson, N. G.; Anderson, N. L. 1996. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis.* 17(3): 443-453.
- Anosa, V. O. 1988a. Haematological and biochemical changes in human and animal trypanosomiasis. Part I. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 41(1): 65-78.
- Anosa, V. O. 1988b. Haematological and biochemical changes in human and animal trypanosomiasis. Part II. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 41(2): 151-164.
- Anosa, V. O.; Isoun, T. T. 1980. Haematological studies on *Trypanosoma vivax* infection of goats and intact and splenectomized sheep. *J. Comp. Path.* 90: 155-168.
- Antoine-Moussiaux, N.; Büscher, P.; Desmecht, D. 2009. Host-parasite interactions in trypanosomiasis : on the way to an antidisease strategy. *Infect. Immun.* 77: 1276-1284.

- Archakov, A. I.; Ivanov, Y. D.; Lisitsa, A. V.; Zgoda, V. G. 2007. AFM fishing nanotechnology is the way to reverse the Avogadro number in proteomics. *Proteomics*. 7(1): 4-9.
- Atwood III, J. A.; Weatherly, D. B.; Minning, T. A.; Bundy, B.; Cavola, C.; Opperdoes, F. R.; Orlando, R.; Tarleton, R. L. 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*. 309(5733): 473-476.
- Audu, P.A.; Esievo, K. A. N.; Mohammed, G.; Ajanusi, O. J. 1999. Studies of infectivity and pathogenicity of an isolate of *Trypanosoma evansi* in Yankasa sheep. *Vet. Parasitol.* 86: 185-190.
- Authié, E.; Muteti, D. K.; Williams, D. J. 1993. Antibody responses to invariant antigens of *Trypanosoma congolense* in cattle of differing susceptibility to trypanosomiasis. *Parasite Immunol.* 15(2):101-111.
- Auty, H.; Anderson, N. E.; Picozzi, K.; Lembo, T.; Mubanga, J.; Hoare, R.; Fyumagwa, R. D.; Mable, B.; Hamill, L.; Cleaveland, S.; Welburn, S. C. 2012. Trypanosome diversity in wildlife species from the Serengeti and Luangwa Valley ecosystems. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(10):e1828. doi: 10.1371/journal.pntd.0001828.
- Balaban, N.; Waithaka, H. K.; Njogu, A. R.; Goldman, R. 1995. Intracellular antigens (microtubule-associated protein copurified with glycosomal enzymes) - possible vaccines against trypanosomiasis. *J. Infect. Dis.* 172: 845-850.
- Bangs, J.D.; Uyetake, L.; Brickman, M. J.; Balber, A. E.; Boothroyd, J. C. 1993. Molecular cloning and cellular localization of a BiP homologue in *Trypanosoma brucei*. Divergent ER retention signals in a lower eukaryote. *J. Cell Sci.* 105: 1101-1113.
- Banks, R. E.; Dunn, M. J.; Hochstrasser, D. F.; Sanchez, J. C.; Blackstock, W.; Pappin, D. J.; Selby, P. J. 2000. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet*. 356(9243): 1749-1756.
- Bannai, H.; Sakurai, T.; Inoue, N.; Sugimoto, C.; Igarashi, I. 2003. Cloning and expression of mitochondrial Heat Shock Protein 70 of *Trypanosoma congolense* and potential use as a diagnostic antigen. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10: 926-933.
- Bastin, P.; Sherwin, T.; Gull, K. 1998. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature*. 391: 548.
- Batista, J. S.; Bezerra, F. S. B.; Lira, R. A.; Carvalho, J. R. G.; Rosado Neto, A. M.; Petri A. A.; Teixeira M. M. G. 2008. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 28(1): 63-69.
- Batista, J. S.; Riet-Correa, F.; Barbosa, R. C.; Guerra, J. L. 2006. Infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 26(1): 31-37

Batista, J. S.; Riet-Correa, F.; Teixeira, M. M.; Madruga, C. R.; Simões, S. D.; Maia, T. F. 2007. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Vet. Parasitol.* 143(2): 174-181.

Batista, J. S.; Rodrigues, C. M.; García, H. A.; Bezerra, F. S.; Olinda, R. G.; Teixeira, M. M.; Soto-Blanco, B. 2011. Association of *Trypanosoma vivax* in extracellular sites with central nervous system lesions and changes in cerebrospinal fluid in experimentally infected goats. *Vet Res.* 42: 63. doi: 10.1186/1297-9716-42-63.

Batista, J. S.; Rodrigues, C. M.; Olinda, R. G.; Silva, T. M.; Vale, R. G.; Câmara, A. C.; Rebouças, R. E.; Bezerra, F. S.; García, H. A.; Teixeira, M. M. 2012. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. *Parasitol. Res.* 110(1): 73-80.

Bauw, G.; Van Damme, J.; Puype, M.; Vandekerckhove, J.; Gesser, B.; Ratz, G. P.; Lauridsen, J. B.; Celis, J. E. 1989. Protein-electroblotting and microsequencing strategies in generating protein data bases from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86(20): 7701-7705.

Barros-Alvarez, X.; Gualdrón-López, M.; Acosta, H.; Cáceres, A. J.; Graminha, M. A.; Michels, P. A.; Concepción, J. L.; Quiñones W. 2014. Glycosomal targets for anti-trypanosomatid drug discovery. *Curr. Med. Chem.* 21(15): 1679-1706.

Bellatin, J. A.; Murray, A. S.; Zhao, M.; McMaster, W. R. 2002. *Leishmania mexicana*: Identification of genes that are preferentially expressed in amastigotes. *Exp. Parasitol.* 100: 44-53.

Bengaly, Z.; Sidibe, I.; Ganaba, R.; Desquesnes, M.; Boly, H.; Sawadogo, L. 2002. Comparative pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: clinical observations and haematological changes. *Vet. Parasitol.* 108(1): 1-19.

Bente, M.; Harder, S.; Wiesgigl, M.; Heukeshoven, J.; Gelhaus, C.; Krause, E.; Clos, J.; Bruchhaus, I. 2003. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 3: 1811-1829.

Berriman, M.; Ghedin, E.; Hertz-Fowler, C.; Blandin, G.; Renaud, H.; Bartholomeu, D. C.; Lennard, N. J.; Caler, E.; Hamlin, N. E.; Haas, B.; Böhme, U.; Hannick, L.; Aslett, M. A.; Shallom, J.; Marcello, L.; Hou, L.; Wickstead, B.; Alsmark, U. C.; Arrowsmith, C.; Atkin, R. J.; Barron, A. J.; Bringaud, F.; Brooks, K.; Carrington, M.; Cherevach, I.; Chillingworth, T. J.; Churcher, C.; Clark, L. N.; Corton, C. H.; Cronin, A.; Davies, R. M.; Doggett, J.; Djikeng, A.; Feldblyum, T.; Field, M. C.; Fraser, A.; Goodhead, I.; Hance, Z.; Harper, D.; Harris, B. R.; Hauser, H.; Hostetler, J.; Ivens, A.; Jagels, K.; Johnson, D.; Johnson, J.; Jones, K.; Kerhornou, A. X.; Koo, H.; Larke, N.; Landfear, S.; Larkin, C.; Leech, V.; Line, A.; Lord, A.; Macleod, A.; Mooney, P. J.; Moule, S.; Martin, D. M.; Morgan, G. W.;

- Mungall, K.; Norbertczak, H.; Ormond, D.; Pai, G.; Peacock, C. S.; Peterson, J.; Quail, M. A.; Rabbinowitsch, E.; Rajandream, M. A.; Reitter, C.; Salzberg, S. L.; Sanders, M.; Schobel, S.; Sharp, S.; Simmonds, M.; Simpson, A. J.; Tallon, L.; Turner, C. M.; Tait, A.; Tivey, A. R.; Van Aken, S.; Walker, D.; Wanless, D.; Wang, S.; White, B.; White, O.; Whitehead, S.; Woodward, J.; Wortman, J.; Adams, M. D.; Embley, T. M.; Gull, K.; Ullu, E.; Barry, J. D.; Fairlamb, A. H.; Opperdoes, F.; Barrell, B. G.; Donelson, J. E.; Hall, N.; Fraser, C. M.; Melville, S. E.; El-Sayed, N. M. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*. 309(5733): 416-422.
- Bessho, T.; Morii, S.; Kusumoto, T.; Shinohara, T.; Noda, M.; Uchiyama, S.; Shuto, S.; Nishimura, S.; Djikeng, A.; Duszenko, M.; Martin, S. K.; Inui, T.; Kubata, K. B. 2013. Characterization of the novel *Trypanosoma brucei* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *Parasitology*. 140(6): 735-745. doi: 10.1017/S0031182012002090.
- Betancourt, A.; Wells E. 1979. Pérdidas económicas en un brote de tripanosomiasis bovina causado por *Trypanosoma vivax*. *Rev. Asoc. Colomb. Med. Vet. Zoot.* 3: 6-9
- Biryomumaisho, S.; Katunguka-Rwakishaya, E. 2007. The pathogenesis of anaemia in goats experimentally infected with *Trypanosoma congolense* or *Trypanosoma brucei*: use of the myeloid: erythroid ratio. *Vet. Parasitol.* 143: 354-357.
- Biron, D. G.; Nedelkov, D.; Missé, D.; Holzmuller, P. 2011. Proteomics and Host-Pathogen Interactions: A Bright Future? En: Tibayrenc, M. (Ed.). *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*. 1st Edition. Elsevier Inc. Amsterdam: 263-303.
- Bjellqvist, B.; Pasquali, C.; Ravier, F.; Sánchez, J. C.; Hochstrasser, D. 1993. A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis*. 14(12): 1357-1365.
- Blackstock, W. P.; Weir, M. P. 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 17(3): 121-127.
- Blom-Potar, M. C.; Chamond, N.; Cosson, A.; Jouvion, G.; Droin-Bergère, S. ; Huerre, M. ; Minoprio, P. 2010. *Trypanosoma vivax* infections: pushing ahead with mouse models for the study of Nagana. II. Immunobiological dysfunctions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4(8) : e793. doi: 10.1371/journal.pntd.0000793.
- Bolivar, A. M.; Reyna-Bello, A.; Garcia, F.; Garcia-Lugo, P.; Crisante, G.; Rojas, A.; Añez, Nestor. 2007. Uso de proteínas como alternativa diagnostica para discriminar infecciones entre *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*. *Bol. Malar. Salud. Ambiental.* VLVII(1): 83-88.

- Bossard, G.; Boulange, A.; Holzmuller, P.; Thévenon, S.; Patrel, D.; Authie, E. 2010. Serodiagnosis of bovine trypanosomosis based on HSP70/BiP inhibition ELISA. *Vet. Parasitol.* 173(1-2): 39-47.
- Boulangé, A.; Authié, E. 1994. A 69-kDa immunodominant antigen of *Trypanosoma congolense* is homologous to BiP (immunoglobulin binding protein). *Parasitol.* 109: 163-173.
- Boulangé, A.; Katende, J.; Authié, E. 2002. *Trypanosoma congolense*: Expression of a Heat Shock Protein 70 and initial evaluation as a diagnostic antigen for bovine trypanosomosis. *Exp. Parasitol.* 100: 6-11.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brener, Z. 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 4: 389-396.
- Bringaud, F.; Peyruchaud, S.; Baltz, D.; Giroud, C.; Simpson, L.; Baltz, T. 1995. Molecular characterization of the mitochondrial heat shock protein 60 gene from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 74(1): 119-123.
- Broadhead, R.; Dawe, H. R.; Farr, H.; Griffiths, S.; Hart, S. R.; Portman, N.; Shaw, M. K.; Ginger, M. L.; Gaskell, S. J.; McKean, P. G.; Gull, K. 2006. Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature.* 440(7081): 224-227.
- Bumann D. 2010. Pathogen proteomes during infection: A basis for infection research and novel control strategies. *J. Proteomics.* 73(11): 2267-2276. doi: 10.1016/j.jprot.2010.08.004.
- Buratai, L. B.; Nok, A. J.; Ibrahim, S.; Umar, I. A.; Esiebo, K. A. 2006. Characterization of sialidase from bloodstream forms of *Trypanosoma vivax*. *Cell Biochem. Funct.* 24(1): 71-77.
- Byers, S. R.; Kramer, J. W. 2010. Normal hematology of sheep and goats. En: Weiss, D. J.; Wardrop, K. J. (Eds). *Schalm's Veterinary Hematology.* 6ta Edición. Wiley-Blackwell Publishing. Iowa, USA: 836-842.
- Cáceres, A. J.; Michels, P. A.; Hannaert, V. 2010. Genetic validation of aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as drug targets in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 169(1): 50-54. doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.09.001.
- Callens, M.; Hannaert, V. 1995. The rational design of trypanocidal drugs: selective inhibition of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Trypanosomatidae*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89: 23-30.

Callow L. L. 1983. Ticks and tick-borne diseases as a barrier to the introduction of exotic cattle to the tropics. En: Ticks and tick-borne diseases. FAO Animal Production and Health, Paper 36. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Roma, Italia, pp 84-53

Camargo, R. E.; Uzcanga, G. L.; Bubis, J. 2004. Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are partially responsible for its cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Vet. Parasitol.* 123: 67-81.

Candiano, G.; Bruschi, M.; Musante, L.; Santucci, L.; Ghiggeri, G. M.; Carnemolla, B.; Orecchia, P.; Zardi, L.; Righetti, P. G. 2004. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis.* 25: 1327-1333.

Casadevall, A. 2007. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biol. Rev.* 21: 130–132

Casadevall, A.; Fang, F. C.; Pirofski, L. 2011. Microbial Virulence as an Emergent Property: Consequences and Opportunities. *PLoS Pathog* 7(7): e1002136. doi:10.1371/journal.ppat.1002136

Casadevall, A., Pirofski, L. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* 67: 3703-3713.

Casadevall, A.; Pirofski, L. 2000. Host-Pathogen Interactions: Basic Concepts of Microbial Commensalism, Colonization, Infection, and Disease. *Infect. Immun.* 68(12): 6511-6518.

Casadevall, A.; Pirofski, L. 2001. Host–pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Infect. Dis.* 184: 337–344.

Casadevall, A.; Pirofski, L. 2003. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 1: 17-24.

Casadevall, A.; Pirofski, L. 2009. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework. *J. Water Health.* 07(S1): 2-18.

Chamond, N.; Cosson, A.; Blom-Potar, M. C.; Jouvion, G.; D'Archivio, S.; Medina, M.; Droin-Bergère, S.; Huerre, M.; Goyard, S.; Minoprio, P. 2010. *Trypanosoma vivax* infections: pushing ahead with mouse models for the study of Nagana. I. Parasitological, hematological and pathological parameters. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4(8): e792. doi: 10.1371/journal.pntd.0000792.

Clark, A. K.; Kovtunovych, G.; Kandlikar, S.; Lal, S.; Stryker, G. A. Cloning and expression analysis of two novel paraflagellar rod domain genes found in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* 96(5): 312-320.

Contreras, B. J. 2000. Enfermedades de los Bovinos. Diagnóstico, Tratamiento y Control. 2da Edición. Full Color Representaciones. Barquisimeto, Venezuela: 662-677.

Cooley, G.; Etheridge, R. D.; Boehlke, C.; Bundy, B.; Weatherly, D. B.; Minning, T.; Haney, M.; Postan, M.; Laucella, S.; Tarleton, R. L. 2008. High throughput selection of effective serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. PLoS Negl. Trop. Dis. 2(10): e316. doi: 10.1371/journal.pntd.0000316.

Cortez, A. P.; Ventura, R. M.; Rodrigues, A. C.; Batista, J. S.; Paiva, F.; Añez, N.; Machado, R. Z.; Gibson, W. C.; Teixeira, M. M. 2006. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. Parasitol. 133(Pt 2): 159-169.

Coulson, R. M. R.; Conner, V.; Chen, T. C.; Ajioka, J. W. 1996. Differential expression of *Leishmania major* beta-tubulin genes during the acquisition of promastigote infectivity. Mol. Biochem. Parasitol. 82: 227-236.

Cuervo, P.; Domont, G. B.; De Jesus, J. B. 2010. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. J. Proteomics. 73(5): 845-867. doi: 10.1016/j.jprot.2009.12.012.

Dávila, A. M.; Silva, R.A. 2000. Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. Ann. N. Y. Acad. Sci. 916: 199-212.

De Baetselier, P. D. ; Namangala, B.; Noel, W.; Brys, L.; Pays, E.; Beschin, A. 2001. Alternative versus classical macrophage activation during experimental African Trypanosomiasis. Int. J. Parasitol. 31: 575-587.

De Groot, A. S. 2006. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. Drug Discov Today. 11(5-6): 203-209.

De Marval, M.G.; Souto-Padron, T.; Gottesdiener, K.; Silva, R.; van der Ploeg, L. H.; Rondinelli, E. 1993. Heat shock proteins in *Trypanosoma cruzi*: identification and localization of HSP70 and HSP60 proteins and structure of HSP60 genes (brief report). Biol. Res. 26(1-2): 313-314.

Deflorin, J.; Rudolf, M.; Seebeck, T. 1994. The major components of the paraflagellar rod of *Trypanosoma brucei* are two similar, but distinct proteins which are encoded by two different gene loci. J. Biol. Chem. 269(46): 28745-28751.

Dempsey, W.L.; Mansfield, J.M. 1983. Lymphocyte function in experimental African tripanosomiasis. V. Role of antibody and the mononuclear phagocyte system in variant-specific immunity. J. Immunol. 130: 405-411.

Desquesnes, M. 2004. Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. OIE and CIRAD, Paris. 190 pp.

Desquesnes, M.; Dávila, A. M. 2002. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet. Parasitol.* 109(3-4): 213-231.

Desquesnes, M.; Tresse, I. 1996. Evaluation of sensitivity of PCR for detecting DNA of *Trypanosoma vivax* with several methods of blood sample preparations. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* 49: 322-327.

Díaz, M. L.; Solari, A.; González, C. I. 2011. Differential expression of *Trypanosoma cruzi* I associated with clinical forms of Chagas disease: overexpression of oxidative stress proteins in acute patient isolate. *J. Proteomics.* 74(9): 1673-1682.

Dirie, M. F.; Otte, M. J.; Thatthi, R.; Gardiner, P. R. 1993. Comparative studies of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* isolates from Colombia. *Parasitol.* 106: 21-29.

Dowsey, A. W.; Dunn, M. J.; Yang, G. Z. 2003. The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* 3(8): 1567-1596.

Droll, D.; Minia, I.; Fadda, A.; Singh, A.; Stewart, M.; Queiroz, R.; Clayton, C. 2013. Post-transcriptional regulation of the trypanosome heat shock response by a zinc finger protein. *PLoS Pathog.* 9(4): e1003286. doi: 10.1371/journal.ppat.1003286.

Duffy, C. W.; Morrison, L. J.; Black, A.; Pinchbeck, G. L.; Christley, R. M.; Schoenefeld, A.; Tait, A.; Turner, C. M.; MacLeod, A. 2009. *Trypanosoma vivax* displays a clonal population structure. *Int. J. Parasitol.* 39(13): 1475-1483. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.05.012.

Duno, F. 1992. Prevalencia de la tripanosomiasis bovina en la región nor-oriental del estado Falcón. Trabajo de grado de Maestría. Postgrado en Medicina Veterinaria. FCV-UCV. 135 pp.

Eisler, M. C.; Lessard, P.; Masake, R. A.; Mooloo, S. K.; Peregrine, A. S. 1998. Sensitivity and specificity of antigen-capture ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle. *Vet. Parasitol.* 79: 187-201.

El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Bartholomeu, D. C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A. N.; Ghedin, E.; Worthey, E. A.; Delcher, A. L.; Blandin, G.; Westenberger, S. J.; Caler, E.; Cerqueira, G. C.; Branche, C.; Haas, B.; Anupama, A.; Arner, E.; Aslund, L.; Attipoe, P.; Bontempi, E.; Bringaud, F.; Burton, P.; Cadag, E.; Campbell, D. A.; Carrington, M.; Crabtree, J.; Darban, H.; da Silveira, J. F.; de Jong, P.; Edwards, K.; Englund, P. T.; Fazelina, G.; Feldblyum, T.; Ferella, M.; Frasch, A. C.; Gull, K.; Horn, D.; Hou, L.; Huang, Y.; Kindlund, E.; Klingbeil, M.; Kluge, S.; Koo, H.; Lacerda, D.; Levin, M. J.; Lorenzi, H.; Louie, T.; Machado, C. R.; McCulloch, R.; McKenna, A.; Mizuno, Y.; Mottram, J. C.; Nelson, S.; Ochaya, S.; Osoegawa, K.; Pai, G.; Parsons, M.; Pentony, M.; Pettersson, U.; Pop, M.; Ramirez, J. L.; Rinta, J.; Robertson, L.; Salzberg, S. L.; Sanchez, D. O.; Seyler,

- A.; Sharma, R.; Shetty, J.; Simpson, A. J.; Sisk, E.; Tammi, M. T.; Tarleton, R.; Teixeira, S.; Van Aken, S.; Vogt, C.; Ward, P. N.; Wickstead, B.; Wortman, J.; White, O.; Fraser, C. M.; Stuart, K. D.; Andersson, B. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309: 409-415.
- Elhassan, E.; Ikede, B. O.; Adeyemo, O. 1995. Trypanosomosis and reproduction: II. Effect of *Trypanosoma vivax* infection on pregnancy and post-partum cyclicity in ewes. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 27: 9-14.
- Ellington, W. R. 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 289-325.
- Ellis, R. J.; van der Vies, S. M. 1991. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 321-347.
- Englard, S.; Seifter, S. 1990. Precipitation techniques. *Methods Enzymol.* 182: 285-300.
- Engstler, M.; Schauer, R. 1993. Sialidases from African trypanosomes. *Parasitol. Today*. 9(6): 222-225.
- Esievo, K. A. N. 1979. In vitro production of neuraminidase (sialidase) by *Trypanosoma vivax*. *Memorias del OAU/STRC International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control*. Youde, Camerún, 29 de Oct al 3 de Nov: 205-210.
- Esievo, K. A. N.; Saror, D. I. 1983. Leukocyte response in experimental *Trypanosoma vivax* infection in cattle. *J. Comp. Path.* 93: 165-169.
- Esievo, K. A.; Saror, D. I.; Ilemobade, A. A.; Hallaway, M. H. 1982. Variation in erythrocyte surface and free serum sialic acid concentrations during experimental *Trypanosoma vivax* infection in cattle. *Res. Vet. Sci.* 32(1): 1-5.
- Espinoza, E. 1988. Evaluación clínica, parasitológica y serológica de bovinos infectados experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. Trabajo de Grado de Maestría. Postgrado de Medicina Veterinaria. FCV-UCV. 221 pp.
- Espinoza, E.; González, N.; Aso, P.; Perrone, T. 1999. Incidencia serológica de *Trypanosoma vivax* en becerros a pastoreo en sabanas del estado Guárico. *Vet. Trop.* 24(1): 5-15.
- Espinoza, E.; Sandoval, E.; Mavare, M.; González, N.; Rangel, L. 2000. Comparación de la serie eritrocítica y leucocítica en ovejas y cabras infectadas con *Trypanosoma vivax*. *Vet. Trop.* 25(1): 29-39.
- Espinoza, E.; Tortolero, E. 1990. Un método simple de conservación de *Trypanosoma vivax* para su uso en infecciones experimentales. En: Giardina, S.; García, F. (Eds.) *Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico*. Caracas. Universidad Simón Bolívar. pp 148-154.

Evans, C. G.; Chang, L.; Gestwicki, J. E. 2010. Heat Shock Protein 70 (Hsp70) as an emerging drug target. *J. Med. Chem.* 53(12): 4585-4602.

Facer, C. A.; Crosskey, J. M.; Clarkson, M. J.; Jenkins, G. C. 1982. Immune haemolytic anaemia in bovine trypanosomiasis. *J. Comp. Path.* 92: 393-401.

FAO. 2004. The state of food and agriculture 2003–2004. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, Italia. Acceso: 13 de Mayo 2014

Feder, M. E.; Hofmann, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 243-282.

Finerty, J.F.; Gasbarre, L.; Kendrick, L.P. 1984. Kinetics of immunoglobulin and specific antibody responses of CBA mice infected with *Trypanosoma rhodesiense*. *Paras. Immunol.* 6(1): 13-22.

Flechas, I. D.; Cuellar, A.; Cucunubá, Z. M.; Rosas, F.; Velasco, V.; Steindel, M.; Thomas, M. del C.; López, M. C.; González, J. M.; Puerta, C. J. 2009. Characterising the KMP-11 and HSP-70 recombinant antigens' humoral immune response profile in chagasic patients. *BMC Infect. Dis.* 9:186. doi: 10.1186/1471-2334-9-186.

Flohé, L. 2012. The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases. *Int. J. Med. Microbiol.* 302(4-5): 216-220.

Folgueira, C.; Requena, J. M. 2007. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 359-377.

Gadelha, C.; LeBowitz, J. H.; Manning, J.; Seebeck, T.; Gull, K. 2004. Relationships between the major kinetoplastid paraflagellar rod proteins: a consolidating nomenclature. *Mol. Biochem. Parasitol.* 136(1): 113-115.

Garcia, H. A.; Rodrigues, A. C.; Rodrigues, C. M. F.; Bengaly, Z.; 3, Minervino, A. H. H.; Riet-Correa, F.; Machado, R. Z.; Paiva, F.; Batista, J. S.; Neves, L.; Hamilton, P. B.; Teixeira, M. M. G. 2014. Microsatellite analysis supports clonal propagation and reduced divergence of *Trypanosoma vivax* from asymptomatic to fatally infected livestock in South America compared to West Africa. *Parasites & Vectors.* 7: 210. doi:10.1186/1756-3305-7-210

Gardiner, P. R. 1989. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. *Adv. Parasitol.* 28: 229-317.

Gardiner, P. R.; Nene, V.; Barry, M. M.; Thatthi, R.; Burleigh, B.; Charke, M. 1996. Characterization of a small variable surface glycoprotein from *Trypanosoma vivax*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 82: 1–11.

Gardiner, P. R.; Wilson, A. J. 1987. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. *Parasitol. Today.* 3(2): 49-52.

Geiger, A.; Hirtz, C.; Bécue, T.; Bellard, E.; Centeno, D.; Gargani, D., Rossignol, M.; Cuny, G.; Peltier, J. B. 2010. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. BMC Microbiol. 10: 20. doi: 10.1186/1471-2180-10-20.

Giambiagi-de Marval, M.; Gottesdiener, K, Rondinelli E & Van der Ploeg LH (1993) Predicted amino acid sequence and genomic organization of *Trypanosoma cruzi* hsp 60 genes. Mol Biochem Parasitol 58: 25–31.

Gibson, W. 2012. The origins of the trypanosome genome strains *Trypanosoma brucei brucei* TREU 927, *T. b. gambiense* DAL 972, *T. vivax* Y486 and *T. congolense* IL3000. Parasit. Vectors 5: 71-76

Ginger, M. L.; Portman, N.; McKean, P. G. 2008. Swimming with protists: Perception, motility and flagellum assembly. Nat. Rev. Microbiol. 6: 838–850.

Gómez, E. 2010. Caracterización clínica, morfométrica y molecular de aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*. Tesis Doctoral, Universidad Central de Venezuela. 239 pp.

Gómez-Piñeres, E.; Boada-Sucre, A.; Bretaña, A.; Contreras-Bretaña, M.; García, F.; Reyna-Bello, A. 2014. Morfometría comparativa de cinco aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*. Rev. Fac. Cs. Vets. UCV. 55(1): 25-33.

González, J. L.; Loza, A.; Chacon, E. 2006. Sensitivity of different *Trypanosoma vivax* specific primers of the diagnosis of livestock trypanosomosis using different DNA extraction methods. Vet. Parasitol. 136: 119-126.

González, L. E.; García, J. A.; Núñez, C.; Perrone T. M.; González-Baradat, B.; Gonzatti, M. I.; Reyna-Bello A. 2005. *Trypanosoma vivax*: A novel method for purification from experimentally infected sheep blood. Exp. Parasitol. 111: 126-129.

Gonzalez, N.; Espinoza, E. 1994. Transmisión transplacentaria del *Trypanosoma vivax* y su efecto sobre la descendencia de hembras gestantes infectadas experimentalmente. Vet. Trop. 19: 41-52.

González, N.; Espinoza, E.; Rangel, L. 1996. Efecto del *Trypanosoma vivax* sobre la gestación de vacas mestizas Holstein-Cebú inoculadas experimentalmente. Veterinaria Tropical. 21(2):111-127.

Gonzalez-Pino, M. J.; Rangel-Aldao, R.; Slezzynger, T. C. 1999. Expression of alpha- and beta-tubulin genes during growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. DNA Cell Biol. 18: 449-455.

Gonzatti, M. I.; González-Baradat, B.; Aso, P. M.; Reyna-Bello, A. 2014. *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and Typanosomosis in Latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. En: Magez S., Radwanska, M. (Eds.), Trypanosomes and Trypanosomiasis. Springer, New York, pp. 261-285.

- Görg, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Harder, A.; Scheibe, B.; Wildgruber, R.; Weiss, W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 21(6): 1037-1053.
- Görg, A.; Postel, W.; Weser, J.; Günther, S.; Strahler, J. R.; Hanash, S. M.; Somerlot, L. 1987. Elimination of point streaking on silver stained two dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis*. 8(2): 122-124.
- Görg, A.; Weiss, W.; Dunn, M. J. 2004. Current two dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 4(12): 3665-3685.
- Grab, D. J., Bwayo, J. J., 1982. Isopycnic isolation of African trypanosomes on Percoll gradients formed in situ. *Acta Tropica*. 39: 363–366.
- Grébaut, P.; Chuchana, P.; Brizard, J. P.; Demette, E.; Seveno, M. ; Bosrad, G. ; Jouin, P. ; Vincendeau, P. ; Bengaly, Z. ; Boulangé, A. ; Cuny, G. ; Holzmuller, P. 2009. Identification of total and differentially expressed-excreted proteins from *Trypanosoma congolense* strains exhibiting different virulence and pathogenicity. *Int. J. Parasitol.* 39: 1137-1150.
- Greif, G., Ponce de Leon, M., Lamolle, G., Rodriguez, M., Piñeyro, D., Tavares-Marques, L.M., Reyna-Bello, A., Robello, C., Alvarez-Valin, F., 2013. Transcriptome analysis of the bloodstream stage from the parasite *Trypanosoma vivax*. *BMC Genomics*. 14: 149. doi:10.1186/1471-2164-14-149
- Greif, G.; Rodriguez, M.; Reyna-Bello, A.; Robello, C.; Alvarez-Valin, F. 2015. Kinetoplast adaptations in American strains from *Trypanosoma vivax*. *Mutat. Res.* 773: 69-82. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2015.01.008.
- Greiner, M.; Kumar, S.; Kyeswa, C. 1997. Evaluation and comparison of antibody ELISAs for serodiagnosis of bovine trypanosomosis. *Vet. Parasitol.* 79: 197-205.
- Guglielmone, G. G. 1995. Epidemiology of babesiosis y anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* 57: 109-119.
- Guillen, A.; León, E.; Aragort, W.; Silva, M. 2001. Diagnóstico de hemoparásitos en el Instituto de Investigaciones Veterinarias. Período 1986-2000. *Vet. Trop.* 26(1): 47-62.
- Gull, K. 2001. Protist tubulins: new arrivals, evolutionary relationships and insights to cytoskeletal function. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 427-432.
- Gygi, S. P.; Rochon, Y.; Franza, B. R.; Aebersold, R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19(3): 1720-1730.
- Hamilton, P. B. 2012. Is *Trypanosoma vivax* genetically diverse? *Trends Parasitol.* 28(5): 173. doi: 10.1016/j.pt.2012.02.003.

- Hartl, F. U.; Hayer-Hartl, M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*. 295(5561): 1852-1858.
- Hertz, C.J.; Filutowicz, H.; Mansfield, J.M. 1998. Resistance to the African trypanosomes is IFN gamma dependent. *J. Immunol.* 161(12): 6775–6783.
- Hill, E. W.; O`Gorman, G.; Agaba, M.; Gibson, J.; Hanotte, O.; Kemp, S.; Naessens, J.; Coussens, P.; MacHugh, D. 2005. Understanding bovine trypanosomiasis and trypanotolerance: the promise of functional genomics. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105: 259-275.
- Holmes, P. H.; Katunguka, E.; Bennison, J. J.; Wassink, G. J.; Parkins, J. J. 2000. Impact of nutrition on the pathophysiology of bovine trypanosomiasis. *Parasitol.* 120: 73-85.
- Holzmuller, P.; Biron, D. G.; Courtois, P.; Koffi, M.; Bras-Gonçalves, R.; Daulouède, S.; Solano, P.; Cuny, G.; Vincendeau, P.; Jamonneau, V. 2008. Virulence and pathogenicity patterns of *Trypanosoma brucei gambiense* field isolates in experimentally infected mouse: differences in host immune response modulation by secretome and proteomics. *Microbes Infect.* 10(1): 79-86.
- Hughes, L. C.; Ralston, K. S.; Hill, K. L.; Zhou, Z. H. 2012. Three-dimensional structure of the Trypanosome flagellum suggests that the paraflagellar rod functions as a biomechanical spring. *PLoS One.* 7(1): e25700. doi: 10.1371/journal.pone.0025700.
- Igbokwe, I. O. 1994. Mechanisms of cellular injury in African trypanosomiasis, *Vet. Bull.* 64(7): 611-620.
- Igbokwe, I. O.; Anosa, V. O. 1989. Response to anaemia in experimental *Trypanosoma vivax* infection of sheep. *J. Comp. Path.* 100: 111-118.
- InfoStat. 2004. InfoStat Versión 2004. Manual del usuario. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba. 1a Edición. Editorial Brujas, Argentina.
- Issaq, H.; Veenstra T. 2008. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques.* 44(5):697-700. doi: 10.2144/000112823.
- Ivens, A. C.; Peacock, C. S.; Worthey, E. A.; Murphy, L.; Aggarwal, G.; Berriman, M. , Sisk, E.; Rajandream, M. A.; Adlem, E.; Aert, R.; Anupama, A.; Apostolou, Z.; Attipoe, P.; Bason, N.; Bauser, C.; Beck, A.; Beverley, S. M.; Bianchetti, G.; Borzym, K.; Bothe, G.; Bruschi, C. V.; Collins, M.; Cadag, E.; Ciarloni, L.; Clayton, C.; Coulson, R. M.; Cronin, A.; Cruz, A. K.; Davies, R. M.; De Gaudenzi, J.; Dobson, D. E.; Duesterhoeft, A.; Fazelina, G.; Fosker, N.; Frasch, A. C.; Fraser, A.; Fuchs, M.; Gabel, C.; Goble, A.; Goffeau, A.; Harris, D.; Hertz-Fowler, C.; Hilbert, H.; Horn, D.; Huang, Y.; Klages, S.; Knights, A.; Kube, M.; Larke, N.; Litvin, L.; Lord, A.; Louie, T.; Marra, M.; Masuy, D.; Matthews, K.; Michaeli, S.; Mottram, J. C.; Müller-Auer, S.; Munden, H.; Nelson, S.; Norbertczak, H.; Oliver,

K.; O'neil, S.; Pentony, M.; Pohl, T. M.; Price, C.; Purnelle, B.; Quail, M. A.; Rabbinowitsch, E.; Reinhardt, R.; Rieger, M.; Rinta, J.; Robben, J.; Robertson, L.; Ruiz, J. C.; Rutter, S.; Saunders, D.; Schäfer, M.; Schein, J.; Schwartz, D. C.; Seeger, K.; Seyler, A.; Sharp, S.; Shin, H.; Sivam, D.; Squares, R.; Squares, S.; Tosato, V.; Vogt, C.; Volckaert, G.; Wambutt, R.; Warren, T.; Wedler, H.; Woodward, J. Zhou, S.; Zimmermann, W.; Smith, D. F.; Blackwell, J. M.; Stuart, K. D.; Barrell, B.; Myler, P. J. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 309: 436-442.

Jackson, A. P.; Allison, H. C.; Barry, J. D.; Field, M. C.; Hertz-Fowler, C.; Berriman, M. 2013) A cell-surface phylome for African trypanosomes. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(3): e2121. doi: 10.1371/journal.pntd.0002121

Jackson, A. P.; Berry, A.; Aslett, M.; Allison, H. C.; Burton, P.; Vavrova-Anderson, J.; Brown, R.; Browne, H.; Corton, N.; Hauser, H.; Gamble, J.; Gilderthorp, R.; Marcello, L.; McQuillan, J.; Otto, T. D.; Quail, M. A.; Sanders, M. J.; van Tonder, A.; Ginger, M. L.; Field, M. C.; Barry, J. D.; Hertz-Fowler, C.; Berriman, M. 2012. Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African trypanosome species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 109(9): 3416-3421.

Jackson, A. P.; Vaughan, S.; Gull, K. 2006. Evolution of tubulin gene arrays in Trypanosomatid parasites: genomic restructuring in *Leishmania*. *BMC Genomics*. 7: 261. doi:10.1186/1471-2164-7-261.

Jensen, A. T.; Curtis, J.; Montgomery, J.; Handman, E.; Theander, T. G. 2001. Molecular and immunological characterisation of the glucose regulated protein 78 of *Leishmania donovani*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1549(1): 73-87.

Jones, W. T. y Dávila A. M. R. 2001. *Trypanosoma vivax* - out of Africa. *Trends Parasitol.* 17(2): 99-101.

Katunguka-Rwakishaya, E.; Murray, M.; Holmes, P. H. 1992. The pathophysiology of ovine trypanosomosis: haematological and blood biochemical changes. *Vet. Parasitol.* 45: 17-32.

Kaur, K.; Ruben, L. 1994. Protein translation elongation factor-1 α from *Trypanosoma brucei* binds calmodulin. *J. Biol. Chem.* 269(37): 23045-23050.

Kayang, B. B.; Bosompem, M. K.; Assoku, K. G.; Awumbila, B. A. 1997. Detection of *Trypanosoma brucei*, *T. congolense* and *T. vivax* infections in cattle, sheep and goats using latex agglutination. *Intern. J. Parasitol.* 27: 83-87.

Kobayashi, A.; Tizard, I. R. 1976. The response to *Trypanosoma congolense* infection in calves. Determination of immunoglobulins IgG1, IgG2, IgM and C3 levels and the complement fixing antibody titres during the course of infection. *Tropenmed Parasitol.* 27(4): 411-417.

Koyfman, A. Y.; Schmid, M. F.; Gheiratmand, L.; Fu, C. J.; Khant, H. A.; Huang, D.; He, C. Y.; Chiu, W. 2011. Structure of *Trypanosoma brucei* flagellum accounts

- for its bihelical motion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(27): 11105-11108. doi: 10.1073/pnas.1103634108.
- Krautz, G. M.; Peterson, J. D.; Godsel, L. M.; Krettli, A. U.; Engman, D. M. 1998. Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kd heat-shock proteins. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58(2): 137-143.
- Kukla, B. A.; Majiwa, P. A.; Young, J. R.; Moloo, S. K.; Ole-MoiYoi, O. 1987. Use of species-specific DNA probes for detection and identification of trypanosome infection in tsetse flies. *Parasitol.* 95: 1-6.
- Kumari, S.; Samant, M.; Misra, P.; Khare, P.; Sisodia, B.; Shasany, A. K.; Dube, A. 2008. Th1-stimulatory polyproteins of soluble *Leishmania donovani* promastigotes ranging from 89.9 to 97.1 kDa offers long-lasting protection against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine.* 26: 5700–5711.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Laha, R.; Sasmal, N. K. 2008. Characterization of immunogenic proteins of *Trypanosoma evansi* isolated from three different Indian hosts using hyperimmune sera and immune sera. *Res. Vet. Sci.* 85(3): 534-539.
- Landfear, S. M.; Ignatushchenko, M. 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115(1): 1-17.
- Langousis, G.; Hill, K. L. 2014. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12(7): 505-518. doi: 10.1038/nrmicro3274.
- Latterich, M.; Abramovitz, M.; Leyland-Jones, B. 2008. Proteomics: new technologies and clinical applications. *Eur. J. Cancer.* 44(18): 2737-2241. doi: 10.1016/j.ejca.2008.09.007.
- Leeflang, P.; Buys, J.; Blotkamp, C. 1976. Studies on *Trypanosoma vivax*: infectivity and serial maintenance of natural bovine isolates in mice. *Int. J. Parasitol.* 6: 413-417.
- Li, S. Q.; Fung, M. C.; Reid, S. A.; Inoue, N.; Lun, Z. R. 2007. Immunization with recombinant beta-tubulin from *Trypanosoma evansi* induced protection against *T. evansi*, *T. equiperdum* and *T. b. brucei* infection in mice. *Parasite Immunol.* 29: 191-199.
- Liang, P.; MacRae, T.H. 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 110:1431-1440.
- Lim, C. R.; Kimata, Y.; Ohdate, H.; Kokubo, T.; Kikuchi, N.; Horigome, T.; Kohno, K. 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* RuvB-like protein, Tih2p, is required for cell cycle progression and RNA polymerase II-directed transcription. *J. Biol. Chem.* 275: 22409-22417.

Littell, R. C.; Henry, P. R.; Ammerman, C. B. 1998. Statistical Analysis of Repeated Measures Data Using SAS Procedures. *J. Anim. Sci.* 76:1216-31.

Littell, R.; Pendergast, J.; Nataranjan, R. 2000. Tutorial in Bioestatics. Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. *Statistics in Medicine.* 19:1793-819.

Littell, R. C.; Milliken, G.; Stroup, W.; Wolfinger, R.; Schabenberger, O. 2006. SAS for Mixed Model. Second Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA. 813 pp.

Losos, G. J. 1986. Infectious Tropical Diseases of Domestic Animals. Essex: Longman Scientific & Technical, Canadá. 938 pp.

Lubega, G. W.; Byarugaba, D. K.; Prichard, R. K. 2002. Immunization with a tubulin-rich preparation from *Trypanosoma brucei* confers broad protection against African trypanosomiasis. *Exp. Parasitol.* 102(1): 9-22.

Luckins, A. G. 1992. Trypanosomiasis in small ruminants - a major constraint to livestock production? *Br. Vet. J.* 148: 471-472.

Luhrs, K. A.; Fouts, D. L.; Manning, J. E. 2003. Immunization with recombinant paraflagellar rod protein induces protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine.* 21(21-22): 3058-3069.

Mabbott, N.; Sternberg, J. 1995. Bone marrow nitric oxide production and development of anemia in *Trypanosoma brucei*-infected mice. *Infect. Immun.* 63(4): 1563-1566

Madruga, C. ; Araújo, F. ; Goes-Cavalcante, G. ; Martins, Ch. ; Pfeifer, I. ; Ribeiro, L. ; Kessler, R. ; Soares, C. ; Miguita, M. ; Melo, E. ; Almeida, R. ; Lima, M. 2006. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101(7): 801-807.

Maghez, S.; Truyens, C.; Merimi, M.; Radwanska, M.; Stijlemans, B.; Brouckaert, P.; Brombacher, F.; Pays, E.; De Baetselier, P. 2004. P75 tumor necrosis factor-receptor shedding occurs as a protective host response during African trypanosomiasis. *J. Infect. Dis.* 189(3): 527-539.

Maikaje, D. B.; Sannusi, A.; Kyewalabye, E. K.; Saror, D. I. 1991. The course of experimental *Trypanosoma vivax* infection in Uda sheep. *Vet. Parasitol.* 38: 267-274.

Mansfield, J.M.; Paulnock, D.M; Hedberg, G.M. 2014. Bridging Innate and Adaptive Immunity in African Trypanosomiasis. In: Magez, S.; Radwanska, M. (Eds.), *Trypanosomes and Trypanosomiasis.* Springer, New York. Pp 89-114.

Maresca, B.; Carratu, L. 1992. The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitol. Today* 8: 260-266.

- Marouga, R.; David, S.; Hawkins, E. 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal. Bioanal. Chem.* 382: 669-678.
- Masake, R. A. 1980. The pathogenesis of infection with *Trypanosoma vivax* in goats and cattle. *Vet. Rec.* 107: 551-557.
- Masake, R. A.; Nantulya, V. M. 1991. Sensitivity of an antigen detection enzyme immunoassay for diagnosis of *Trypanosoma congolense* infections in goats and cattle. *J. Parasitol.* 77(2): 231-236.
- Masake, R. A.; Njuguna, J. T.; Brown, C. C.; Majiwa, P. A. O. 2002. The application of PCR-ELISA to the detection of *Trypanosoma brucei* and *T. vivax* infections in livestock. *Vet. Parasitol.* 105: 179-189.
- Mayaudon, H. 1973. Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos de Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay, Venezuela. Vol. 1: 9-17.
- Mayer, M. P.; Bukau, B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* 62: 670-684.
- Mbaya, A.; Kumshe, H.; Nwosu, C. O. 2012. The Mechanisms of Anaemia in Trypanosomosis: A Review. En: Silverberg, D. S. (Ed.), *Anemia*. InTech, Croacia, pp: 269-282.
- McKean, P. G.; Vaughan, S.; Gull, K. 2001. The extended tubulin superfamily. *J. Cell Sci.* 114: 2723-2733.
- MTC-FONACIT Ministerio de Ciencia y Tecnología – Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología. Código de bioética y bioseguridad. Caracas, Venezuela. 2002; 35 pp
- Melville, S. E.; Leech, V.; Gerrard, C. S.; Tait, A.; Blackwell, J. M. 1998. The molecular karyotype of the megabase chromosomes of *Trypanosoma brucei* and the assignment of chromosome markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 94(2): 155-173.
- Mendoza G., A.; Berumen A., A. C.; Santamaría M., E.; Vera, G. 2010. Diagnóstico clínico del ovino. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. 83 pp.
- Michaeli, S. 2011. Trans-splicing in trypanosomes. Machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiol.* 6: 459-474
- Michailowsky, V.; Luhrs, K.; Rocha, M. O.; Fouts, D.; Gazzinelli, R. T.; Manning, J.E. 2003. Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infect. Immun.* 71(6): 3165-3171.

- Michels, P. A.; Bringaud, F.; Herman, M.; Hannaert, V. 2006. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763(12): 1463-1477.
- Millar, A. E.; Sternberg, J.; McSharry, C.; Wei, X. Q.; Liew, F. Y.; Turner, C. M. 1999. T-Cell responses during *Trypanosoma brucei* infections in mice deficient in inducible nitric oxide synthase. *Infect. Immun.* 67(7): 3334-3338.
- Miranda, M. R.; Bouvier, L. A.; Canepa, G. E.; Pereira, C. A. 2009. Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* arginine kinase. *Parasitology.* 136(10): 1201-1207. doi: 10.1017/S0031182009990448.
- Miranda, M. R.; Canepa, G. E.; Bouvier, L. A.; Pereira, C. A. 2006. *Trypanosoma cruzi*: Oxidative stress induces arginine kinase expression. *Exp. Parasitol.* 114: 341–344.
- Morell, M.; Thomas, M. C.; Caballero, T.; Alonso, C.; López, M. C. 2006. The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine.* 24: 7046–7055.
- Moreno, S. A.; Concepción, J. L.; Nava, M.; Molinari, J. 2013. Importance of the horse and financial impact of equine trypanosomiasis on cattle raising in Venezuela. *Trop. Anim. Health Prod.* 45(8): 1669-1676.
- Moreno, S. A.; Nava, M. 2015. *Trypanosoma evansi* is alike to *Trypanosoma brucei brucei* in the subcellular localisation of glycolytic enzymes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 110(4): 468-475. doi: 10.1590/0074-02760150024.
- Morgan, R. E.; Werbovetz, K. A. 2008. Selective lead compounds against kinetoplastid tubulin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 625: 33-47. doi: 10.1007/978-0-387-77570-8_4.
- Morlais, I.; Ravel, S.; Grébaud, P.; Dumas, V.; Cuny, G. 2001. New molecular marker for *Trypanosoma (Duttonella) vivax* identification. *Acta Trop.* 80: 207-213.
- Morrison, L.J.; Mclellan, S.; Sweeney, L.; Chan, C.N.; Macleod, A.; Tait, A.; Turner, C.M. 2010. Role for parasite genetic diversity in differential host responses to *Trypanosoma brucei* infection. *Infect. Immun.* 78(3): 1096-1108. 2010
- Moyersoen, J.; Choe, J.; Fan, E.; Hol, W. G.; Michels, P. A. 2004. Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. *FEMS Microbiol. Rev.* 28(5): 603-643.
- Murray, M.; Dexter, T. M. 1988. Anaemia in bovine African trypanosomiasis. A review. *Acta Trop.* 45(4):389-432.
- Murray, M.; Morrison, W. I.; Whitelaw, D. D. 1982. Host susceptibility to African trypanosomiasis: trypanotolerance. *Adv. Parasitol.* 21: 1–68.

Mwongela, G. N.; Kovatch, R. M.; Fazil, M. A. 1981. Acute *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle in coast province, Kenia. Trop. Anim. Hlth Prod. 13: 63-69.

Naessens, J. 2006. Bovine trypanotolerance: A natural ability to prevent severe anaemia and haemophagocytic syndrome? Int. J. Parasitol. 36(5): 521-528.

Naessens, J.; Kitani, H.; Yagi, Y.; Sekikawa, K.; Iraqqi, F. 2005. TNF- α mediates the development of anaemia in a murine *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection, but not the anaemia associated with a murine *T. congolense* infection. Clin. Exp. Immunol. 139(3): 403-410

Naessens, J.; Teale, A. J.; Sileghem, M. 2002. Identification of mechanisms of natural resistance to African trypanosomiasis in cattle. Vet. Immunol. Immunopathol. 87: 187-194.

Nantulya, V. M.; Lindqvist, K. J.; Stevenson, P.; Mwangi, E. K. 1992. Application of a monoclonal antibody-based antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay (antigen ELISA) for field diagnosis of bovine trypanosomiasis at Nguruman, Kenya. Ann. Trop. Med. Parasitol. 86: 225-230.

Nantulya, V. M.; Musoke, A. J.; Rurangirwa, F. R.; Barbet, A. F.; Ngaira, J.; Kattende, J. M. 1982. Immune depression in African trypanosomiasis: the role of antigenic competition. Clin. Exp. Immunol. 47: 234-241.

Navarrete, I.; Acosta, I. 1999. Tripanosomosis. En Codero del C., M.; Rojo V., F. A. (Eds). Parasitología Veterinaria. 1era Edición. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. pp 302-309.

Noyes, H. A.; Alimohammadian, M. H.; Agaba, M.; Brass, A.; Fuchs, H.; Gailus-Durner, V.; Hulme, H.; Iraqi, F.; Kemp, S.; Rathkolb, B.; Wolf, E.; de Angelis, M. H.; Roshandel, D.; Naessens, J. 2009. Mechanisms controlling anaemia in *Trypanosoma congolense* infected mice. PLoS One. 4(4): e5170. doi: 10.1371/journal.pone.0005170.

O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250(10): 4007-4021.

Obasi, O. L.; Ogwu, D.; Mohammed, G.; Okon, E. D. 1999. Reduced ovulatory and oestrous activity in zebu heifers following *Trypanosoma vivax* infection. Trop. Anim. Health Prod. 31(1): 55-62.

Ohashi-Suzuki, M.; Yabu, Y.; Ohshima, S.; Nakamura, K.; Kido, Y.; Sakamoto, K.; Kita, K.; Ohta, N.; Suzuki, T. 2011. Differential kinetic activities of glycerol kinase among African trypanosome species: phylogenetic and therapeutic implications. J. Vet. Med. Sci. 73(5): 615-621

Oliveira, J. B.; Hernández-Gamboa, J.; Jiménez-Alfaro, C.; Zeledón, R.; Blandón, M.; Urbina, A. 2009. First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. Vet. Parasitol. 163(1-2): 136-139.

- Onah, D. N.; Hopkins, J.; Luckins, A. G. 1996. Haematological changes in sheep experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. Parasitol. Res. 82(8): 659-63.
- Opperdoes, F. R.; Borst P. 1977. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. FEBS Lett. 80(2): 360-364.
- Osório, A. L.; Madruga, C. R.; Desquesnes, M.; Soares, C. O.; Ribeiro, L. R.; Costa, S. C. 2008. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - A review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 103(1): 1-13.
- Otte, M. J.; Abuabara, J. Y.; Wells, E. A. 1994. *Trypanosoma vivax* in Colombia: Epidemiology and production losses. Trop. Anim. Hlth. Prod. 26: 146-156.
- Paba, J.; Santana, J. M.; Teixeira, A. R.; Fontes, W.; Sousa, M. V.; Ricart, C. A. 2004a. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. Proteomics. 4:1052-1059.
- Paba, J.; Santana, J. M.; Teixeira, A. R.; Fontes, W.; Sousa, M. V.; Ricart, C. A. 2004b. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents. J. Proteome. Res.3: 517-524.
- Paiva, F.; Lemos, R. A. A.; Nakazato, L.; Brum, K. B.; Bernardo, K. C.; Madruga, C. R.; Schenk, M. A. 2000. *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: II - Inoculação experimental. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 9(2): 135-141.
- Palagi, P. M.; Hernandez, P.; Walther, D.; Appel, R. D. 2006. Proteome informatics I: bioinformatics tools for processing experimental data. Proteomics. 6(20): 5435-5444.
- Paris, J.; Murray, M.; McOdimba, F. 1982. A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. Acta Tropica. 39: 307-316.
- Parodi-Talice, A.; Duran, R.; Arrambide, N.; Prieto, V.; Pineyro, M.D.; Pritsch, O.; Cayota, A.; Cervenansky, C.; Robello, C. 2004. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Parasitol. 34(8): 881-8866.
- Parra G., N. J. 2011. Análisis secretómico y proteómico de aislados de *Trypanosoma evansi* con virulencia diferencial. Tesis Doctoral. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela. 160 pp.
- Patton, W. F. 2000. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. Electrophoresis. 21(6): 1123-1144.

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

Pereira, C. A.; Alonso, G. D.; Ivaldi, S.; Silber, A. M.; Alves, M. J.; Torres, H. N. Flawia, M. M. 2003. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. *FEBS Letters* 554: 201-205.

Pereira, C. A.; Alonso, G. D.; Paveto, M. C.; Flawia, M. M.; Torres, H. N. 1999. L-arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *J. Eukaryotic Microbiol.* 46: 566–570.

Pereira, C. A.; Alonso, G. D.; Paveto, M. C.; Iribarren, A.; Cabanas, M. L.; Torres, H. N.; Flawia, M. M. 2000. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. *J. Biol. Chem.* 275(2): 1495-1501.

Pereira, C. A.; Alonso, G. D.; Torres, H. N.; Flawiá, M. M. 2002. Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49: 82–85.

Perry, B. D.; Randolph, T. F.; McDermott, J. J.; Sones, K. R.; Thornton, P. K.. 2002. Investing in Animal Health Research to Alleviate Poverty. 148 pp

Planelles, L.; Thomas, M. C.; Alonso, C.; López, M. C. 2001. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect. Immun.* 69(10): 6558-6563.

Playfair, J.; Taverne, J.; Bate, C.; de Souza, J. 1990. The malaria vaccine: anti-parasite or anti-disease? *Immunol. Today* 11: 25–27.

Plouffe, D. A.; Belosevic, M. 2006. Antibodies that recognize alpha- and beta-tubulin inhibit in vitro growth of the fish parasite *Trypanosoma danilewskyi*, Laveran and Mesnil, 1904. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 685–697.

Portman, N.; Gull, K. 2010. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. *Int. J. Parasitol.* 40(2): 135-148. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.10.005.

Portman, N.; Lacomble, S.; Thomas, B.; McKean, P. G.; Gull, K. 2009. Combining RNA interference mutants and comparative proteomics to identify protein components and dependences in a eukaryotic flagellum. *J. Biol. Chem.* 284: 5610–5619.

Powers, M. V.; Clarke, P. A.; Workman, P. 2009. Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both? *Cell Cycle.* 8: 518–526.

Queiroz, A.O.; Legey, A.P.; Xavier, S.C.; Jansem, A.M. 2001. Specific antibody levels and antigenic recognition of Wistar rats inoculated with distinct isolates of *Trypanosoma evansi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96(7): 965-972.

- Rabilloud, T. 1996. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis*. 17(5): 813-829.
- Rabilloud, T.; Chevallet, M.; Luche, S.; Lelong, C. 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J. Proteomics*. 73: 2064-2077.
- Rabilloud, T.; Lelong, C. 2011. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *J. Proteomics*. 74: 1829-1841.
- Ralston, K. S.; Hill, K. L. 2008. The flagellum of *Trypanosoma brucei*: new tricks from an old dog. *Int. J. Parasitol.* 38(8-9): 869-884. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.03.003.
- Ralston, K. S.; Kabututu, Z. P.; Melehani, J. H.; Oberholzer, M.; Hill, K. L. 2009. The *Trypanosoma brucei* flagellum: Moving parasites in new directions. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 335–362.
- Ramírez-Barrios, R. A.; Valera, Z.; Parra, O.; Chacin, E.; Tavares-Marques, L.; Holzmüller, P.; Martínez-Moreno, A.; Reyna-Bello, A. 2015. Immunoreactive proteins of *Trypanosoma vivax*. *Rev. Científ. FCV-LUZ*. 15(4): 311-316.
- Rasooly, R.; Balaban, N. 2004. Trypanosome microtubule-associated protein p15 as a vaccine for the prevention of African sleeping sickness. *Vaccine*. 22(8): 1007-1015.
- Rebeski, D. E.; Winger, E. M.; Robinson, M. M.; Glaber, C. M. G.; Dwinger, R. H., Crowther, J. R. 2000. Evaluation of antigen-coating procedures of enzyme-linked immunosorbent assays method for detection of trypanosomal antibodies. *Vet. Parasitol.* 90: 1-13.
- Rebeski, D. E.; Winger, E. M.; Van Rooij, E. M.; Schochl, R.; Schuller, W.; Dwinger, R. H., Crowther, J. R.; Wright, P. 1999. Pitfalls in the application of enzyme-linked immunoassays for the detection of circulating trypanosomal antigens in serum samples. *Parasitol. Res.* 85: 550-556.
- Rey-Ladino, J. A.; Joshi, P. B.; Singh, B.; Gupta, R.; Reiner, N. E. 1997. *Leishmania major*: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. *Exp. Parasitol.* 85(3): 249-263.
- Reyna-Bello, A.; García, F.; Rivera, M.; Sansó, B.; Aso, P. 1998. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. *Vet. Parasitol.* 1483: 1-9.
- Reyna-Bello, A.; Eleizalde, M. C.; Silva, A. M. 2007. Assessment of chromogen suitability in ELISA for the detection of anaplasmosis and trypanosomosis. *J. Immunoassay Immunochem.* 28(1): 1-11.

- Rico, A. I.; Angel, S. O.; Alonso, C.; Requena, J. M. 1999. Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83. *Mol. Immunol.* 36(17): 1131-1139.
- Rivera, M. 1996. Hemoparasitosis Bovinas. Universidad Central de Venezuela. 1era Edición. Anauro Ediciones, C.A. Caracas, Venezuela. pp 15-84.
- Rodrigues, A.; Figuera, R. A.; Souza, T. M.; Schild, A. L.; Soares, M. P.; Milano, J.; Barros, C. S. L. 2005. Surtos de tripanosomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. *Pesq. Vet. Bras.* 25(4): 239-249.
- Rodrigues, A. C.; Neves, L.; Garcia, H. A.; Viola, L. B.; Marcili, A.; Da Silva, F. M.; Sigauque, I.; Batista, J. S.; Paiva, F.; Teixeira, M. M. 2008. Phylogenetic analysis of *Trypanosoma vivax* supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new *T. vivax*-like genotype infecting a nyala antelope from Mozambique. *Parasitology.* 135(11): 1317-1328.
- Sandoval, E.; Espinoza, E.; González, N.; Morales, G.; Montilla, W.; Jiménez, D. 1998. Encuesta serohematológica en bovinos tripanosusceptibles de dos unidades agroecológicas del Valle de Aroa. *Revista Científica FCV-LUZ.* Vol. IV(3): 253-258.
- Sandoval, E.; Espinoza, E.; Valle, A. 1995a. Parasitemia y comportamiento clínico en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. *Vet. Trop.* 20: 67-81.
- Sandoval, E.; Espinoza, E.; Valle, A. 1995b. Variaciones hematológicas en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. *Revista Científica, FCV-LUZ.* Vol. V(3): 147-159.
- Sandoval, E.; Espinoza, E.; Valle, A. 1996. Leucopenia y trombocitopenia en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. *Vet. Trop.* 21(1): 13-33.
- Saravia, N. G.; Hazbón, M. H.; Osorio, Y.; Valderrama, L.; Walker, J.; Santrich, C.; Cortázar, T.; Lebowitz, J. H.; Travi, B. L. 2005. Protective immunogenicity of the paraflagellar rod protein 2 of *Leishmania mexicana*. *Vaccine.* 23(8): 984-995.
- S.A.S. 2008. Statistical Analysis System. Institute Inc. System SAS for Windows. Version 9.2. Level TS 1M0 XP_PROWindows. NT. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- S.A.S. 2010. SAS® 9.2 Language Reference: Concepts. Second Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC. 649 p.
- Sasse, R.; Gull, K. 1988. Tubulin post-translational modifications and the construction of microtubular organelles in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* 90(Pt 4): 577-589

- Schenk, M. A. M.; Mendonça, C. L.; Madruga, C. R.; Kohayagawa, A.; Araújo, F. R. 2001. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. *Pesqui. Vet. Bras.* 21(4):157-161
- Schneider, A.; Sherwin, T.; Sasse, R.; Russell, D. G.; Gull, K.; Seebeck, T. 1987. Subpellicular and flagellar microtubules of *Trypanosoma brucei brucei* contain the same alpha-tubulin isoforms. *J. Cell Biol.* 104(3): 431-438.
- Schrattenholz, A. 2004. Proteomics: how to control highly dynamic patterns of millions of molecules and interpret changes correctly? *Drug Discovery Today: Technologies.* 1(1): 1-8.
- Seidl, A.; Dávila, A. M. R.; Silva, R. A. M. S. 1999. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94: 269-272.
- Sekoni, V. O.; Njoku, C. O.; Kumi-Diaka, J.; Saror, D. I. 1990. Pathological changes in male genitalia of cattle infected with *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense*. *Br. Vet. J.* 146: 175-180.
- Shaw, A. P. 2004. Economics of African trypanosomiasis. In: Maudlin, I., Holmes, P., Miles, M. (Eds.), *The Trypanosomiasis*. CABI Publishing, Wallingford, UK. pp 369-402
- Shin, Y. S.; Lee, E. G.; Shin, G. W.; Kim, Y. R.; Lee, E. Y.; Kim, J. H.; Jang, H.; Gershwin, L. J.; Kim, D. Y.; Kim, Y. H.; Kim, G. S.; Suh, M. D.; Jung, T. S. 2004. Identification of antigenic proteins from *Neospora caninum* recognized by bovine immunoglobulins M, E, A and G using immunoproteomics. *Proteomics* 4: 3600-3609.
- Silberring, J.; Ciborowski, P. 2010. Biomarker discovery and clinical proteomics. *Trends Analyt. Chem.* 29(2):128-140. doi:10.1016/j.trac.2009.11.007.
- Sileghem, M.; Naessens, J. 1995. Are CD8 T-cells involved in control of African trypanosomiasis in a natural host environment. *Eur. J. Immunol.* 25: 1965–1971.
- Silva, R. A. M. S.; Egüez, A.; Morales, G.; Eulert, E.; Montenegro, A.; Ybañez, R.; Seidl, A.; Martín, A.; Dávila, R.; Ramirez, L. 1998a. Bovine trypanosomiasis in Bolivian and Brazilian lowlands. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 93(1): 29-32.
- Silva, R. A. M. S.; Morales, G.; Eulert, E.; Montenegro, A.; Ybañez, R. 1998b. Outbreaks of trypanosomosis due to *Trypanosoma vivax* in cattle in Bolivia. *Vet. Parasitol.* 76: 153-157.
- Silva, R. A. M. S.; Ramírez, L.; Souza, S. S.; Ortiz, A. G.; Pereira, S. R.; Dávila, A. M. R. 1999. Hematology of natural bovine trypanosomosis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. *Vet. Parasitol.* 85: 87-93.

- Soriano, E. V.; Salgado-Miranda, C.; Suárez-Güemes, F.; Trigo T., F. J. 2006. Patogenia microbiana: conceptos básicos en la interacción hospedero.microorganismo. *Veterinaria México*. 37(4): 457-465
- Soulsby, E. J. L. 1987. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7ª Ed. Nueva Editorial Interamericana. México. pp. 521-551.
- Stijlemans, B.; Guilliams, M.; Raes G, Beschin, A.; Magez, S.; De Baetselier, P. 2007. African trypanosomosis: from immune escape and immunopathology to immune intervention. *Vet. Parasitol.* 148: 3-13.
- Stober, C. B.; Lange, U. G.; Roberts, M. T.; Alcamí, A.; Blackwell, J. M. 2007. Heterologous priming-boosting with DNA and modified vaccinia virus Ankara expressing tryparedoxin peroxidase promotes long-term memory against *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Infect. Immun.* 75: 852-860.
- Suárez P., C. 2000. Evaluación de los parámetros de la coagulación sanguínea en ovinos infectados experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. Trabajo de grado de Maestría. Postgrado en Medicina Veterinaria. FCV-UCV. 109 pp.
- Suarez, C.; Garcia, F.; Baldizan, G., Mujica, F. 2003. Comportamiento parasitológico, clínico y hematológico en ovinos infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *Trypanosoma vivax*. *Vet. Trop.* 285(1): 79-92.
- Suárez, C.; García, F.; Román, D.; Coronado, A.; Perrone, T.; Reyna, A.; Parra, N. 2009. Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones ganaderas de Venezuela. *Zoot. Trop.* 27(4): 363-372.
- Sullivan, M. A.; Olson, C. L.; Winqvist, A. G.; Engman, D. M. 1994. Expression and localization of *Trypanosoma cruzi* hsp60. *Mol. Biochem. Parasitol.* 68(2): 197-208.
- Swallow, B. M. 2000. Impacts of trypanosomiasis on African agriculture. ILRI (Int. Livest. Res. Inst.), Nairobi, Kenya, pp. 1-46.
- Tabel, H.; Losos, G.J.; Maxie, M.G.; Minder, C.E. 1981. Experimental bovine trypanosomiasis (*Trypanosoma vivax* and *T. congolense*). III. Serum levels of immunoglobulins, heterophile antibodies, and antibodies to *T. vivax*. *Tropenmed. Parasitol.* 32(3): 149-153.
- Tait, A.; Morrison, L. J.; Duffy, C. W.; Cooper, A.; Turner, C. M.; Macleod, A. 2011. Trypanosome genetics: populations, phenotypes and diversity. *Vet. Parasitol.* 181(1): 61-68. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.04.024.
- Tamasaukas, R.; Roa, N. 1992. Epidemiología básica agroecológica de la tripanosomiasis bovina por *T. vivax*, en el estado Guárico, Venezuela. *Rev. Fac. Cien. Vet. U.C.V.* 38(1-8): 143-165.

- Tamasaukas, R.; Ruiz, H.; Aguirre, A.; Roa, N.; Cobo, M.; Aso, P. 2000. Agroecoe epidemiología de la tripanosomiasis por *Trypanosoma vivax*, en rumiantes en algunas fincas localizadas en Venezuela: Nota técnica. Revista Científica FCV-LUZ. X(6): 453-457.
- Tanaka, T.; Abe, Y.; Inoue, N.; Kim, W. S.; Kumura, H.; Nagasawa, H.; Igarashi, I.; Shimazaki, K. 2004. The detection of bovine lactoferrin binding protein on *Trypanosoma brucei*. J. Vet. Med. Sci. 66: 619-625.
- Taylor, K. A. 1998. Immune responses of cattle to African trypanosomes: protective or pathogenic? Int. J. Parasitol. 28(2): 219-240.
- Taylor, K. A.; Mertens, B. 1999. Immune response of cattle infected with African trypanosomes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94(2): 239-244.
- Tibbetts, R. S.; Kim, I. Y.; Olson, C. L.; Barthel, L. M.; Sullivan, M. A.; Winquist, A. G.; Miller, S. D.; Engman, D. M. 1994. Molecular cloning and characterization of the 78-kilodalton glucose-regulated protein of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 62(6): 2499-2507.
- Tizard, I. R. 2013. Veterinary Immunology. 9th Edition. Elsevier Saunders, USA. 551 pp.
- Toro, M. 1990. Seroepidemiología de las hemoparasitosis en Venezuela. En: Giardina, S.; García, F. (Eds.) Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico. Colección Cuadernos USB. Caracas, Venezuela. pp. 35-49.
- Toro, M.; León, E.; López, R.; Ruiz, A. 1980. Resultados de un muestreo sobre tripanosomiasis bovina mediante técnicas serológicas. Vet. Trop. 5(1): 43-50.
- Urquhart, G. M.; Armour, J.; Duncan, J. L.; Dunn, A. M.; Jennings, F. W. 1996. Veterinary Parasitology. 2nd Edition. Blackwell Science. Oxford, United Kingdom. 386 pp.
- Urquhart, G. M.; Holmes, P. H. 1987. African tripanosomiasis. In: Soulsby, E.J.L. (Ed.) Immunology responses in parasitic infections: Immunology, immunopathology and immunoprophylaxis. Vol. III. pp. 1-23.
- Uzcanga, G.; Mendoza, M.; Aso, P. M.; Bubis, J. 2002. Purification of a 64 kDa antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. Parasitology. 124: 287-299.
- Uzcanga, G.; Perrone, T.; Noda, J.; Pérez-Pazos, J.; Medina, R.; Hoebeke, J.; Bubis, J. 2004. Variant surface glycoprotein from *Trypanosoma evansi* is partially responsible for the cross-reaction between *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax*. Biochemistry. 43: 595-606.
- Valera, Z.; Parra, O.; Alvarado, M.; Barboza, G.; Escalona, F.; Ramírez, R. 2005. Efecto de la infección experimental con *Trypanosoma vivax* sobre parámetros hematológicos en ovinos. Revista Científica FCV-LUZ. XV(5): 412-420.

- Van der Ploeg, L. H.; Giannini, S. H.; Cantor, C. R. 1985. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science*. 228(4706): 1443-1446.
- Vertommen, D.; Van Roy, J.; Szikora, J. P.; Rider, M. H.; Michels, P. A.; Opperdoes, F. R. 2008. Differential expression of glycosomal and mitochondrial proteins in the two major life-cycle stages of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 158(2): 189-201. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.12.008.
- Ventura, R.; Paiva, F.; Silva, R. A. M. S.; Takeda, G.; Buck, G.; Teixeira, M. 2001. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp. Parasitol.* 99: 37-48.
- Vickerman, K. 1962. The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the *Trypanosoma brucei* sub-group: an hypothesis based on ultrastructural observations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 56: 487-495.
- Vickerman, K.; Barry, J. 1982. African trypanosomiasis. In: Cohen, S.; Warren, K. S. (Eds). *Immunology of parasitic infections*. 2nd. edition. Ed. Blackwell Scientific. Oxford. pp. 204-260.
- Wang, J. H.; Hewick, R. M. 1999. Proteomics in drug discovery. *Drug Discov Today*. 4(3): 129-133.
- Wasinger, V. C.; Cordwell, S. J.; Cerpa-Poljak, A.; Yan, J. X.; Gooley, A. A.; Wilkins, M. R.; Duncan, M. W.; Harris, R.; Williams, K. L.; Humphery-Smith, I. 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 16(7): 1090-1094.
- Watson, D. W.; Brandly, C. A. 1949. Virulence and pathogenicity. En: Clifton, C. E.; Raffel, S.; Barker, H. A. (Eds). *Annual Review of Microbiology*. Stanford, EE. UU: 195-220.
- Wells, E. A.; Betancourt, A.; Ramirez, L. E. 1982a. *Trypanosoma vivax* in Colombia. Epidemiology and economic impact. *World Animal Review*. July/September: 17-23.
- Wells, P. W.; Emery, D. L.; Hinson, C.A.; Morrison, W. I.; Murray, M. 1982b. Immunisation of cattle with variant-specific surfaceantigen of *Trypanosoma brucei*: the influence of different adjuvants. *Infect. Immun.* 36: 1-10.
- Werbovetz, K. A.; Sackett, D. L.; Delfín, D.; Bhattacharya, G.; Salem, M.; Obrzut, T.; Rattendi, D.; Bacchi, C. 2003. Selective antimicrotubule activity of N1-phenyl-3,5-dinitro-N4,N4-di-n-propylsulfanilamide (GB-II-5) against kinetoplastid parasites. *Mol. Pharmacol.* 64(6): 1325-1333.
- Westermeier, R. 2006. Sensitive, quantitative, and fast modifications for Coomassie Blue staining of polyacrilamide gels. *Practical Proteomics*. 1-2: 61-64.

- Wilm, M.; Shevchenko, A.; Houthaeve, T.; Breit, S.; Schweigerer, L.; Fotsis, T.; Mann, M. 1996. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature*. 379(6564): 466-469.
- Wilson, K.; Berens, R. L.; Sifri, C. D.; Ullman, B. 1994. Amplification of the inosinate dehydrogenase gene in *Trypanosoma brucei gambiense* due to an increase in chromosome copy number. *J. Biol. Chem.* 269(46): 28979-28987.
- Witola, W. H.; Lovelace, C. E. 2001. Demonstration of erythrophagocytosis in *Trypanosoma congolense*-infected goats. *Vet. Parasitol.* 96(2): 115-126.
- Wrightsmann, R. A.; Miller, M. J.; Saborio, J. L.; Manning, J. E. 1995. Pure paraflagellar rod protein protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 63(1): 122-125.
- Wrightsmann, R. A.; Manning, J. E. 2000. Paraflagellar rod proteins administered with alum and IL-12 or recombinant adenovirus expressing IL-12 generates antigen-specific responses and protective immunity in mice against *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*. 18(14): 1419-1427.
- Woo, P. T. K. 1969. The haematocrit centrifuge for detection of trypanosomes in blood. *Canadian Journal of Zoology*. 47: 921-923.
- Woods, A.; Sherwin, T.; Sasse, R.; MacRae, T. H.; Baines, A. J.; Gull, K. 1989. Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* 93(Pt 3): 491-500.
- Yakovich, A. J.; Ragone, F. L.; Alfonzo, J. D.; Sackett, D. L.; Werbovetz, K. A. 2006. *Leishmania tarentolae*: purification and characterization of tubulin and its suitability for antileishmanial drug screening. *Exp. Parasitol.* 114: 289-296.
- Young, J. C.; Agashe, V. R.; Siegers, K.; Hartl, F. U. 2004. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 781-791.

X. ANEXOS

10.- ANEXOS

Volumen normalizado de los 109 spots seleccionados inicialmente con el ANOVA incluido. Al final se muestra la leyenda de las etiquetas utilizadas para cada spot

Spot	Anova (p)	Fold	Etiqueta	Volumen Normalizado			
				Liem 1	Liem 2	Monagas	El Frio
1077	1.245e-004	4.7		0.743	0.574	0.642	2.695
1552	1.847e-004	5.6		1.315	1.132	1.083	0.236
1603	2.210e-004	12.1		0.504	1.549	0.858	0.128
1656	3.548e-004	11.2		0.414	0.336	0.276	3.094
1120	4.014e-004	4.8		0.345	1.092	0.637	1.654
758	4.309e-004	33.8		0.660	0.543	3.701	0.109
1889	7.788e-004	20.4		0.549	1.561	0.834	0.076
1926	8.710e-004	9.7		0.287	0.593	0.279	2.705
1099	0.001	5.0		1.063	1.098	1.160	0.233
793	0.001	8.8		0.563	0.320	2.831	0.416
1091	0.001	4.9		1.082	1.067	0.899	0.220
1916	0.001	17.8		0.741	1.321	0.925	0.074
1128	0.001	5.9		0.475	0.646	0.441	2.620
1766	0.002	8.6		0.491	0.547	0.447	3.824
895	0.002	11.7		0.543	1.682	0.694	0.143
985	0.002	6.5		1.111	1.110	1.034	0.170
1912	0.002	21.2		0.419	0.393	3.643	0.172
1508	0.002	9.8		0.432	0.369	0.265	2.592

Spot	Anova (p)	Fold	Etiqueta	Volumen Normalizado			
				Liem 1	Liem 2	Monagas	El Frio
902	0.002	15.3		0.609	1.538	0.995	0.101
605	0.002	7.7		1.056	1.353	1.001	0.176
1943	0.002	7.1		0.745	1.680	0.636	0.238
1472	0.002	11.8		0.452	0.403	0.265	3.127
1116	0.003	4.3		0.990	1.081	0.898	0.251
1611	0.003	3.4		0.452	1.532	0.713	0.569
762	0.003	7.6		0.779	1.218	1.040	0.159
1081	0.003	19.0		0.208	0.323	0.178	3.385
1535	0.003	3.1		0.587	1.257	1.005	0.402
1896	0.003	8.9		0.879	1.150	1.119	0.129
697	0.003	11.2		0.616	2.170	0.236	0.194
987	0.003	11.0		0.676	1.704	0.801	0.155
890	0.003	8.9		0.764	1.146	0.866	0.128
1353	0.003	7.5		0.547	0.416	0.409	3.075
660	0.003	10.0		0.897	1.286	1.044	0.129
1090	0.003	5.0		0.606	0.492	0.636	2.476
1938	0.003	9.2		0.720	1.362	1.053	0.148
850	0.003	6.3		1.035	1.178	1.009	0.187
1898	0.004	6.2		1.059	0.785	0.928	0.171
553	0.004	5.7		1.031	0.977	1.142	0.199
557	0.004	7.7		1.008	1.193	1.135	0.154

Spot	Anova (p)	Fold	Etiqueta	Volumen Normalizado			
				Liem 1	Liem 2	Monagas	El Frio
1101	0.004	5.8		0.844	1.750	0.870	0.300
556	0.004	6.7		1.034	1.020	1.186	0.177
1978	0.004	7.8		0.562	1.439	1.006	0.185
865	0.004	6.7		0.614	1.251	1.465	0.218
548	0.004	3.4		0.831	1.462	1.113	0.436
1553	0.004	3.6		0.888	1.250	0.969	0.344
1241	0.004	3.9		0.890	0.669	0.730	2.641
1819	0.004	8.0		0.463	0.547	0.505	3.716
1485	0.004	5.5		0.425	0.481	0.408	2.245
727	0.005	8.5		1.205	0.723	1.306	0.153
1391	0.005	5.9		1.069	1.265	1.155	0.213
685	0.005	5.3		0.407	0.496	0.426	2.173
1901	0.005	24.0		0.893	0.437	2.718	0.113
1909	0.005	25.0		0.977	0.584	4.523	0.181
563	0.005	6.5		0.828	1.169	1.081	0.179
602	0.006	5.6		1.166	1.034	1.146	0.209
1713	0.006	5.1		0.486	1.433	0.820	0.281
1538	0.006	2.4		1.143	0.976	0.959	0.473
984	0.006	4.7		0.742	1.601	0.789	0.344
845	0.006	9.1		1.221	1.088	1.176	0.134
2012	0.006	3.5		0.482	1.670	0.770	0.483

Spot	Anova (p)	Fold	Etiqueta	Volumen Normalizado			
				Liem 1	Liem 2	Monagas	El Frio
1560	0.006	3.8		1.091	1.327	1.017	0.350
950	0.007	6.2		0.988	1.196	1.118	0.193
788	0.007	9.0		1.212	1.291	0.700	0.143
760	0.008	5.6		0.452	1.345	0.641	0.241
1295	0.008	5.5		0.486	0.573	0.513	2.666
753	0.008	8.8		1.258	0.816	1.368	0.155
611	0.008	7.2		1.201	0.817	1.113	0.168
1928	0.008	9.1		1.142	1.019	1.194	0.130
662	0.008	5.3		0.976	1.164	1.179	0.223
678	0.009	6.3		0.672	1.712	0.622	0.273
1398	0.009	3.4		1.173	1.028	1.151	0.349
1903	0.010	24.5		0.371	0.351	4.226	0.172
1290	0.010	4.3		1.052	1.208	1.091	0.284
1913	0.010	17.7		1.300	0.739	2.616	0.148
732	0.010	14.9		0.990	0.919	1.547	0.104
932	0.011	5.5		0.693	1.729	0.749	0.316
891	0.011	6.6		0.731	0.899	0.980	0.148
729	0.011	9.6		1.054	0.954	1.285	0.134
1990	0.011	8.7		1.425	1.044	1.255	0.164
1917	0.012	11.0		1.328	0.843	1.206	0.121
1930	0.012	8.9		1.345	0.986	0.933	0.152

Spot	Anova (p)	Fold	Etiqueta	Volumen Normalizado			
				Liem 1	Liem 2	Monagas	El Frio
1948	0.012	6.6		1.183	1.333	1.123	0.201
1959	0.013	4.0		0.805	1.072	0.927	0.269
626	0.013	3.6		0.681	1.684	0.823	0.466
1969	0.013	4.4		1.045	0.946	0.950	0.235
1919	0.013	11.7		1.215	1.443	0.472	0.124
1052	0.013	6.0		1.245	1.051	1.038	0.209
1979	0.014	10.2		1.405	1.295	0.601	0.138
1906	0.015	16.9		1.190	1.012	5.634	0.334
2010	0.017	4.2		1.061	0.953	0.938	0.252
938	0.017	5.6		0.942	1.140	0.944	0.205
1053	0.019	5.6		0.611	1.509	0.765	0.268
1368	0.019	2.6		0.599	1.539	0.973	1.267
1986	0.020	10.1		1.332	1.489	0.552	0.147
1999	0.020	5.7		1.013	1.114	0.984	0.194
1266	0.021	4.5		0.671	1.431	0.955	0.318
898	0.021	3.9		0.776	1.545	0.872	0.395
2004	0.023	2.1		1.618	1.549	1.700	3.198
728	0.023	11.5		0.769	0.706	1.669	0.146
785	0.024	5.2		1.336	1.033	0.692	0.258
900	0.024	4.8		0.701	0.887	2.034	0.423
559	0.024	3.4		1.249	1.137	0.683	0.363

Spot	Anova (p)	Fold	Etiqueta	Volumen Normalizado			
				Liem 1	Liem 2	Monagas	El Frio
2024	0.026	6.3		0.503	1.591	0.868	0.254
613	0.026	9.8		1.101	1.096	1.130	0.115
1401	0.029	2.8		1.228	1.088	1.085	0.434
2023	0.033	5.8		0.850	0.707	2.528	0.434
527	0.035	2.7		0.612	1.655	0.841	0.655
540	0.037	4.4		1.108	1.034	1.268	0.291
931	0.059	2.1		0.759	1.500	0.738	0.705

Etiquetas	
	Específico T. evansi (vs T. vivax)
	T. vivax Monagas
	T. vivax Liem
	Específico T. vivax (vs T. evansi)
	Superespecífico T. vivax
	Superespecífico T. vivax Liem 2
	Superespecífico T. vivax Monagas
	Superespecífico T. vivax Liem
	Variabilidad Liem1>Liem2
	Variabilidad Liem2<Liem1
	Variabilidad Liem2>Liem1