

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES DE Trypanosoma cruzi, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A:

BIÓL. ELBA CARRASCO RAMÍREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ

MÉXICO, D. F.



MARZO, 2005

COORDINACIÓN

m341987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Elba Carrasco
Ramírez
FECHA: 11-03-05
FIRMA: E. Carrasco

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 29 de noviembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Carrasco Ramírez Elba con número de cuenta 89248830 y número de expediente 3991089, con la tesis titulada: "Identificación de antígenos inmunodominantes de *Trypanosoma cruzi*, Purificación y Caracterización", bajo la dirección del(a) Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez.

Presidente:	Dra. Annie Pardo Semo
Vocal:	Dr. Ruy Pérez Montfort
Secretario:	Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez
Suplente:	Dra. Patricia Margarita Tato Saldivar
Suplente:	Dra. Lilián Yépez Mulia

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 17 de febrero del 2005


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó bajo la dirección de la Dra Bertha Espinoza Gutiérrez en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, y fue financiada parcialmente por CONACyT 2795 M y la DGAPA (UNAM), proyecto IN232399.

Agradezco a DGAPA por la asignación de una beca durante mis estudios de maestría.

Al Comité Tutoral integrado por la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez, la Dra. Annie Pardo y la Dra. Lilian Yépez Mulia.

Al jurado asignado por sus observaciones y sugerencias para el mejoramiento de este trabajo.

A la Biól. Esther Pacheco y a la M. en C. Georgina Nieto por su asesoría técnica dentro del laboratorio.

Al M. en C. Antonio Ramírez Bárcenas y a la Dra. Lilia Robert Guerrero por su colaboración en la preparación del seminario de este trabajo.

Al M.V.Z. Gerardo Arrellin por su ayuda en el cuidado de los animales de laboratorio.

Al fotógrafo del Instituto de Investigaciones Biomédicas por el material de ilustración de la tesis.

DEDICATORIA

A mis padres, **Antonia y Enrique**, por su apoyo incondicional, su cariño y su confianza

A mis hermanas, **Angélica y Marisela**, por compartir todos los buenos momentos de la vida

A la pequeña **Liliana** por su presencia y su alegría

A **Carolina** por su amistad y ser parte de la familia

Y por supuesto, a **Lilia** por todas sus recomendaciones y enseñanzas

	PAGINAS
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.	2
2.1. Biología de <i>T. cruzi</i>	2
2.1a. Posición taxonómica	2
2.1b. Morfología	2
2.2. Ciclo de vida	3
2.3. Heterogeneidad de <i>T. cruzi</i>	5
2.4. Enfermedad de Chagas	6
2.4a. Distribución geográfica	6
2.4b. Mecanismos de transmisión	8
2.4c. Fases la enfermedad de Chagas	9
2.4d. Diagnóstico de la enfermedad	10
2.4e. Enfermedad de Chagas en México	11
2.5. Respuesta inmune	13
2.6. Purificación de antígenos	15
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. OBJETIVOS	21
5. METODOLOGIA	22
5.1. Parásitos.	22
5.2. Cultivos.	22
5.2a Cultivo de células Vero	22
5.2b. Cultivo de epimastigotes	22
5.2c. Tripomastigotes sanguíneos	23
5.2d. Cultivo de tripomastigotes.	23
5.2e. Cultivo de promastigotes de <i>Leishmania</i> sp	24
5.3. Extractos antigénicos.	24
5.4. Cuantificación de Proteínas.	25
5.5. Purificación de IgGs de conejo	25
5.6. Purificación de antígenos.	25
5.6a. Purificación de antígenos por electroelución	26
5.6b. Purificación de antígenos por cromatografía de afinidad	26
5.6c. Purificación de cruzipaina por el método de fraccionamiento ácido.	28
5.7. Caracterización de los antígenos purificados.	29

5.7a. Geles de poliacrilamida en condiciones reductoras.	29
5.7b. Actividad proteolítica.	29
5.7c. Identificación de glicoproteínas por medio de lectinas biotiniladas.	30
5.8. Muestras de sueros	30
5.9. Ensayos serológicos	31
5.9a. Inmunolectrotransferencia (IET)	31
5.9c. ELISA.	31
6. RESULTADOS	33
6.1. Cultivos	33
6.2. Evaluación de los extractos antigénicos	35
6.3. Análisis de proteínas de epimastigotes purificadas por electroelución	37
6.4. Purificación de IgGs de conejo anti- <i>T. cruzi</i>	41
6.5. Purificación de antígenos por columna de afinidad	42
6.6. Purificación de cruzipaina	44
6.7. Caracterización de antígenos	45
6.7a. Actividad proteolítica.	45
6.7b. Caracterización de antígenos por medio de lectinas biotiniladas.	46
6.8. Respuesta inmune humoral con extracto de epimastigotes	50
6.9. Detección de anticuerpos anti- antígenos purificados	52
7. DISCUSIÓN	60
8. CONCLUSIONES	66
9. BIBLIOGRAFIA	67
APÉNDICE 1	77
APÉNDICE 2	80
APÉNDICE 3	82
APÉNDICE 4	83
APÉNDICE 5	84
APÉNDICE 6	85
APÉNDICE 7	87
APÉNDICE 8	88

LISTA DE ABREVIATURAS

ASB. Albúmina Sérica Bovina

CCC. Cardiopatía chagásica crónica

DO. Densidad óptica

DS. Desviación estándar

EDTA. Ácido etilendiamin tetraacético

ELISA. Ensayo inmunoenzimático

HCl. Ácido clorhídrico

IET. Inmunolectrotransferencia

IgA. Inmunoglobulina A

IgG. Inmunoglobulina G

IgM. Inmunoglobulina M

IL2. Interleucina 2

INC. Instituto Nacional de Cardiología

KCl. Cloruro de potasio

kDa. Kilodalton

LIT. Infusión de hígado triptosa

PBS. Solución balanceada de fosfatos

PMSF. Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PSG. Solución de fosfatos glucosada

SDS/PAGE. Dodecil sulfato de sodio/gel de electroforesis de poliacrilamida

SFB. Suero fetal de bovino

WGA. Aglutinina del germen de trigo

Z1. Zimodema 1

Z2. Zimodema 2

Z3. Zimodema 3

1. RESUMEN

Se identificaron por inmunoelectrotransferencia (IET) los antígenos más reconocidos (inmunodominantes) por pacientes mexicanos con enfermedad de Chagas crónica sintomática y asintomática. El objetivo del presente estudio fue purificar y caracterizar antígenos de *Trypanosoma cruzi* (cepa Querétaro) y evaluar la respuesta inmune a éstos por parte de los individuos con enfermedad de Chagas. Los antígenos de 40-50 Y 70-80 kDa fueron purificados utilizando geles preparativos de poliacrilamida al 12% y 10%, de donde se cortaron de acuerdo a su peso molecular y se recuperaron del gel por medio de electroelución. También se purificó la cruzipaina, molécula altamente inmunogénica y blanco de la respuesta inmune del hospedero, motivo por el cual ha sido empleada en pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Los antígenos purificados resultaron ser glicoproteínas que unían residuos de alfa-manosa, glucosa y N-acetil glucosamina, los cuales fueron identificados por su afinidad por lectinas. Además, por ELISA, se evaluó el reconocimiento de estos antígenos por sueros de individuos en fase crónica sintomática y asintomática provenientes de México y Brasil. Se encontró que los sueros de individuos brasileños reconocieron en mayor porcentaje a los antígenos purificados que los sueros de individuos mexicanos en las dos diferentes fases de la enfermedad. Estas diferencias podrían estar dadas por una respuesta inmune diferente, producida por el origen geográfico de cepas del parásito que induce una respuesta inmune heterogénea en individuos de regiones geográficas distintas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Biología de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un parásito intracelular que causa la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana. Este parásito es transmitido por varias especies de insectos reduvidos y muchas especies de mamíferos son reservorios de este protozooario patógeno (Kuhn, 1981).

2.1a. Posición Taxonómica (Levine y cols., 1980)

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero	<i>Schizotrypanum</i>
Especie	<i>Trypanosoma cruzi</i>

2.1b. Morfología. La identificación de los estados de desarrollo del parásito se basa en criterios morfológicos como la posición del cinetoplasto y del núcleo, la forma general de la célula y del lugar donde emerge el flagelo. De acuerdo a estos criterios, se identifican tres formas del parásito (Pereira, 1990):

Tripomastigote. Se caracteriza porque es relativamente pequeño, mide de 16 a 20 µm (Schmidth y Roberts, 1989) tiene forma de c, un cinetoplasto voluminoso, subterminal y grande además de la membrana ondulante a lo largo del cuerpo. Esta forma no se multiplica pero constituye la forma infectante para los mamíferos y triatominos. En los mamíferos es el diseminador de la infección por vía sanguínea.

Amastigote. Es la forma intracelular, prácticamente es inmóvil, tiene alta capacidad de multiplicarse por división binaria (Pinto, 1984) dentro del citoplasma de diferentes células como el corazón, músculo, hígado y bazo; carece de flagelo y membrana ondulante, su núcleo es central y el cinetoplasto es pequeño (1 a 4 μm) (Schmidth y Roberts, 1989) tiene forma redondeada o esférica y se encuentra en los tejidos de los mamíferos.

Epimastigote. Es la forma de multiplicación del parásito en el interior del triatomino y la predominante en el medio de cultivo. Es fusiforme, mide de 20 a 40 μm de longitud, el núcleo está en el centro, pero el cinetoplasto del extremo anterior se ha desplazado al centro quedando junto al núcleo, de ahí se forma el flagelo y queda una parte en la porción anterior empezando a aparecer la membrana ondulante (Romero, 1993).

2.2. Ciclo de vida. *Trypanosoma cruzi* descubierto en Brasil por Carlos Chagas en 1909 (Chagas, 1909), es un parásito hemoflagelado, responsable de la enfermedad de Chagas, ésta representa un gran problema de salud pública en el continente Americano por su impacto socioeconómico y distribución geográfica. El ciclo de vida del parásito involucra a un insecto perteneciente a la familia Reduviidae en cuyo intestino se localiza la forma infectiva, llamada tripomastigote metacíclico, que penetra al hospedero mamífero a través de lesiones de la piel o de las superficies mucosas. El parásito puede infectar a una gran variedad de células dentro de las cuales se transforma en amastigote, capaz de replicarse por fisión binaria (Pinto, 1984; Schmidth y Roberts, 1989). Eventualmente estos salen de las células en forma de tripomastigotes sanguíneos que son diseminados a otras células y tejidos a través del torrente sanguíneo donde pueden ser digeridos por el insecto vector y continuar el ciclo de vida (Kierszenbaum y Szein, 1994) (Figura 1).

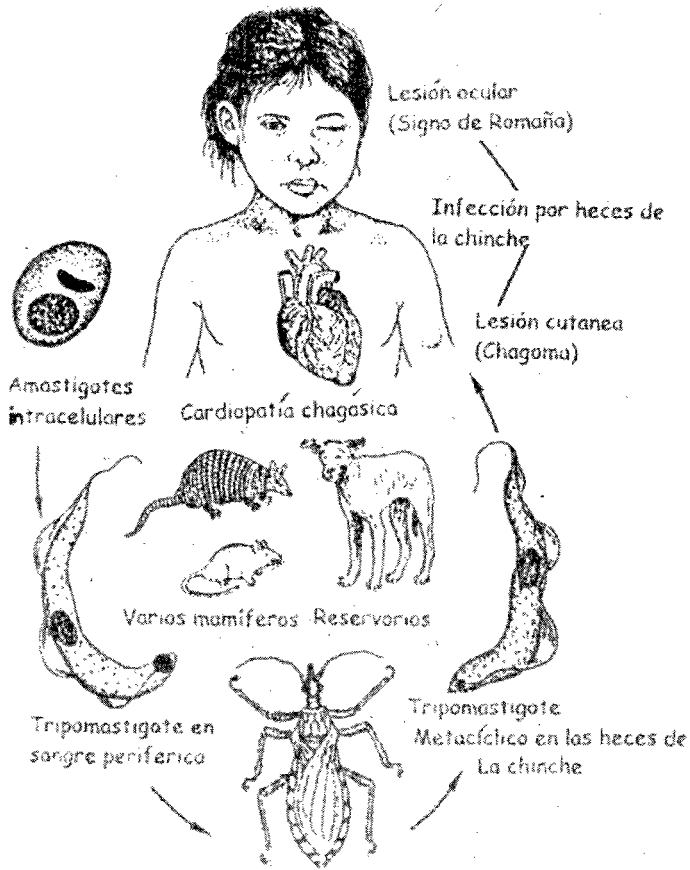


Figura 1. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Involucra los diferentes estadios del parásito tanto en la chinche como en el humano (tomado de Markell y Vogue, 1999).

2.3. Heterogeneidad de *T. cruzi*. Este parásito presenta un alto grado de heterogeneidad genética, misma que puede ser la causa de las variaciones observadas en los cuadros clínicos de la enfermedad donde existe desde una muerte súbita hasta un comportamiento asintomático (Miles y cols., 1978). Se han documentado diferencias entre los aislados de *T. cruzi*, tanto en el comportamiento en hospederos a nivel experimental (Andrade, 1974), como en la composición antigénica (Andrade y cols., 1981) y susceptibilidad al efecto causado por drogas. Una forma de abordar esta heterogeneidad que ha proporcionado valiosa información, es la caracterización bioquímica de los aislados de este parásito presentes en diferentes regiones del continente Americano. A principios de los años 70 en Brasil, se empezaron a usar enzimas de parásitos protozoarios como marcadores genéticos en estudios de epidemiología, biología básica y taxonomía. En el caso de *T. cruzi*, se identificaron dos grupos diferentes del parásito, provenientes de distintos ciclos de transmisión, uno de un ciclo silvestre denominado zimodemo 1 (Z1) y otro de un ciclo doméstico o zimodemo 2 (Z2). Un tercer grupo se identificó en Brasil y se denominó zimodemo 3 (Z3), el cual fue aislado de ciclos domésticos y silvestres (Miles y cols., 1977). Debido a la escasez de datos genéticos de los aislados mexicanos y a la aparente baja incidencia de la enfermedad de Chagas en México, se realizó inicialmente un estudio de caracterización de 17 aislados mexicanos de *T. cruzi*, donde se demostró que éstos eran cercanos al zimodemo 1 y eran heterogéneos a nivel genético, observación hecha a partir del análisis del DNA total, del cinetoplasto y de isoenzimas. Esta heterogeneidad se relacionó con el origen geográfico de los parásitos, identificándose que sólo el aislado C4, procedente de Jalisco, presentó un comportamiento similar con los aislados de Sudamérica tipo Z2 (López-Olmos y cols., 1998). De manera importante en estos estudios se demostró una amplia heterogeneidad en el comportamiento biológico de estas cepas (López-Olmos, 1994). La caracterización de otras 5 cepas mexicanas, aisladas de pacientes originarios del estado de Jalisco, mostró una correlación entre la capacidad para matar ratones, el patrón genético determinado por RFLP y los síntomas clínicos producidos por las diferentes cepas del

parásito en los pacientes infectados (Espinoza y cols., 1998). Dado que los estudios realizados por medio de isoenzimas, analizan de manera indirecta la variación genética, se estudió sistemáticamente el genoma por medio de la amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPDS) para realizar la caracterización molecular del parásito. De esta manera se observó una variabilidad genética de 56 aislados mexicanos de *T. cruzi* por medio de RAPDS donde la mayoría de los parásitos están dentro del grupo Z1 o del linaje 1, el cual corresponde al ciclo selvático, y que están distribuidos ampliamente en la República Mexicana (Bosseno y cols., 2002).

Por todo lo anterior, resulta importante realizar un análisis genético de aislados mexicanos para poder correlacionar los datos genéticos con manifestaciones clínicas de pacientes locales (Sosa-Jurado y cols., 2003), ciclos de transmisión e importancia biogeográfica de este parásito y poder, con esta información, integrar los aislados de esta parte del continente con el esquema de evolución que se ha propuesto para los aislados sudamericanos (Umezawa y cols., 2004).

2.4. Enfermedad de Chagas

2.4a. Distribución geográfica

La enfermedad de Chagas se encuentra ampliamente distribuida en toda América Latina, se estima que existen sesenta millones de personas que viven en áreas endémicas y que dieciocho millones padecen la enfermedad (Figura 2). En algunos países sudamericanos, se han realizado campañas tendientes a controlar el vector y se han creado institutos con el fin de investigar tanto al vector como al parásito que produce esta enfermedad, así como la epidemiología de la misma (Tay y cols., 1992).



Figura 2. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas. Se muestran los principales países (zonas punteadas) con casos humanos infectados con *T. cruzi* (tomado de OMS, 1991).

2.4b. Mecanismos de transmisión

La principal vía de transmisión de *T. cruzi*, es a través del contacto directo con el vector que constituye la vía natural, aunque también se transmite por sangre contaminada y por trasplante de órganos de individuos infectados (Ruíz y cols., 1994).

Vectores. En los trópicos, los insectos vectores también conocidos como chinches besuconas o triatominos, suelen vivir dentro de las casas de barro con techo de paja para descansar durante el día y alimentarse por la noche de personas dormidas. La infección prevalece generalmente en áreas rurales, donde las deficientes condiciones de alojamiento proporcionan un hábitat adecuado para las chinches (Tay y cols., 1992).

En México existen 27 especies de triatominos y 18 de éstas han sido reportadas con infección natural (Zárate y Zárate, 1985). En un estudio de laboratorio realizado a lo largo de siete años, se identificó que de los 5399 ejemplares de triatominos colectados, 13 especies de triatominos estaban asociadas a las viviendas. El porcentaje de infección natural tuvo una amplia variación entre las especies, de las cuales, nueve se identificaron con infección natural y el mayor porcentaje de infección correspondió a *Triatoma pallidipenis*, *T. picturata*, *T. longipenis* y *Rhodnius prolixus*. Los estados con mayor porcentaje de infección fueron Nayarit, Morelos y Michoacán (Vidal-Acosta y cols., 2000). Estos informes sugieren que se debe poner mayor énfasis al estudiar la biología de estos insectos y así realizar una vigilancia permanente para mantener los registros de distribución actualizados y conocer los índices de infección natural por *T. cruzi*, de las especies domiciliadas, peri domiciliarias y de las que están en proceso de adaptación a la vivienda humanas (Martínez-Ibarra y cols., 2001).

Transfusión sanguínea. Se sabe que por lo menos un 60% de pacientes chagásicos crónicos presentan permanentemente formas circulantes de *T. cruzi*. El parásito puede transmitirse por vía sanguínea e inclusive permanecer vivo en la sangre guardada en congelación durante 2 semanas o más. El parásito también se puede adquirir a través de trasplantes de órganos debido a que se encuentra en riñón, páncreas, ganglios linfáticos,

corazón, tubo digestivo y musculatura estriada. Para transplantes o transfusiones, el empleo de corticoesteroides e inmunosupresores aumenta el riesgo de transmisión porque eleva la parasitemia del donador o disminuye la resistencia del receptor (Pinto, 1984).

Transmisión congénita. Ocurre en 0.7 a 10.5 % de niños donde la madre está infectada con el parásito. La infección intrauterina puede causar aborto o nacimiento prematuro. Los síntomas de la enfermedad pueden ser severos y aparecen poco tiempo después del parto o son asintomáticos. Los niños infectados raramente sobreviven hasta la pubertad (Brabin, 1992; Dusanic, 1991).

Por otra parte, han sido diagnosticados algunos animales domésticos (el perro y el gato) o silvestres (armadillos, tlacuaches, ratones, ratas, ardillas), los cuales juegan un papel muy importante en la persistencia de *T. cruzi*, ya que son agentes importantes en la transmisión de la enfermedad de Chagas (Solís Franco y cols., 1997;). Otros estudios realizados en el estado de Morelos, informan la presencia de un reservorio peridoméstico de *T. cruzi* (el cerdo) infectado naturalmente (Bautista, 1993; Salazar Schettino y cols., 1997).

2.4c. Fases de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas causada por *T. cruzi*, se presenta en tres fases:

En la fase aguda, el parásito se puede detectar en la sangre, se caracteriza por diversas manifestaciones clínicas y la sintomatología puede ser leve o muy severa dependiendo del estado inmune del hospedero.

En la fase indeterminada o crónica asintomática, no hay síntomas, pero las pruebas de diagnóstico pueden ser positivas, se cree que los parásitos continúan una lenta multiplicación intracelular dentro de los órganos o tejidos del hospedero (Dusanic, 1991).

La fase crónica sintomática es la más evidente de la enfermedad, no solo por incapacitar a los pacientes, sino porque con frecuencia los lleva a la muerte. Se caracteriza por una disfunción del tejido en los órganos afectados, debido a una hipertrofia de las capas musculares así como también fibrosis que trae como consecuencia un engrosamiento de la pared de los

órganos (Brener y Kretzli, 1990).

2.4d. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

El diagnóstico de la infección causada por el parásito se basa en aspectos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio (Romero, 1993). Debido a que la enfermedad de Chagas, en infección aguda y crónica es generalmente asintomática, el laboratorio tiene la enorme responsabilidad del diagnóstico para conocer la prevalencia de la infección dentro de la población y el control de los bancos de sangre de la infección por transfusión sanguínea.

La realización del diagnóstico de la enfermedad de Chagas en México, aún sigue siendo un reto, las principales razones son las características de la población afectada, que solo en recientes fechas tiene acceso a servicios de salud, el desconocimiento de la historia natural de la enfermedad, y finalmente, el pobre uso de los métodos paraclínicos indispensables para el diagnóstico parasitológico y/o serológicos necesarios para corroborar la impresión clínica. Estos métodos paraclínicos no son accesibles para muchos médicos en áreas rurales (Dumonteil, 1999; Monteón-Padilla y cols., 2002).

Los métodos de diagnóstico tradicionales, como el frotis sanguíneo grueso, el microhematocrito y/o el examen de las preparaciones con alguna tinción, permiten la caracterización morfológica del parásito (OMS, 1991). Estas técnicas son específicas durante la fase aguda, es decir, solo en las primeras 6-8 semanas de la infección debido a la gran cantidad de parásitos circulantes. Otro método parasitológico es el xenodiagnóstico que consiste en la reproducción artificial del ciclo natural del parásito a través de triatomíneos limpios que ingieren la sangre del paciente. Se utiliza también el hemocultivo que permite el crecimiento de los parásitos en un medio de cultivo a partir de la sangre extraída de un paciente, pero éste presenta una sensibilidad menor del 50% en los casos crónicos (Pereira y cols., 1989; OMS 1991). Los métodos serológicos como el ELISA, Inmunofluorescencia indirecta y IET, son los más sensibles y relativamente rápidos, sin embargo puede existir reacción cruzada con otros organismos como *Leishmania* sp. o *T. rangeli*. Generalmente el ELISA utiliza como antígeno, el

extracto total del parásito para la detección de anticuerpos en el suero de individuos infectados; sin embargo, el uso de antígenos completos puede resultar en la reducción de la especificidad del ensayo ya que muchos parásitos muestran proteínas similares (Scharfstein y cols., 1985).

Con la idea de mejorar la especificidad, la sensibilidad y la reproducibilidad de las técnicas empleadas, se están realizando investigaciones para la producción de nuevos antígenos que permitan mejorar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Freilij y Stonino, 1994). Por otro lado, la OMS recomienda al menos tres técnicas serológicas para establecer la presencia de la infección.

2.4e. Enfermedad de Chagas en México

En México, la enfermedad de Chagas tiene importancia relevante principalmente en estados como Oaxaca, Morelos, Jalisco, Chiapas, Veracruz, Nayarit y Guerrero, donde se han descubierto diferentes especies de vectores infectados con el parásito asociados con la vivienda humana (Tay y cols., 1992; Martínez-Ibarra y cols., 2001; Vidal-Acosta y cols., 2000) y altos niveles de seroprevalencia en casos humanos con infección aguda y crónica (Velasco-Castrejón y cols., 1992; Rangel-Flores y cols., 2001, Trujillo y cols., 2000).

Hasta 1992 se habían descrito alrededor de 300 casos humanos de infección de *T. cruzi*. Los estados de la República Mexicana donde se han encontrado más casos humanos de la enfermedad, diagnosticados parasitológicamente o por el estudio de biopsias son, Guerrero, Chiapas, Jalisco, Yucatán, Zacatecas y Morelos (Velasco-Castrejón y cols., 1992; Rangel-Flores y cols., 2001; Sánchez-Guillen y cols., 2002). Es importante señalar que los individuos infectados, que no presentan sintomatología de la enfermedad, son un agente de diseminación por mecanismos distintos a los naturales, por ejemplo la donación de sangre (Goldsmith y cols., 1978; Monteón Padilla y cols., 1999; Rangel y cols., 1998). Este mecanismo de infección es especialmente importante en zonas urbanas, debido a que se ha encontrado una seroprevalencia de 0.28% de anticuerpos contra el parásito en los donadores de sangre que acudieron al Instituto Nacional de Cardiología (INC) "Ignacio Chávez" (Ramos-Echevarría y

cols., 1993). En un estudio, donde participaron 18 bancos de sangre de la Secretaría de Salud de diferentes estados, se encontró una prevalencia de 1.6%, por lo que se sugirió hacer un tamizaje serológico en otros bancos de sangre y evitar de alguna manera el alto riesgo de infección por esta vía (Guzmán-Bracho y cols., 1998). En otro estudio realizado con 3000 donadores, provenientes de diferentes áreas endémicas, se identificaron 10 individuos seropositivos (0.3%) que fueron considerados como indeterminados, 100% de estos tenían IgG y 30% IgA. En ocho de estos sujetos se identificó el DNA del parásito (Monteón-Padilla y cols., 1999). Recientemente, en un estudio realizado en donadores de sangre de una zona no endémica de Puebla, se encontró una seroprevalencia de 7.7%, porcentaje similar a la que se encuentra en regiones endémicas de Sudamérica, confirmando así, que la transfusión sanguínea es un parámetro crucial en la transmisión de la enfermedad en México (Sánchez-Guillén y cols., 2002).

Otros estudios realizados en México se han enfocado a conocer la incidencia de la cardiopatía chagásica crónica (CCC) (Monteón-Padilla y cols., 1996; Reyes y cols., 1983); en Guerrero encontraron 60 casos con CCC de 158 pacientes que habían estado expuestos a vectores de *T. cruzi* (Mendoza-González y cols., 1992); mientras que en Mérida se reportaron 7 casos con CCC de 36 pacientes estudiados (Zavala y cols., 1993). Los estudios realizados en el INC mostraron que en México existen al menos unos 5000 sujetos con CCC evidente (Monteón-Padilla. 2002).

A pesar de los estudios mencionados, aún existe controversia sobre la prevalencia de la infección causada por *T. cruzi*, sin embargo, cada vez es mayor el número de evidencias que muestran que la enfermedad por *T. cruzi* es un grave problema de salud pública debido entre otras cosas a la presencia del vector cuyos hábitos son domésticos y peridomésticos (Dumonteil, 1999).

2.5. Respuesta inmune.

T. cruzi, produce en el hospedero, una respuesta inflamatoria local aguda; la corriente linfática lleva a los tripomastigotes hacia los nódulos linfáticos, donde después de la ingestión por histiocitos y otras células, se transforman en amastigotes, mismos que proliferan dentro de células del corazón, músculo liso y células de la neuroglía. Los amastigotes se adhieren a la membrana celular, sugiriendo la presencia de receptores en ella, y aunque son usualmente fagocitados, estos pueden activamente penetrar a la célula. Después de la multiplicación local, el parásito asume la forma tripomastigote para invadir el torrente sanguíneo llevando la infección a todas partes del cuerpo. Alternativamente, los tripomastigotes pueden invadir activamente macrófagos y otras células. Existen evidencias que sugieren que las interacciones de carbohidratos tipo lectina como la N-acetilglucosamina, están involucradas en la unión de tripanosomas a la célula hospedera (Labriola y cols., 1999).

El chagoma consiste de una intensa reacción inflamatoria, con invasión de histiocitos, células adiposas del tejido subcutáneo y células musculares adyacentes debido a la proliferación de amastigotes y a la producción de glicoproteínas que estimulan la síntesis de citocinas proinflamatorias y quimiocinas (Teixeira y cols., 2002). Al inicio de la fase crónica de la infección, el corazón puede tener un tamaño normal ó ligeramente alargado aunque después se puede desarrollar una cardiomegalia masiva. En ésta hay una inflamación difusa en el miocardio, fibrosis e infiltración de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. El peso del corazón se incrementa y todas las cámaras, especialmente el ventrículo derecho, empiezan a dilatarse (Markell y Vogue, 1999).

Se han descrito varias alteraciones de la respuesta inmune provocados por la infección por *T. cruzi* como una severa inmunosupresión de la respuesta humoral y celular así como una activación policlonal de células B y T, incluyendo la expansión de células autorreactivas (Cordeiro Da Silva, 1998). Algunos estudios explican que esto ocurre a nivel de la expresión del receptor de alta afinidad para la interleucina 2; al parecer, condicionadas por una subpoblación

de macrófagos, que son menos activos, pero capaces de suprimir la respuesta de células activadas o sensibilizadas mediante la inhibición del mecanismo de producción de IL-2 (Zambrano-Villa y cols., 2002). Otros estudios han demostrado en fragmentos del miocardio que la miocarditis chagásica crónica está conformada principalmente por células T CD8⁺ y en menor proporción por células T CD4⁺, y en presencia de antígenos de *T. cruzi* aumenta la cantidad de células T CD8, reforzando la hipótesis de que los antígenos del parásito desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la miocarditis y que un cierto grado de inmunosupresión está presente en la fase crónica de la enfermedad, manteniendo de esta manera la sobrevivencia del parásito dentro del hospedero (Higuchi, 1999; Girones y Fresno, 2003).

Durante la etapa aguda, el hospedero puede mantener niveles altos de anticuerpos de tipo IgM, posteriormente se incrementan los niveles de IgG e IgA. durante la fase crónica asintomática, y finalmente en la fase crónica sintomática de la enfermedad, los problemas de tipo cardíaco y visceral son frecuentes. La predominancia de anticuerpos de la clase IgG2a en ratones durante este período, se han asociado con protección contra la infección (López-Olmos, 1999; Caballero, 1996).

Se ha identificado que la respuesta humoral anti-*T. cruzi* y el isotipo de inmunoglobulina hallado en individuos con enfermedad de Chagas, está relacionado con las diferentes manifestaciones clínicas. De esta manera, altos títulos de IgG correlacionan con el daño cardíaco presentados por los pacientes (Hernández-Becerril y cols., 2001).

Otro aspecto interesante es la similitud que guardan algunos antígenos del parásito con proteínas del hospedero, induciendo procesos de autoinmunidad así como de tolerancia (Soares y cols., 2001). Estudios de inmunidad mediada por células también han demostrado que los linfocitos de pacientes humanos o de animales infectados a menudo reaccionan contra tejido cardíaco o nervioso. La transferencia de linfocitos cooperadores o citotóxicos de ratones con infecciones crónicas hacia ratones normales, ha originado desmielinización del nervio ciático e inflamación del hígado en los animales receptores. Aún no se ha descifrado una

relación directa entre la patología y los niveles de autoanticuerpos en pacientes humanos, por lo que es posible, que la patología del humano, sea un episodio remoto que no guarda relación con las respuestas inmunes prevalentes al momento del examen. Pocos especialistas dudan del origen autoinmune de la enfermedad de Chagas crónica (Tarleton y Zang, 1999), no obstante, aún existen controversias acerca de los mecanismos con que esta opera.

A pesar de todos estos datos aún no es posible reproducir la patología típica de la enfermedad de Chagas crónica en animales de laboratorio, aunque recientemente se identificó que el hámster podría representar un buen modelo debido a que desarrolla daños histopatológicos similares a los descritos en humanos, incluyendo la pancreatitis crónica (Santos y cols., 2002). Mientras que, en el modelo murino se puede observar el tropismo del parásito a diferentes órganos como el corazón y el músculo esquelético (Vera-Cruz y cols., 2003).

2.6. Purificación de antígenos

El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* constituye uno de los elementos más importantes para el control de la transmisión. Desde el punto de vista de los antígenos, se han realizado muchos estudios y definido moléculas, sobre todo en el sur del Continente Americano (Da Silveira y cols., 2001), que no sólo han contribuido al mejoramiento del diagnóstico (Umezawa y cols., 2003), sino que algunas moléculas han sido propuestas como marcadores de patología y parecen tener valor predictivo de la evolución de la enfermedad (Freilij y Storino, 1994).

En la actualidad, los distintos antígenos utilizados en el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* son producidos a partir de parásitos cultivados *in vitro* y procesados mediante diversos procedimientos fisicoquímicos. Estos antígenos han sido adecuados aunque es necesario estudiar con mayor detalle su estabilidad. En este sentido, la búsqueda y caracterización de nuevos antígenos de *T. cruzi* potencialmente útiles para el diagnóstico e inmunoprofilaxis de la enfermedad de Chagas, podría contribuir a estos fines permitiendo al mismo tiempo un aumento

de la especificidad de las reacciones utilizadas (Ruiz y cols., 1994).

Uno de los antígenos estudiados en Brasil, tiene una masa molecular de 25 kDa y está presente en todos los estadios del parásito fue reconocido por 97.8% de los sueros de pacientes sintomáticos y asintomáticos (Scharfstein y cols., 1985). Los antígenos de 21 y 31 kDa se han evaluado por ELISA, pero su uso resultó limitado, debido a la reacción cruzada identificada en el suero de pacientes con otras enfermedades como la leishmaniosis. En otro estudio, realizado en Argentina, se aislaron proteínas del citoplasma del parásito, con un peso molecular de 59, 80, 86 y 110 kDa, las cuales fueron reconocidas por sueros de individuos chagásicos mientras que las proteínas de 21 y 31 kDa aparentemente reaccionaron con los sueros controles (De Tito y cols., 1987). Una glicoproteína de 90 kDa, descrita por Snary y Hudson en 1979, aislada de epimastigotes o purificada de tripomastigotes, se utilizó con éxito en una ELISA que permite el diagnóstico diferencial entre la enfermedad de Chagas e infecciones por *T. rangeli* o por diferentes especies de *Leishmania* sp. Los autores propusieron la utilización de las glicoproteínas de 70 y 90 kDa como ensayo confirmatorio, en zonas endémicas, donde el diagnóstico específico es difícil (Guhl, 1990), Aunque otro grupo describió que la proteína de 90 kDa es reconocida por sueros de pacientes con Leishmaniosis (Tachibana y cols., 1988). Con el antígeno de 150-160 kDa hubo una sensibilidad del 60% en ELISA y IET (Umezawa y cols., 1993). La glicoproteína de 35 kDa además de ser importante en el diagnóstico, está involucrada en la invasión celular del hospedero y se encuentra en tripomastigotes metacíclicos (Yoshida y cols., 1997). También se han identificado antígenos de peso molecular de 60, 42, 27, 23 y 21 kDa, que han dado falsos positivos en un 18% de los sueros de pacientes probados, por lo tanto, no se les considera útiles en el diagnóstico de la enfermedad (Mendes y cols., 1997). Por otro lado, los polipéptidos de 46 y 58 kDa fueron reconocidos por los sueros de individuos chagásicos en un 97.6 y 100% respectivamente en un estudio realizado en Brasil (Pereira y cols., 2000).

La cruzipaina, (glicoproteína de 40-65 kDa) la principal proteasa de cisteína presente en

T. cruzi es crítica para el desarrollo y sobrevivencia del parásito dentro de las células del hospedero (McGrath y cols., 1995). Hay evidencias de que los epimastigotes y tripomastigotes liberan esta proteasa durante la metacicloogénesis y que ésta a su vez, es reconocida por anticuerpos protectores que circulan durante la infección crónica. Se le considera una molécula que ayudaría a la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* de manera muy específica y a costo relativamente bajo costo (Alberti y cols., 1998). También se ha detectado la presencia de anticuerpos contra la cruzipaina en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Su utilidad como antígeno de diagnóstico parece promisorio debido a que no se ha encontrado reacción cruzada con otros antígenos parasitarios (Martínez y cols., 1991). Recientemente se estudió el antígeno de 150-160 kDa denominado TESA, el cual fue reconocido por el 100% de pacientes chagásicos (Matsumoto y cols., 2002).

Es importante destacar que en la detección de anticuerpos contra *T. cruzi*, la especificidad de cada ensayo que se realiza depende de la calidad de los antígenos utilizados, por lo que se debe considerar su disponibilidad, pureza y especificidad (Almeida y cols., 1990) debido a que se ha informado de una gran variabilidad en los resultados del diagnóstico (Peralta y cols., 1994).

Se considera que el uso de antígenos sudamericanos de *T. cruzi*, para detectar anticuerpos contra el parásito, puede descartar un alto porcentaje de individuos enfermos en nuestro país, por lo que se propone usar cepas mexicanas como antígeno para determinar una mayor coincidencia en los resultados de diagnóstico en México (Carrasco y cols., 2000; Bucio y cols., 1999).

En México, los estudios realizados por Rangel-Flores y colaboradores en 2001, usando sueros humanos provenientes del estado de Morelos, que es zona endémica de la enfermedad de Chagas, mostraron la presencia de anticuerpos hacia tres proteínas antigénicas del parásito de la cepa Ninoa, particularmente a los antígenos de 40, 45 y 70 kDa, aunque también hubo reconocimiento a otros antígenos. En otro estudio, donde se analizaron 22 sueros de pacientes

con enfermedad de Chagas en fase crónica sintomática, se identificaron por IET, siete antígenos inmunodominantes (30, 32, 40, 42, 65, 70 y 83 kDa) de la cepa Querétaro, mismos que fueron reconocidos por más del 50% de los individuos analizados (Sánchez y cols., 2001). Se identificó que las proteínas de 74 y 45 kDa (tabla 1) fueron reconocidas por sueros de individuos mexicanos en fase crónica de la enfermedad en un 100 y 83% respectivamente, no habiendo reconocimiento a estos antígenos por sueros de individuos leishmaniósicos (Sánchez y cols., 1996).

Tabla 1. Proteínas antigénicas reconocidas por enfermos chagásicos crónicos e individuos leishmaniósicos (Sánchez, 1996).

Peso aproximado de la proteína en kDa	% Reconocimiento en enfermos chagásicos crónicos	% Reconocimiento en individuos leishmaniósicos
200	-	19
74	100	-
60	48	56
45	83	-
40	70	12
30	90	6

Monteón-Padilla y colaboradores, en 1997, empleando en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en México extracto total de *Crithidia lucilidae*, que es un parásito tripanosomátido de varios insectos, para detectar anticuerpos específicos de *T. cruzi*. Los autores identificaron que este antígeno podría ser una alternativa en el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas porque el ensayo tuvo una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 83%. En IET la proteína de 30 kDa del extracto de *C. lucilidae*, fue reconocida por sueros chagásicos en un 97%. Por otra parte, utilizando un extracto de *T. cruzi*, del aislado denominado Tequesquitengo, se encontró por IET que las proteínas de 74, 44, 31, 25 y 18 kDa fueron los antígenos más reconocidos por sueros de pacientes chagásicos mexicanos (Bucio y cols., 1999). Sin embargo, a pesar de los estudios realizados, aún no se cuenta con el antígeno

ideal para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y ninguno de los antígenos purificados mencionados anteriormente, han sido evaluados en la población mexicana infectada con *T. cruzi*.

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los aspectos que no han sido clarificados en su totalidad en el estudio de la enfermedad de Chagas en México, es la determinación de antígenos inmunodominantes de *Trypanosoma cruzi*, que permitan definir contra qué antígenos está dirigida la respuesta inmune humoral. Una limitante ha sido la variación en los componentes antigénicos del parásito, que está asociada con la respuesta inmune de cada individuo, generando la activación de las clonas de linfocitos y la producción de anticuerpos con sus respectivas especificidades. En especial, la respuesta inmune de individuos infectados mexicanos ha sido poco estudiada. Por lo tanto, es importante purificar y caracterizar antígenos de cepas mexicanas, que en estudios previos se han identificado como inmunodominantes, que permitan ampliar la información referente a los aspectos biológicos e inmunológicos de este parásito.

4. OBJETIVOS

General:

Identificar antígenos inmunodominantes de *Trypanosoma cruzi*, purificarlos y caracterizarlos.

Particulares:

- Determinar los antígenos inmunodominantes del parásito reconocidos por individuos mexicanos y brasileños.

- Purificar estos antígenos de *Trypanosoma cruzi* por métodos bioquímicos e inmunológicos.

- Caracterizar los antígenos purificados.

- Comparar la respuesta inmune humoral de individuos con enfermedad de Chagas provenientes de México y Brasil hacia los antígenos purificados.

5. METODOLOGIA

5.1. Parásitos

En este proyecto de investigación, se utilizó la cepa mexicana Querétaro (Que) de *T. cruzi* en dos diferentes estadios: epimastigotes y tripomastigotes. Esta cepa se aisló de *Triatoma barberi* colectado en el estado de Querétaro. Actualmente la cepa se mantiene en el modelo murino (ratones BALB/c de 7 semanas) por pases consecutivos cada 18-20 días (Caballero, 1996). También se utilizó como control, extracto proteico total de promastigotes de *Leishmania* sp (cepa Solis), esta última proporcionada por la Dra. Ingeborg Becker del Departamento de Medicina Experimental del Hospital General.

5.2. Cultivos

5.2a. Cultivo de células Vero. Las células Vero se cultivaron en medio D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) pH 7.3, suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) previamente inactivado a 56°C por 30 minutos, vitaminas-MEM (dilución 1:100), aminoácidos no esenciales MEM 0.01 mM, piruvato de sodio 0.1 mM, L-glutamina 0.2 mM y penicilina-estreptomicina a una concentración de 100 µg/ml (Apéndice 1). Las células se crecieron en botellas de cultivo de 75 ml. Se incubaron a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad. Las células Vero se subcultivaron cuando alcanzaron la confluencia, para ello, las células adheridas al sustrato de plástico se desprendieron mediante un lavado con 5ml de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) 5 mM, por 10 minutos. Posteriormente, se retiró la solución y se agregó 1 ml de tripsina a una concentración de 1 mg/ml en solución balanceada de fosfatos (PBS), durante 5 minutos. El despegado de las células fue total al darle a la botella de cultivo varios golpes firmes. El efecto de la tripsina se detuvo con 5 ml de medio D-MEM suplementado con 10% de SFB (López-Olmos 1999; Apéndice 1).

5.2b. Cultivo de epimastigotes. Los epimastigotes se cultivaron en medio Liver Infusion Tryptose (LIT) suplementado con 25 µg/ml de hemina y 10 % de SFB. Estos cultivos se incubaron entre 26-28°C en tubos de 15 ml. A los siete días, los cultivos se transfirieron a

botellas de 25 ml y se les agregó 7 ml de medio fresco, siete días después, se expandió el cultivo a botellas de 75 ml con 20 ml de medio y a la siguiente semana se colocaron en botellas rotadoras donde se les agregó en total 300 ml de LIT fresco. Los cultivos se mantuvieron en rotación constante. Para la preparación del extracto, se separaron los parásitos del medio de cultivo, por medio de centrifugación (1 500 x g, 10 min) y se lavaron dos veces con PBS, manteniéndose todo el proceso a 4°C (López-Olmos 1999; Apéndice 1).

5.2c. Tripomastigotes sanguíneos. Los tripomastigotes sanguíneos de la cepa Querétaro se obtuvieron de ratones CD1 hembras de 18 a 20 días post-infección, los ratones previamente se anestesiaron con éter (Baker) y a partir del plexo axilar derecho se obtuvo la sangre con parásitos. La sangre se colectó en tubos de 5 ml con 100 u/ml de heparina. Inmediatamente los ratones se sacrificaron por dislocación cerebral (López-Olmos, 1999). Estos parásitos se utilizaron para infectar células Vero.

5.2d. Cultivo de tripomastigotes. Se obtuvieron a partir de la infección de células Vero con tripomastigotes sanguíneos. La sangre de ratones infectados con *T. cruzi* se diluyó 1:5 en solución de fosfatos glucosada (PSG) y se realizó la separación de tripomastigotes a través de un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Por cada tubo cónico transparente de 10 ml de capacidad, se agregaron 4 ml de Ficoll-Paque y 3 ml de sangre. Se centrifugó a 400 x g durante 30 minutos a 4°C. Las células mononucleares y parásitos (interfase que se forma entre el ficoll y el plasma) se agregaron a las células Vero cultivadas en botellas de 25 ml y se les añadió medio D-MEM fresco. Se dejaron 48 horas a 37°C (5% de CO₂ y 95% de humedad) como tiempo de infección. Transcurrido el tiempo de infección, se retiraron los parásitos que se encontraban en el sobrenadante y las células infectadas se cultivaron hasta que emergieron los tripomastigotes. Estos parásitos se aislaron por centrifugación a 400 x g durante 10 min a 4°C primero y después, este sobrenadante se centrifugó a 2,000 x g durante 20 min a 4°C (Andrews y Colli, 1982).

Con el objeto de expandir los cultivos infectados, se retiró el sobrenadante y las células se despegaron con EDTA y tripsina, las células se colocaron en 2 cajas nuevas y se les agregó medio fresco. Los parásitos se retiraron cada tercer día y se guardaron a -20°C , para su eventual uso en la preparación de extracto, agregándole a los cultivos medio fresco (Nieto, 1997; López-Olmos, 1999).

5.2e. Cultivo de promastigotes de *Leishmania* sp. Los promastigotes de *Leishmania* se mantuvieron dos días en tubos con medio RPMI pH 7.2 (comunicación personal con el laboratorio de la Dra. Ingeborg Becker). Posteriormente se dividieron y se cultivaron en 4 botellas de 25 ml. Después de 48 h, estos cultivos se transfirieron a tres botellas de 75 ml y se les agregó medio RPMI fresco (Apéndice 1). A las 72 h se obtuvieron los parásitos por centrifugación lavándose con PBS para la obtención del extracto.

5.3. Extractos antigénicos

Los botones de células Vero, de promastigotes de *Leishmania* sp y de tripomastigotes de *T. cruzi*, se obtuvieron como se indicó en la sección anterior y el de epimastigotes se obtuvo centrifugando el cultivo a 1,500 g durante 10 min. a 4°C , en todos los casos se lavaron dos veces con PBS. Se resuspendieron en una solución de Tris-HCl 10 mM pH 8.2 en una relación de aproximadamente 1 g de células por cada 5 ml de solución. Se les agregó inhibidores de proteasas a una concentración final de 5 mM de EDTA (inhibidor de metaloproteasas), 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (inhibidor de proteasas de serina), 100 μM de leupeptina (inhibidor de proteasas de serina/cisteína) y 1 μM de Pepstatina (inhibidor de proteasas de ácido aspártico). La suspensión anterior se sonicó con una intensidad de 60 W 3.5 segundos 5 veces 2 minutos cada vez (Sonicador Sonics y Materials modelo Vibra Cell). Posteriormente el extracto se centrifugó a 10,000 x g por 30 min a 4°C . Finalmente, al sobrenadante, que contenía las proteínas, se separó y se almacenó en alícuotas a -20°C (Rangel-Flores y cols., 2001).

5.4. Cuantificación de Proteínas

La determinación de la concentración de proteínas de los extractos se evaluó por el método de Bradford (1976). Se preparó una curva patrón con una solución estándar de Albúmina Sérica Bovina (ASB) con concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 µg/ml en PBS. En una placa de ELISA de 96 pozos se agregaron 160 µl de las muestras por duplicado y después se agregó 40µl del reactivo de Bradford. La lectura se realizó a 595 nm empleando como blanco PBS. Los extractos se diluyeron 1:100 y 1:250; mientras que los antígenos puros se utilizaron a una dilución 1:10; el resultado se interpoló en la curva patrón y la concentración final de proteínas se obtuvo tomando en cuenta el factor de dilución (Copeland, 1994; Apéndice 9).

5.5. Purificación de IgGs de conejo anti-*T. cruzi*

Los anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra un extracto de epimastigotes de *T. cruzi*, obtenidos en el laboratorio, se purificaron utilizando una columna de agarosa acoplada a proteína A. El acoplamiento consistió en incubar 2 ml de suero de conejo hiperinmune con 2 ml de la resina de proteína A toda la noche a 4°C, se lavó la columna con 200 ml de amortiguador de fosfatos 0.14 M hasta que la densidad óptica a 280 nm fuera menor a 0.05. Los anticuerpos unidos a la proteína A, se eluyeron con glicina 0.1M pH 2.8, se colectaron en tubos eppendorf que contenían 200 µl de Tris-HCl 1 M pH 8 para neutralizar el pH de la glicina. La columna se lavó y se guardó a 4°C en el amortiguador de fosfatos que contenía 0.02% de azida de sodio (Carrasco, 2000; Ternynck y Avrameas, 1990, Apéndice 7). Estos anticuerpos eventualmente se acoplaron a una resina de Affigel-10 para obtener proteínas del parásito reconocidas por los anticuerpos.

5.6. Purificación de antígenos

Para hacer un análisis más detallado de la respuesta inmune humoral de individuos chagásicos en diferentes fases de la enfermedad, se realizó una purificación de antígenos del parásito que anteriormente se habían identificado como inmunodominantes.

5.6a. Purificación de antígenos por electroelución. Se separaron 2 mg de extracto total de *T. cruzi* en un gel preparativo (14 x 12 cm) de poliacrilamida al 10% y/o al 12% en condiciones reductoras. Las proteínas se separaron a 200 volts durante 3-4 h. Al término de la electroforesis, el gel se tiñó con KCl 0.1M durante 30 minutos lo que permitió identificar las proteínas del extracto. Se cortaron las bandas de 40-50 y 70-80 kDa, se dividieron en cuadrillos de 0.3 cm y se colocaron en una equipo de electroelución Little Blue Tank (Isco) que contenía el amortiguador de 12.5 mM de Tris 0.1M, glicina y SDS al 0.1% pH 8, por 4 h a 5 mA por trampa a 4°C. Las proteínas recuperadas se dializaron con 1 L de amortiguador de acetatos pH 5.0 (Copeland, 1994; Nieto, 2001, Apéndice 6).

5.6b. Purificación de antígenos por cromatografía de afinidad.

Acoplamiento de IgGs de conejo a la resina de Affigel-10. Las inmunoglobulinas de conejo anti-*T. cruzi* (54 mg), purificadas como se indicó en la sección 5.5, se dializaron en 1 L de la solución de acoplamiento (Hepes 0.1M pH 8) durante toda la noche a 4°C.

Se agitó el frasco del gel de agarosa Affigel -10 y se obtuvieron 4 ml de la suspensión (correspondiente a 2 g de agarosa). La suspensión se transfirió a un embudo buchner el cual se conectó al vacío, se lavó con 40 ml de agua desionizada a 4°C y con una espátula se transfirió a un tubo de 15 ml (Falcon). La resina se incubó con las IgGs durante 4 h en agitación constante a 4°C. Se centrifugó a 500 x g por 5 minutos y se tomó el sobrenadante, que correspondía a las IgGs no acopladas a la resina. Se bloquearon los sitios no ocupados por las IgGs en la resina con etanolamina 0.1 M pH 8 toda la noche a 4°C. Se lavó la columna con el amortiguador de acoplamiento (Hepes 0.1M pH 8), hasta que la densidad óptica a 280 nm fuera cero. Se despegaron las IgGs unidas débilmente a la columna con 10 volúmenes de glicina 0.1 M pH 2.8. La columna se neutralizó con Hepes 0.1 M y se almacenó en Hepes que contenía azida de sodio al 0.02% a 4°C para su posterior uso en la purificación de antígenos de *T. cruzi*. Se determinó la eficiencia del acoplamiento haciendo la determinación de proteínas antes y después del acoplamiento (Según manual provisto por el distribuidor; Apéndice 8).

Purificación de antígenos. La resina de anticuerpos anti *T. cruzi*-Affigel 10 se utilizó para la purificación de antígenos. Para conocer las condiciones óptimas para despegar los antígenos de esta resina, se realizó un microensayo que consistió en resuspender y tomar 0.5 ml de agarosa affigel 10-IgGs anti-*T. cruzi* y diluirla con 5 ml de Hepes 0.1 M pH 8. Esta suspensión se dividió en 5 tubos eppendorf con 180 μ l de esta resina agregándoles 40 μ l de antígeno total (20 μ g de proteína por tubo). Se dejó incubar a 4° C durante 22 h en agitación continua y se lavó con 500 μ l de Hepes 0.1M pH 8 tres veces cada vez y se centrifugó a 600 x g. Se utilizaron diferentes soluciones para despegar los antígenos de la resina, a uno de los tubos se le agregó 100 μ l de urea 8M, a otro urea 4M, al siguiente, ácido acético 0.1N pH 2.9, a otro hidróxido de amonio 0.5M pH 10.5 y a uno más, glicina 0.1 M pH 8 y se dejaron en agitación 15 minutos, se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante de cada uno de los tubos. Los sobrenadantes de ácido acético, hidróxido de amonio y glicina se neutralizaron con 100 μ l de PBS 10X, 10 μ l de HCl 5N y 100 μ l de PBS 10X respectivamente. Los paquetes de las resinas de cada tubo se neutralizaron con Hepes 0.1 M realizando dos lavados de 500 μ l de hepes 0.1M pH 8. Se les agregó etanolamina 0.1 M durante toda la noche para bloquear nuevamente la agarosa affigel 10-IgGs. Después se guardaron con Hepes 0.1M pH 8 + 0.02% de azida de sodio. Por otro lado, también se hicieron ensayos del tiempo de incubación de la agarosa affigel 10-IgGs anti *T. cruzi* con las soluciones de desprendimiento, se probaron 15 minutos, 30 minutos y 1 hora (Apéndice 8).

Una vez encontradas las condiciones óptimas de purificación de antígenos, se procedió a utilizar 2 g de agarosa affigel 10-IgGs anti *T. cruzi* se incubó con 5.7 mg del extracto de epimastigotes por 24 h a 4°C. Se colectó el sobrenadante que correspondió a las proteínas del antígeno no acopladas, se lavó con 100 ml de Hepes 0.1 M pH 8 y se eluyó el antígeno con 10 ml de urea 4M. Se lavó nuevamente la resina y se guardó en la solución de Hepes más 0.2% de azida de sodio.

Todas las muestras eluidas, se separaron en geles de poliacrilamida al 12% para verificar la presencia de proteínas de *T. cruzi*; también estas mismas muestras se transfirieron a papel de nitrocelulosa y por IET se determinó el reconocimiento antigénico por las inmunoglobulinas del suero hiperinmune de conejo dirigidas contra las proteínas del extracto de epimastigotes.

5.6c. Purificación de cruzipaina por el método de fraccionamiento ácido. La purificación de la cruzipaina se realizó a partir de un extracto de epimastigotes (cepa Y), los cuales se cultivaron durante cuatro semanas, al término de las cuales se centrifugaron a 1500 g para obtener el botón de parásitos y se lavaron dos veces con PBS. Se obtuvo primero el peso húmedo de los parásitos, se resuspendieron en una solución de agua EDTA 2 mM y PMSF 1mM a pH 6. Para 10 g de peso húmedo de parásitos, se ajustó el volumen a 100 ml con la solución anterior. Se sonicó la suspensión de parásitos por 3 ciclos a 80 W y 3.5 seg. a intervalos de 5 minutos (sonicador marca Sonics, Modelo Vibra Cell). El extracto se resuspendió en un volumen final de 300 ml con la solución de agua, EDTA 2 mM y PMSF 1 mM a pH 6 y se centrifugó a 7000 xg por 1 h a 4° C. El sobrenadante obtenido se acidificó a pH 4.24 con HCl diluido, agitando lentamente en baño de hielo durante 30 minutos aproximadamente y se hizo una precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación manteniendo el sobrenadante en baño de hielo con agitación lenta y constante. Se dejó así toda la noche a 4°C y se centrifugó a 12000 g por 1h a 4°C. el botón se resuspendió en 45 ml de PBS, EDTA 2 mM y se dializó con 1 L de amortiguador de acetato de sodio 10 mM, EDTA 2 mM y NaCl 15 mM pH 5 (Nieto, 2001).

Fue necesario hacer un paso adicional de purificación de la cruzipaina debido a que ésta se obtuvo contaminada con otras proteínas. Para hacer esto, se llevó a cabo una electroelución: se corrieron 3 mg/ml de proteína, en un gel preparativo (14 cm X 12 cm) de poliacrilamida al 12 % a 50 V toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 4°C, la técnica se terminó como se describió en la sección 5.6a. La fracción colectada después de la electroelución se corrió en

geles de poliacrilamida al 12 % (con y sin gelatina) para verificar su actividad proteolítica y su pureza por medio de tinción con azul de Coomassie.

5.7. Caracterización de los antígenos purificados

Los antígenos obtenidos por las diferentes metodologías bioquímicas, se sometieron a varias pruebas para confirmar su purificación o su naturaleza química: tinción con azul de Coomassie, para determinar el grado de pureza; actividad proteolítica en SDS/PAGE con gelatina al 2% como sustrato y lectinas biotiniladas para conocer su naturaleza química.

5.7a. Geles de poliacrilamida en condiciones reductoras. El análisis de los antígenos purificados se realizó por medio de geles de acrilamida al 12% en condiciones reductoras (Laemli, 1970). Se colocaron 20 µg del extracto total en uno de los carriles del gel y 10 µl de los antígenos puros. En el caso del antígeno purificado por cromatografía de afinidad, se utilizaron 10 µl de proteína por carril ya que no se logró determinar su concentración. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara Mini Protean II (Bio-Rad), se aplicó una corriente de 200 volts durante 45 minutos a temperatura ambiente. El gel se fijó, se tiñó con azul de Coomassie y se destiñó para la visualización de las proteínas purificadas (Apéndice 2).

5.7b. Actividad proteolítica. La actividad proteolítica de los antígenos se determinó en geles de acrilamida-bisacrilamida copolimerizados con gelatina como sustrato enzimático. La técnica se llevó cabo de la siguiente manera: se preparó un mini-gel de acrilamida-bisacrilamida al 11% con 2% (m/v) de gelatina como sustrato. Las muestras se diluyeron en amortiguador de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 sin mercaptoetanol y se corrieron en el gel a 130 volts a 4°C. Al final de la electroforesis se incubó el gel en solución de tritón 100X al 2.5 % durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Después se incubó a 37°C con glicina 0.1 M pH 8.3 durante 2 horas. El gel se tiñó durante 15-30 minutos, con 0.1% de negro amido, diluido en el desteñidor (30% de metanol, 10 % ácido acético y 60 % de agua), al final se destiñó haciendo dos o tres cambios hasta observar la actividad proteolítica que corresponde a las bandas claras sobre el fondo oscuro del gel (Marshak y cols., 1996. Apéndice 3).

5.7c. Identificación de glicoproteínas por medio de lectinas biotiniladas. Se utilizaron tres diferentes lectinas biotiniladas (Pierce): jacalina que reacciona con galactosa, galactosil y N-acetil-galactosamina; concanavalina A, la cual reacciona con manosa y glucosa mientras que la aglutinina del germen de trigo (Wheat Germ Agglutinin WGA) reacciona con N-acetilglucosamina (Harris y Angal, 1989).

En la IET se utilizaron diferentes concentraciones de lectinas para encontrar la concentración óptima de reacción, por lo que se preparó un mini-gel de poliacrilamida al 12 %, se colocaron 20µg de extracto total de epimastigotes y diferentes concentraciones de inmunoglobulinas de conejo (3, 1.5 y 0.6 µg por carril), estas últimas utilizadas como controles positivos. El gel se sometió a una electroforesis a 200 V y después se realizó la transferencia a papel de nitrocelulosa en una mini-cámara durante 1 h a 100 V. La membrana se bloqueó con PBS-leche al 10% toda la noche a 4° C, se lavó tres veces con PBS-tween al 0.1%, durante 10 minutos cada lavado. Después se agregaron dos diferentes concentraciones de cada lectina biotinilada (1 y 5 µg), se dejó incubar 2 h a temperatura ambiente, se hicieron tres lavados como se mencionó anteriormente. Se agregó el conjugado estreptoavidina-peroxidasa a una dilución 1:2000, se realizaron los lavados respectivos. Se reveló con el sustrato 3'3'-diaminobenzidina a una concentración de 0.5 mg/ml y 13.3 µl de peróxido de hidrógeno al 30%, la reacción se detuvo con agua destilada. Este mismo procedimiento se realizó con los antígenos puros transfiriéndose 1 µg de los antígenos y utilizándose 5 µg de las lectinas biotiniladas.

5.8. Muestras de sueros

Se utilizaron en total 41 sueros de individuos chagásicos, en fase crónica o asintomática de la enfermedad, todos confirmados por serología positiva en ELISA y/o IET. 18 de estos sueros provenían de México y 23 de Brasil. También se utilizaron 18 sueros de individuos mexicanos de un área no endémica, serológicamente negativos y 21 sueros de individuos leishmaniósicos, los cuales se utilizaron para determinar reacciones cruzadas.

5.9. Ensayos serológicos

5.9a Inmunolectrotransferencia (IET). Para evaluar la respuesta inmune humoral de pacientes chagásicos mexicanos y compararla con pacientes de Brasil, se realizó una transferencia a papel de nitrocelulosa de extracto total de *T. cruzi*. Para ello, en minigeles de poliacrilamida al 12%, se separaron 150 µg de extracto de epimastigotes y 100 µg de extracto de tripomastigotes. Al término de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con PBS-leche al 10%, se cortaron tiras de 0.3 cm, se incubaron con sueros de individuos mexicanos y brasileños con enfermedad de Chagas a una dilución 1:500 durante 2 h a temperatura ambiente, posteriormente se agregó el conjugado anti-IgG, IgA, IgM de humano unido a peroxidasa, el cual se diluyó 1:2000 y se dejó incubar por 2 h a temperatura ambiente; cada paso de incubación se alternó con tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS-tween al 0.1%. Finalmente se reveló con el sustrato 3'3 diaminobenzidina a una concentración de 0.5 mg/ml y 13.3 µl de peróxido de hidrógeno al 30%, la reacción se detuvo con agua destilada (Sánchez y cols., 2001; Rangel-Flores y cols., 2001, Apéndice 4).

5.9b. ELISA. Para evaluar la reactividad de los sueros de individuos mexicanos y brasileños con los diferentes antígenos purificados, se realizó un ELISA de acuerdo a la técnica descrita por Sánchez y cols. en 2001. Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 pozos con diferentes concentraciones de antígenos puros (desde 0.5 µg hasta 0.031µg/pozo) durante 2 h a 37° C en atmósfera húmeda, con la finalidad de conocer la mejor reactividad con los sueros humanos. Para los experimentos posteriores de utilizó 125ng de cada antígeno por pozo. Se realizaron tres lavados después de cada incubación de 5 minutos cada uno con PBS-tween al 0.05 %. Después se bloqueó con Albúmina Sérica Bovina (ASB) al 1% durante 1 h a 37 %. Se agregaron los sueros humanos diluidos 1:250 manteniéndose así toda la noche a 4°C. Se incubó con un segundo anticuerpo anti-IgG, IgA, IgM de humano acoplado a peroxidasa diluido 1:2000 por 2 h a 37°C. La reacción se reveló con el sustrato O-fenildiamina en amortiguador de

citrato- fosfato pH 5.0 y se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2.5 N. Se realizó la lectura en un lector de ELISA (Bio-Rad modelo 550) a 490 nm (Apéndice 5).

El punto de corte se obtuvo tomando en cuenta el promedio (\bar{X}) de los valores de densidad óptica (DO), proveniente de al menos cuatro sueros controles negativos de cada placa, y sumándole 2.5 desviaciones estándar (DS), según descrito previamente (Sánchez y cols., 2001). El índice de positividad se determinó dividiendo el valor de la densidad óptica de cada suero entre el punto de corte de los controles negativos en cada una de las placas de ELISA.

6. RESULTADOS

6.1. Cultivos

Los cultivos para la obtención de las diferentes formas de *T. cruzi*, permitieron producir suficientes cantidades de parásitos para realizar los distintos ensayos de este estudio. De los epimastigotes cultivados por tres semanas, se obtuvieron aproximadamente 1 g de parásitos (peso húmedo) por cada 300 ml de medio LIT, obteniéndose una concentración de proteína total de 45-65 mg por gramo de parásitos.

Para hacer un extracto total de tripomastigotes y comparar las proteínas antigénicas de este estadio del parásito con las de extracto de epimastigotes de *T. cruzi*, se infectó un cultivo de células Vero al 50% de confluencia con 2.5×10^6 parásitos obtenidos de ratones infectados y purificados con Ficoll. A las 48 h, se retiró el sobrenadante y se agregó medio fresco. En la tabla 2 se muestra el número de tripomastigotes libres en el medio de cultivo a los diferentes días post-infección de dos experimentos independientes. En ambos experimentos se observó un comportamiento diferente, ya que en el primero la mayor cantidad de parásitos se obtuvo el día 21 post-infección donde se colectaron 65×10^6 tripomastigotes totales y en los días siguientes fue disminuyendo la producción de tripomastigotes. En cambio, en el segundo experimento, se retrasó la liberación de parásitos al sobrenadante del cultivo, posiblemente debido a que las células se infectaron con menor número de tripomastigotes sanguíneos. En este experimento, se registraron parásitos hasta el día 7 y 14 post infección, a partir del día 18 fue aumentando el número de parásitos en el medio de cultivo. Se realizaron dos experimentos adicionales pero estos no fueron exitosos. Con los experimentos exitosos, se logró obtener parásitos para hacer el extracto de tripomastigotes cuya concentración total de proteínas fue de 957 $\mu\text{g/ml}$, suficiente para realizar los ensayos requeridos en el presente estudio.

Tabla 2. Producción de tripomastigotes de *T. cruzi* en cultivo de células Vero a diferentes días de infección.

Días post-infección/núm. de cajas	No. tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	
	Experimento 1	Experimento 2
0/1 caja de 25 cm ²	2.5X10 ⁶	1.5X10 ⁶
2/1 caja de 25 cm ²	0.15X10 ⁶	0
4/1 caja de 25 cm ²	0.2X10 ⁶	0
7/2 cajas de 75 cm ²	1.3X10 ⁶	0.2X10 ⁶
9/2 cajas de 75 cm ²	1.3X10 ⁶	0
11/2 cajas de 75 cm ²	7.5X10 ⁵	0
14/4 cajas de 75 cm ²	9.0X10 ⁶	0.2X10 ⁶
16/4 cajas de 75 cm ²	ND	0.4X10 ⁶
18/4 cajas de 75 cm ²	18X10 ⁶	1.1X10 ⁶
21/8 cajas de 75 cm ²	65X10 ⁶	2X10 ⁶
23/8 cajas de 75 cm ²	45X10 ⁶	9X10 ⁶
25/8 cajas de 75 cm ²	ND	10X10 ⁶
28/16 cajas de 75 cm ²	ND	27X10 ⁶

ND=No determinado

6.2. Evaluación de los extractos antigénicos

Para conocer la composición proteica de los extractos antigénicos, se sometieron 10 µg del extracto de *Leishmania* sp, del extracto de tripomastigotes y de extracto de epimastigotes de *T. cruzi* se separaron electroforéticamente en un gel de poliacrilamida al 12 % en presencia de SDS. Como control, por la posible contaminación de células Vero, en el extracto de tripomastigotes, también se analizó el extracto de estas células. Los geles se tiñeron con azul de Comassie y en la figura 3 se muestra el patrón de proteínas de cada uno de los extractos. Puede observarse el extracto de células Vero (A) que se caracteriza por presentar una relativa homogeneidad en cuanto a la concentración de proteínas que lo constituyen y que se sitúan en el intervalo de 185 kDa hasta menos de 15 kDa, el extracto de *Leishmania* sp. (B) muestra aproximadamente 28 componentes proteicos de diferentes pesos moleculares, las proteínas más evidentes son las que se localizan en el área de 61 y 45 kDa; en el extracto de tripomastigotes (C) se observó que la distribución de las proteínas se encuentra desde los 85 kDa y hasta los 15 kDa, siendo más evidente la de 61 kDa, y en menor concentración las de 40-50 kDa y de 38 kDa. Por otro lado, se determinaron diferencias entre la cantidad y abundancia de las proteínas solubilizadas de tripomastigotes con el extracto de epimastigotes (D), donde se observó una proteína muy abundante en el área de 45 kDa seguida de una mayor de 60 kDa. Estos resultados permitieron determinar que las proteínas que se encuentran en el rango de 70-80 y 40-50 kDa del extracto de epimastigotes también se podrían encontrar en los extractos de tripomastigotes, aunque en menor abundancia. En un trabajo previo en nuestro laboratorio, estos antígenos se habían identificado como inmunodominantes (Sánchez, 1996 y Sánchez y cols., 2001).

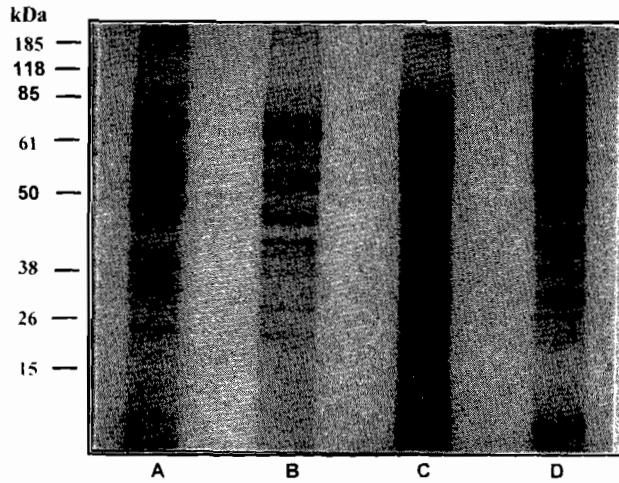


Figura 3. Análisis de proteínas constitutivas de extractos de *T. cruzi* y *Leishmania* sp. en SDS-PAGE. Extractos proteicos (10 μ g) se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% con SDS y mercaptoetanol, se tiñeron con azul de Coomasie. A) Células Vero, B) Promastigotes de *Leishmania* sp. C) Tripomastigotes de *T. cruzi* y D) Epimastigotes de *T. cruzi*.

6.3. Análisis de proteínas de epimastigotes purificados por electroelución

Las proteínas de 70-80 y 40-50 kDa, se purificaron a partir de 2 mg de extracto de epimastigotes, por electroelución en un gel de poliacrilamida al 12% y se tiñó posteriormente con azul de Coomassie.

En la figura 4, se muestra un primer experimento de electroelución, donde se observa que se purificaron 4 proteínas de diferentes pesos moleculares: 48 kDa (A), 50 kDa (B), 77 kDa (C) y 80 kDa (D). Se repitieron varias veces los procesos de purificación y en la figura 5, se observan 8 diferentes productos de las purificaciones provenientes de dos proteínas que se localizaban en el intervalo de 40-50 kDa y que permitieron con base en su peso molecular y su pureza, determinar cuales de estos se podían mezclar para usarse en los diferentes ensayos. Este mismo procedimiento se realizó con las dos proteínas de que se disponía entre la masa molecular de 70-80 kDa y que se observan en la figura 6 donde se muestran 6 productos de las diferentes purificaciones, en los carriles 1, 2, 3 y 4, se determinaron proteínas del mismo peso molecular y en los carriles 5 y 6 proteínas de aproximadamente 85 kDa.

Además, otro criterio para mezclar las proteínas de las diferentes purificaciones, consistió en transferirlas a papel de nitrocelulosa y que al exponerse a un suero humano de un paciente sintomático en fase crónica polireactivo a antígenos de *T. cruzi* (M93), éste reaccionara positivamente con el suero. En el caso de las proteínas de 40-50 kDa (Figura 7), el reconocimiento por el suero fue homogéneo lo que sugirió que en las diferentes purificaciones se obtuvo el mismo antígeno, por lo cual se procedió a hacer una mezcla de estas purificaciones para su posterior uso en ELISA. Se realizó el mismo tipo de experimento para los antígenos de pesos entre 70 y 80 kDa. En la figura 8 se observó por IET que en los carriles 1 y 2, las proteínas que se hallan en el área de 70-80 kDa reaccionaron con el suero humano, más no así en los carriles que corresponden a las purificaciones de los carriles 3 y 4 que por tinción con azul de Coomassie parecían ser iguales a los carriles 1 y 2 de la misma figura. Para los

ensayos de ELISA se empleó una mezcla de las purificaciones correspondientes a los carriles 1 y 2.

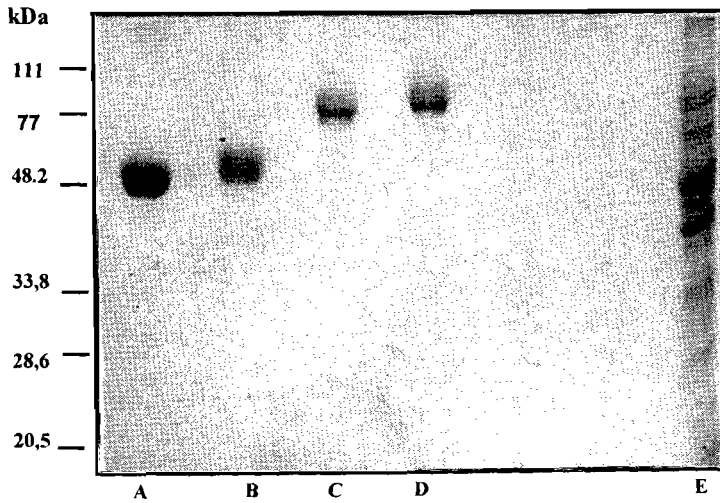


Figura 4. Análisis de las proteínas purificadas por electroelución. Las proteínas purificadas por electroelución se analizaron por medio de geles de poliacrilamida al 12% con SDS en condiciones reductoras y teñidos con azul de Coomassie. A) 48 kDa, B) 50 kDa, C) 77 kDa, D) 80 kDa E) Extracto proteico de epimastigotes.

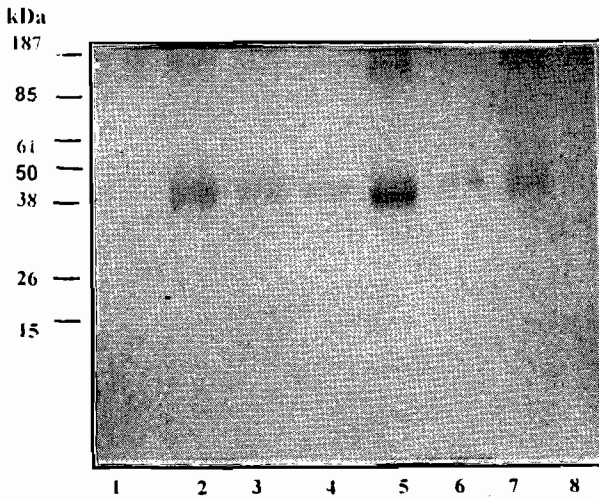


Figura 5. Análisis de la proteína de 40-50 kDa purificada por electroelución. Las diferentes purificaciones de la proteína de 40-50 kDa se analizaron por medio de un gel de poliacrilamida al 12% con SDS en condiciones reductoras y teñidos con azul de Coomassie. 1-8 diferentes electroeluciones de la proteína de 40-50 kDa de epimastigotes.

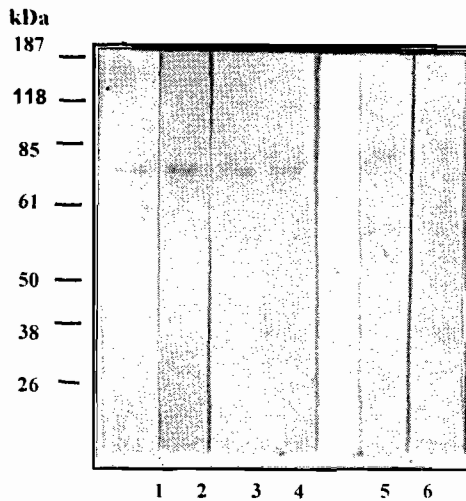


Figura 6. Análisis de la proteína de 70-80 kDa purificado por electroelución. Las diferentes purificaciones de la proteína de 70-80 kDa se analizaron por medio de un gel de poliacrilamida al 12% con SDS en condiciones reductoras y teñidos con azul de Comassie. 1-6 diferentes electroeluciones de la proteína de 70-80 kDa.

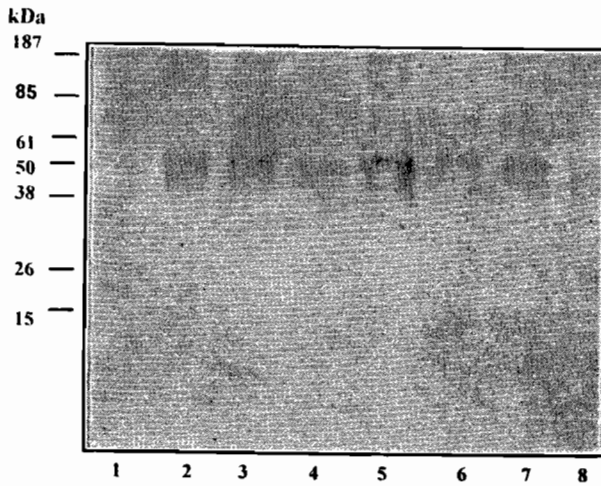


Figura 7. Reconocimiento de la proteína de 40-50 kDa de *T. cruzi* por el suero de un paciente chagásico en fase crónica. Después de una electroforesis en condiciones reductoras, las proteínas de 40-50 kDa obtenidas de las diferentes electroeluciones (carriles 1-8) se sometieron a IET donde se utilizó un suero de un individuo en fase crónica de la enfermedad.

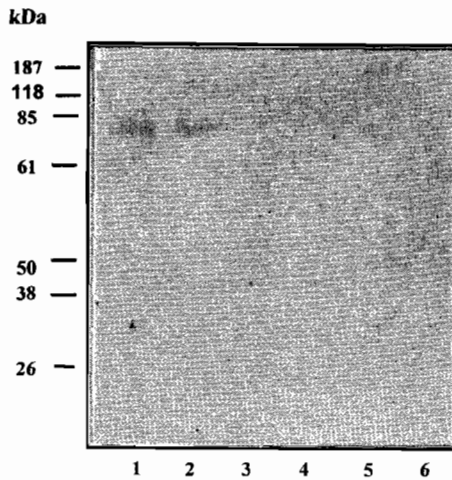


Figura 8. Reconocimiento de la proteína de 70-80 kDa de *T. cruzi* por el suero de un paciente chagásico en fase crónica. Después de una electroforesis en condiciones reductoras, las proteínas de 70-80 kDa obtenidas de diferentes purificaciones (carriles 1-6), se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se observó su reactividad con un suero de un individuo chagásico.

6.4. Purificación de IgGs de conejo dirigidas contra *T. cruzi*

Las inmunoglobulinas de conejo hiperinmune anti-*T. cruzi* fueron purificadas con la idea de acoplarlas a una resina de Affigel-10, misma que se utilizaría para purificar antígenos del parásito.

La curva de purificación de IgGs de conejo hiperinmune por cromatografía de afinidad con proteína A se muestra en la figura 9. Estas inmunoglobulinas se eluyeron con glicina a pH ácido. Se recuperó en promedio una concentración total de 25 mg de IgGs por cada 6 ml de suero de conejo hiperinmune. En las tres purificaciones que se realizaron, se obtuvo una curva similar a la que se muestra en la figura 9, donde se observa que la mayor cantidad de proteína se obtiene en la fracción 4.

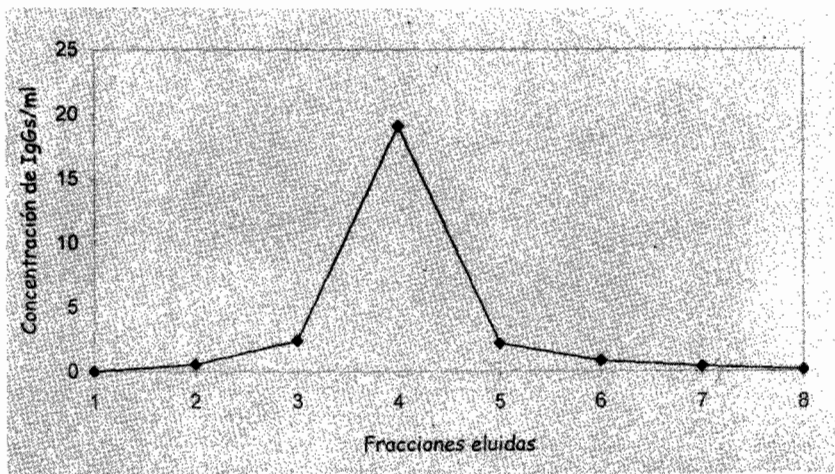


Figura 9. Purificación de IgGs de conejo anti-*T. cruzi* por columna de proteína A. El suero de conejo hiperinmune (6 ml) se aplicó a la columna de proteína A. Las IgGs se eluyeron con glicina 0.2 M pH 8. El pico corresponde a la fracción 4 donde se obtuvo la mayor concentración de inmunoglobulinas.

6.5. Purificación de antígenos por columna de afinidad

Después de incubar las inmunoglobulinas con la resina de Affigel-10 siguiendo las indicaciones de los fabricantes, se calculó la eficiencia del acoplamiento por la diferencia en la concentración de proteína inicial y la concentración final de inmunoglobulinas, siendo la eficiencia de acoplamiento de 86.6%.

Con la resina de Affigel 10-IgGs anti *T. cruzi*, se tomó una alícuota de la resina y se realizaron 5 microensayos para encontrar las condiciones óptimas de purificación de las proteínas del extracto de epimastigotes de *T. cruzi*. Después de incubar con el extracto y lavar con Hepes 0.1M a pH 8, se eluyeron las proteínas con diferentes soluciones. En la figura 10, se observa un gel de poliacrilamida al 12 % donde se colocaron las muestras del antígeno que no se pegó a la resina (carriles 1-5) y las fracciones despegadas con las diferentes soluciones (carriles 6-10). Con la tinción de azul de Coomassie no se observó ningún antígeno eluido. También se realizó la transferencia a papel de nitrocelulosa de las muestras y por IET, utilizando las IgGs de conejo dirigidas contra *T. cruzi*, hubo reconocimiento de un antígeno cuyo peso molecular fue mayor a 100 kDa (Figura 11). Este antígeno se eluyó con urea 8 M (carril 6), urea 4 M (carril 7) e hidróxido de amonio 0.5 M (carril 9). Cabe mencionar que se realizaron varios experimentos donde se dejó incubar con las soluciones de elución 15, 30 min y 1 h. Los resultados indicaron que no hubo diferencias si se incubaban a diferentes tiempos, por lo que el tiempo utilizado en los experimentos subsecuentes fue de 30 min. Debido a que en ninguno de los diferentes experimentos de purificación se logró determinar la concentración de antígeno, y sólo se pudo observar indirectamente por IET, se decidió no incluirlo en el análisis de la respuesta inmune y evaluar su actividad proteolítica.

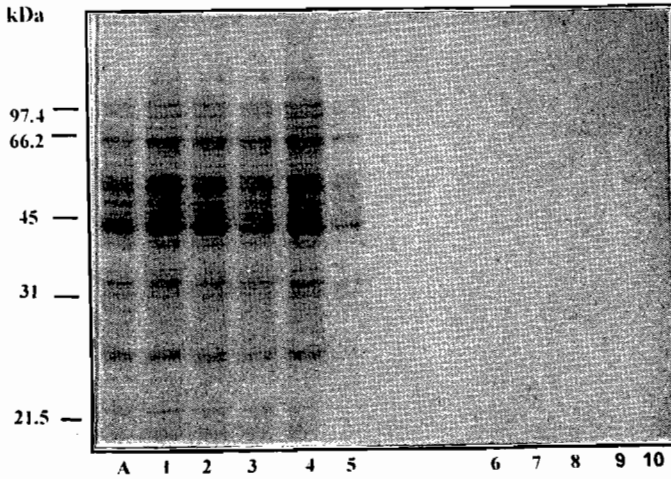


Figura 10. Purificación de antígenos de *T. cruzi* por cromatografía de afinidad. Se realizó un gel de poliacrilamida al 12 % donde se muestran las proteínas del extracto total de epimastigotes que no se pegaron a las resinas (1-5). Fracciones solubilizadas con: 6) urea 8 M pH 7.7, 7) urea 4M pH 7.7, 8) ácido acético 0.1N pH 2.9, 9) hidróxido de amonio 0.5 M pH 10.5 y 10) glicina 0.1 M pH 2.8 por 30 min. A) extracto proteico de epimastigotes.

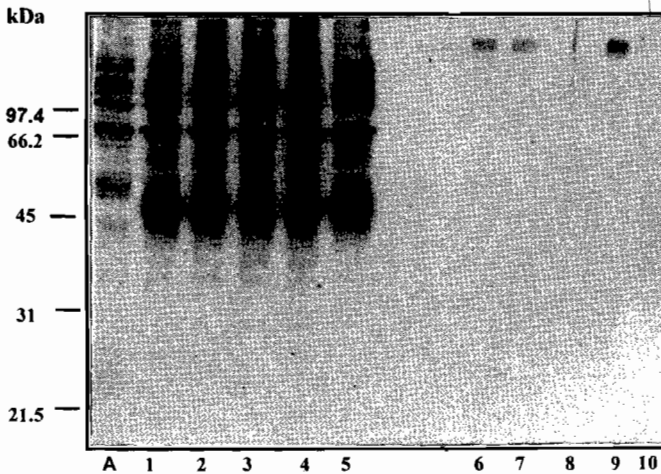


Figura 11. Purificación de antígenos de *T. cruzi* por columna de afinidad evaluados en ensayos de IET. Se realizó un gel de poliacrilamida al 12 % donde se corrieron las proteínas del extracto total de epimastigotes que no se pegaron a la resina (1-5). Fracciones eluidas con: 6) urea 8 M pH 7.7, 7) urea 4M pH 7.7, 8) ácido acético 0.1N pH 2.9, 9) hidróxido de amonio 0.5 M pH 10.5 y 10) glicina pH 2.8. Estas muestras se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se incubó con 20 µg de IgGs de conejo anti-*T. cruzi* después con el conjugado anti-IgGs de conejo. A) extracto total.

6.6. Purificación de cruzipaína

La cruzipaína es una molécula altamente inmunogénica y blanco de la respuesta inmune del hospedero, motivo por el cual ha sido empleada en diversos experimentos de diagnóstico de la enfermedad. En este trabajo, la purificación de esta proteasa por fraccionamiento ácido se realizó a partir de extracto de epimastigotes de la cepa Y. En la figura 12, se observa un gel teñido con azul de Coomassie donde se ve la pureza de la cruzipaína después de haberla purificado por electroelución, la cual tiene un peso molecular de 40-45 kDa (B), el extracto de epimastigotes del que fue purificada (A) y la cruzipaína obtenida por fraccionamiento ácido donde se observaron algunas proteínas contaminantes (C).

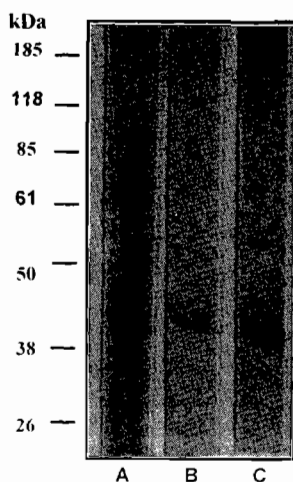


Figura 12. Purificación de cruzipaína. A partir de en extracto total de epimastigotes de la cepa Y (A) la cruzipaína se purificó por electroelución (B) o por fraccionamiento ácido (C). Para analizar la pureza de las proteínas purificadas, estas se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras y se tiñó con azul de Coomassie.

6.7. Caracterización de antígenos

6.7a. Actividad proteolítica. Los antígenos purificados por electroelución (1.5 µg), se sometieron a un gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina para conocer si presentaban actividad proteolítica. En la figura 13, se observa que ninguno de los antígenos purificados degradan la gelatina y por lo tanto no son proteasas (carriles B, D Y F), en cambio el antígeno purificado por cromatografía de afinidad, que presentaba un peso molecular superior a 100 kDa, presentó actividad proteolítica en el área de 45 kDa (carril E), peso similar al de la cruzipaina (C) y al carril A que corresponde al extracto total de epimastigotes de *T. cruzi*.

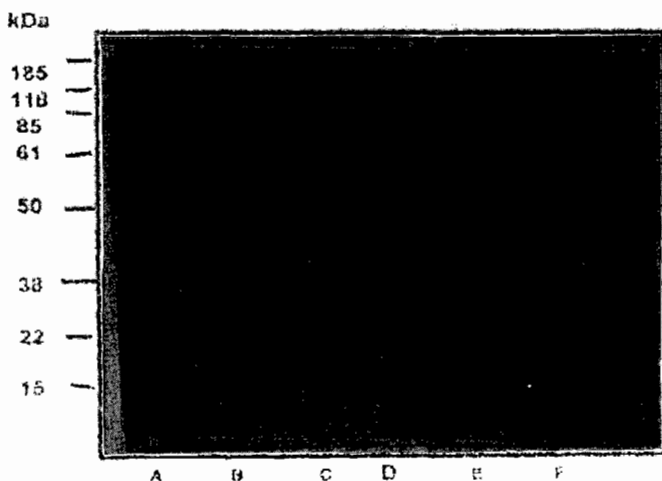


Figura 13. Actividad proteolítica de los antígenos purificados por electroelución. Se determinó la existencia de actividad enzimática en los antígenos purificados en un gel de poliacrilamida con 2% de gelatina como sustrato. A) extracto total de epimastigotes, B) antígeno de 40-50 kDa, C) cruzipaina, D) antígeno de 70 kDa, E) antígeno purificado por cromatografía de afinidad y F) antígeno de 80 kDa.

6.7b. Caracterización de antígenos por medio de lectinas biotiniladas. Para conocer la naturaleza glicosídica de los antígenos purificados se utilizaron lectinas con afinidad por varios azúcares. Para conocer la concentración óptima de las tres diferentes lectinas biotiniladas, así como la concentración mínima de proteína con que reaccionaban, se realizó una transferencia de diferentes concentraciones de glicoproteínas como las inmunoglobulinas de conejo y el extracto de *T. cruzi*. Las membranas con las glicoproteínas transferidas se bloquearon y posteriormente se incubaron con 1 y 5 µg de lectinas. En la figura 14, se muestra la reactividad de la jacalina biotinilada, se observó que 5 µg de jacalina, reaccionaron con la cadena pesada de las inmunoglobulinas de conejo que presenta un peso molecular de 50 kDa, desde 3 µg y hasta 0.62 µg de inmunoglobulinas. Con la cadena ligera de 25 kDa solo cuando se utilizaron 3 µg de IgGs. Esta misma reactividad no se observó cuando se utilizó 1 µg de jacalina. Con 5 µg de jacalina se observó una mayor señal con diferentes proteínas del extracto de epimastigotes comparado con el experimento donde se usó 1 µg (figura 14). En la figura 15, se observa la unión de 5 µg de concanavalina A con la cadena de 50 kDa de los anticuerpos y con el extracto de epimastigotes de *T. cruzi* se observó claramente un fuerte reconocimiento con las tres concentraciones de inmunoglobulinas y diferentes proteínas del extracto de *T. cruzi*, en cambio, con 1 µg de concanavalina A, este reconocimiento disminuye considerablemente con las tres diferentes concentraciones de IgGs e incluso se observan sólo 4-5 proteínas del extracto parasitario. También se observó que 5 y 1 µg de la aglutinina del germen de trigo (WGA) (figura 16) reaccionaron con la cadena de 50 kDa hasta la concentración mínima probada de 0.62 µg de IgGs, y con menor intensidad cuando se utilizó 1 µg de lectina. Estos experimentos permitieron determinar que 5 µg/ml de cada lectina reconocen mejor glicoproteínas IgGs de conejo y del extracto total de *T. cruzi*, por lo que se decidió hacer la determinación de la naturaleza glucosídica de los antígenos purificados utilizando estas condiciones. En la figura 17, se muestra la reactividad de la concanavalina A con 1µg de cruzipaína purificada por fraccionamiento ácido (D), antígeno de 70-80 kDa (C) y antígeno de

40-50 kDa (B). En la tabla 3, se resume la reactividad de los antígenos con las tres lectinas usadas. Se observó que la cruzipaina semipurificada por fraccionamiento ácido, reacciona con las tres lectinas, los antígenos de 40-50 y 70-80 kDa dieron reacción positiva a Concanavalina A y Jacalina.

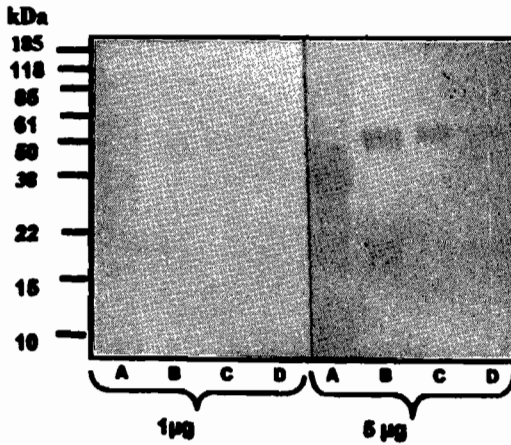


Figura 14. Unión de la jacalina biotinilada a IgGs de conejo y a extracto total de *T. cruzi*. Por IET se observó la reactividad de la jacalina biotinilada (1 y 5 µg). A) 20 µg de extracto de epimastigotes; B) 3 µg IgGs, C) 1.5 µg IgGs y D) 0.62 µg IgGs de conejo.

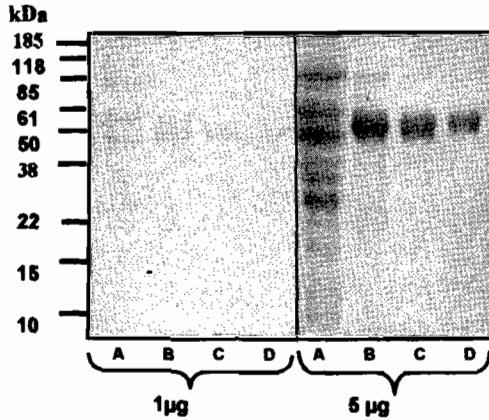


Figura 15. Reconocimiento de Concanavalina A biotinilada a IgGs de conejo y a extracto de *T. cruzi*. Por IET se observó la reactividad de la Concanavalina A biotinilada (1 y 5 µg). A) 20 µg de extracto de epimastigotes; B) 3 µg de IgGs C) 1.5 µg de IgGs y D) 0.62 µg de IgGs de conejo.

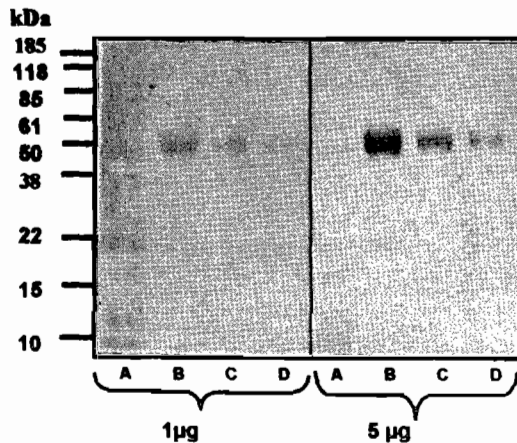


Figura 16. Reconocimiento de WGA biotinilada a IgGs de conejo y a extracto de *T. cruzi*. Por IET se observó la reactividad de WGA biotinilada (1 y 5 µg). A) 20 µg de extracto total de epimastigotes de *T. cruzi*, B) 3 µg de IgGs. C) 1.5 µg de IgGs y D) 0.62 µg de IgGs de conejo.

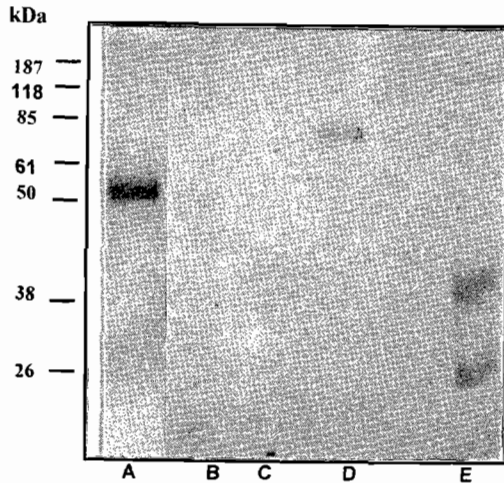


Figura 17. Reconocimiento de Concanavalina A a los antígenos purificados. Por IET, se observa la reactividad de 5µg/ml de lectina Concanavalina A con 1µg de los antígenos purificados. A) IgGs como control positivo; B) antígeno de 40-50 kDa; C) antígeno de 70-80 kDa y D) cruzipaina semipura.

Tabla 3. Reactividad de los antígenos puros con lectinas

Lectina	Concanavalina A	Jacalina	(WGA)
Azúcar al que se une	glucosa/manosa	Galactosa	N-acetilglucosamina
Cruzipaina	+	+	+
40-50 kDa	+	+	-
70-80 kDa	+	+	-

6.8. Respuesta inmune humoral de individuos chagásicos contra un extracto total de epimastigotes de *T. cruzi*

Para evaluar la respuesta inmune de individuos chagásicos brasileños y mexicanos contra extracto total de *T. cruzi*, se realizó una IET. El extracto total de *T. cruzi*, después de una electroforesis en condiciones reductoras, se transfirió a papel de nitrocelulosa, se analizó la respuesta inmune humoral en individuos brasileños y mexicanos en fase crónica sintomática y asintomática de la enfermedad (Figura 18). Se encontró que la respuesta inmune contra el extracto total en individuos brasileños, en fase crónica sintomática y asintomática, fue muy intensa reconociendo una gran cantidad de antígenos cuyos intervalos de pesos moleculares fueron de 26 a 187 kDa aproximadamente (Figura 18, carriles 1-10). Es importante mencionar que, dentro del grupo de individuos chagásicos mexicanos sintomáticos, mostraron una respuesta contra varias proteínas del parásito (Figura 18; carriles 11, 12 y 14). Por otro lado, los sueros de individuos mexicanos en fase crónica asintomática de la enfermedad, mostraron una pobre reactividad hacia el extracto, reconociendo mayoritariamente al antígeno de un peso molecular mayor a 61 kDa. (Figura 18, carriles 13, 15, 16, 17, 19 y 20).

Al mismo tiempo, se realizó un ELISA con extracto total del parásito. En la figura 19 se muestra el índice de positividad de los sueros de individuos mexicanos en las dos fases de la enfermedad: sintomáticos (triángulos negros) y asintomáticos (triángulos blancos), donde se observaron niveles de anticuerpos más elevados en los individuos infectados con cardiopatía chagásica crónica (sintomáticos) que en los individuos asintomáticos.

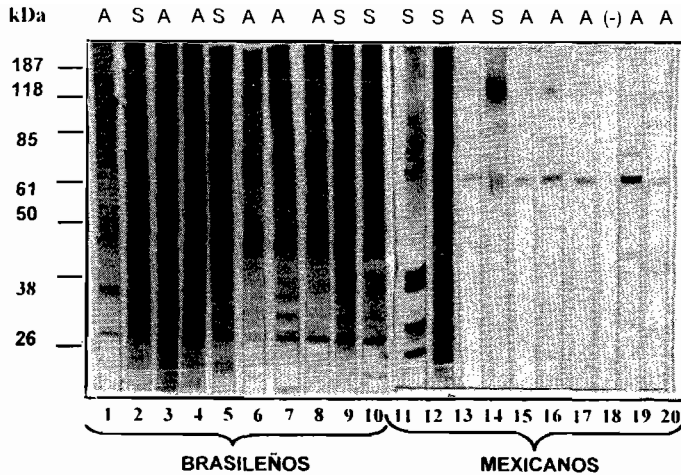


Figura 18. Reconocimiento del extracto total de *T. cruzi* por sueros de individuos chagásicos crónicos sintomáticos (S) y asintomáticos (A) mexicanos y brasileños. Después de una electroforesis en condiciones reductoras, el extracto se transfirió a papel de nitrocelulosa. Para el análisis de la respuesta inmune humoral, se usó la IET, donde los sueros se diluyeron 1:500, se utilizó el conjugado anti-IgG+IgA+IgM (H+L) humano diluido 1:2000 y se reveló con el sustrato 3'3' diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno (-) control negativo.

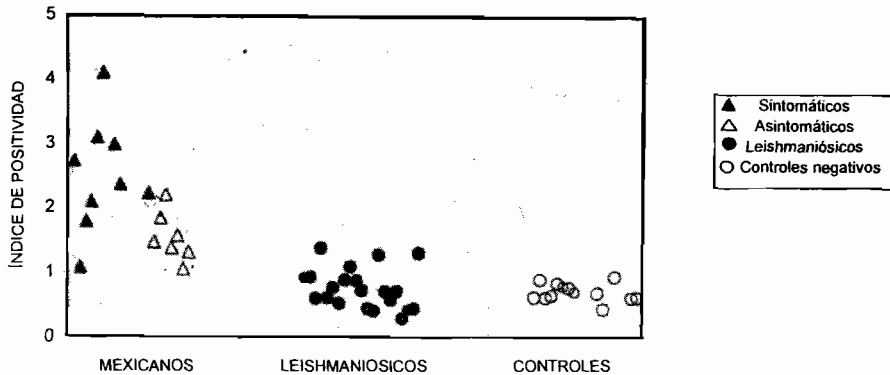


Figura 19. Reconocimiento del extracto total de *T. cruzi* por sueros de individuos chagásicos crónicos sintomáticos y asintomáticos mexicanos. Por ELISA, se determinó el índice de positividad de los sueros de individuos mexicanos con extracto total de epimastigotes donde los sueros se diluyeron 1:500, se utilizó el conjugado anti-IgG+IgA+IgM (H+L) humano diluido 1:2000 y se reveló con el sustrato 3'3' diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno.

6.9. Detección de anticuerpos anti-Ag 40-50, Ag 70-80 kDa y cruzipaina en individuos con enfermedad de Chagas

En la figura 20, se muestra el reconocimiento que en ELISA mostraron los sueros de individuos chagásicos hacia el antígeno de 40-50 kDa. Se observó que 9 de 10 sueros de individuos brasileños en fase sintomática de la enfermedad (rombos negros) tuvieron un índice de positividad superior al que presentaron los mexicanos en la misma fase (triángulos negros). También se observó que cinco sueros de individuos leishmaniósicos (círculos negros) dieron resultados superiores a uno indicando reactividad con este antígeno si se comparan con los controles negativos (círculos blancos).

En la figura 21, se muestra el reconocimiento por ELISA de los sueros de individuos chagásicos hacia el antígeno de 70-80 kDa. La mayoría de los sueros de individuos brasileños en fase crónica sintomática (rombos negros) y asintomática (rombos blancos) tuvieron un índice de positividad superior al que presentaron los mexicanos en las mismas fases de la enfermedad (triángulos negros y blancos). También se encontraron siete sueros de individuos leishmaniósicos (círculos negros) que reaccionaron con este antígeno si se comparan con los controles negativos (círculos blancos).

En la figura 22, se muestra el reconocimiento por ELISA de los sueros de individuos chagásicos hacia el antígeno cruzipaina. La mayoría de los sueros de individuos brasileños en la fase crónica sintomática y asintomática de la enfermedad (rombos negros y blancos respectivamente) tuvieron un índice de positividad superior al que presentaron los mexicanos en las mismas fases de la enfermedad. Los individuos asintomáticos (triángulos blancos) presentaron un índice similar a los controles negativos y solamente tres sueros de individuos sintomáticos (triángulos negros) presentaron un índice superior a los controles negativos (círculos blancos). También se determinó que algunos sueros de individuos leishmaniósicos (círculos negros) dieron resultados superiores a uno indicando reactividad con este antígeno si se comparan con los controles negativos (círculos blancos).

En la figura 23, se muestra la reactividad de los sueros de individuos chagásicos hacia la mezcla de los antígenos puros (40-50, 70-80 kDa y cruzipaína) a una concentración de 0.125 µg por pozo, la concentración fue de 0.045 µg por cada antígeno. Se observó que la mayoría de los sueros de individuos brasileños tanto sintomáticos como asintomáticos (rombos negros y blancos respectivamente) tuvieron un índice de positividad superior al que presentaron los mexicanos (triángulos negros y blancos). Algunos sueros de individuos leishmaniósicos (círculos negros) dieron resultados superiores a uno indicando reactividad con este antígeno si se comparan con los controles negativos (círculos blancos).

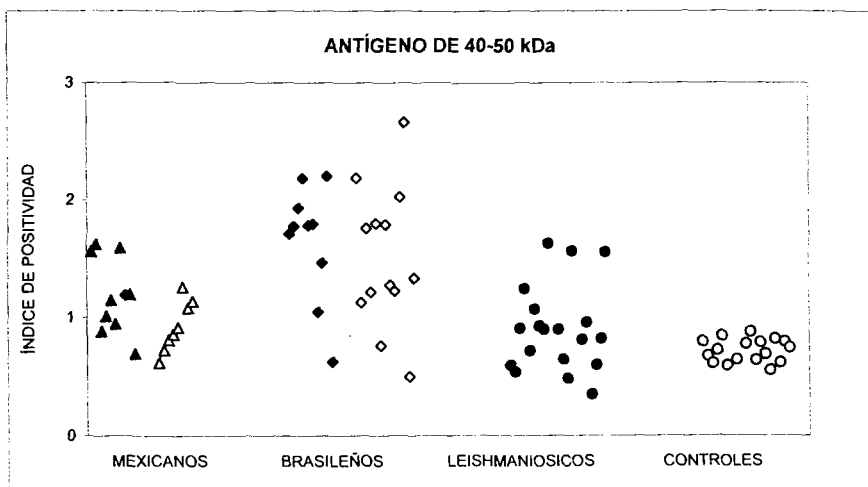


Figura 20. Reconocimiento del antígeno de 40-50 kDa por los sueros de individuos chagásicos mexicanos y brasileños. Por ELISA, se determinó el índice de positividad de los sueros de individuos mexicanos y brasileños. Se utilizó 0.125 µg del antígeno de 40-50kDa, los sueros se diluyeron 1:500, se utilizó el conjugado anti-IgG+IgA+IgM (H+L) humano diluido 1:2000 y se reveló con el sustrato 3'3'diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno. Rombos o triángulos negros: individuos crónicos sintomáticos; rombos o triángulos blancos: individuos crónicos asintomáticos.

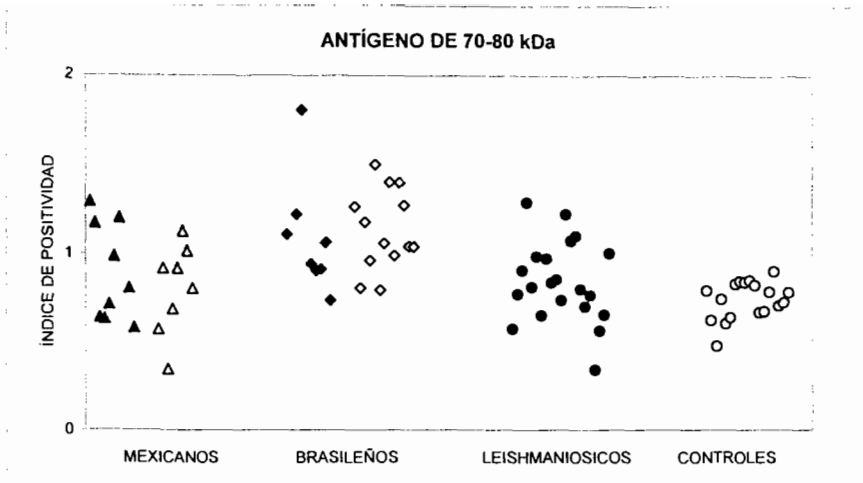


Figura 21. Reconocimiento del antígeno de 70-80 kDa por los sueros de individuos chagásicos mexicanos y brasileños. Por ELISA, se determinó el índice de positividad de los sueros de individuos mexicanos y brasileños. Se utilizó 0.125µg del antígeno de 40-50kDa, los sueros se diluyeron 1:500, se utilizó el conjugado anti-IgG+IgA+IgM (H+L) humano diluido 1:2000 y se reveló con el sustrato 3'3'diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno. Rombos o triángulos negros: individuos crónicos sintomáticos; rombos o triángulos blancos: individuos crónicos asintomáticos.

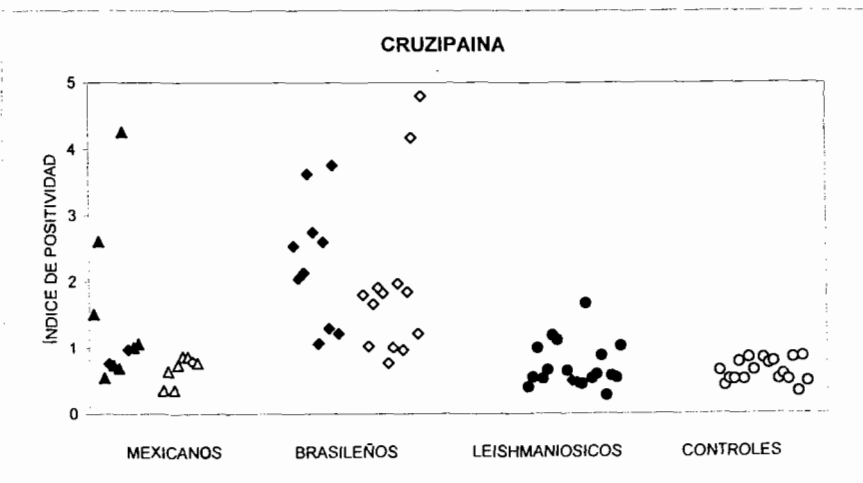


Figura 22. Reconocimiento del antígeno cruzipaina por los sueros de individuos chagásicos mexicanos y brasileños. Por ELISA, se determinó el índice de positividad de los sueros de individuos mexicanos y brasileños. Se utilizó 0.125µg del antígeno cruzipaina, los sueros se diluyeron 1:500, se utilizó el conjugado anti-IgG+IgA+IgM (H+L) humano diluido 1:2000 y se reveló con el sustrato 3'3'diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno. Rombos o triángulos negros: individuos crónicos sintomáticos; rombos o triángulos blancos: individuos crónicos asintomáticos.

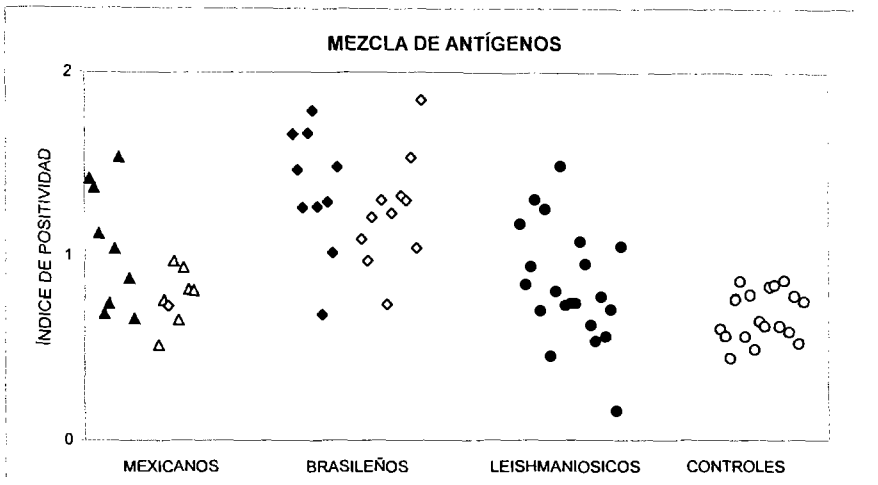


Figura 23. Reconocimiento de la mezcla de antígenos (40-50, 70-80 kDa y cruzipaina) por los sueros de individuos chagásicos mexicanos y brasileños. Por ELISA, se determinó el índice de positividad de los sueros de individuos mexicanos y brasileños. Se utilizó 0.125µg del antígeno de la mezcla de antígenos, los sueros se diluyeron 1:500, se utilizó el conjugado anti-IgG+IgA+IgM (H+L) de humano diluido 1:2000 y se reveló con el sustrato 3'3' diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno. Rombos o triángulos negros: individuos crónicos sintomáticos; rombos o triángulos blancos: individuos crónicos asintomáticos.

En la tabla 4, se muestra el reconocimiento individual de los sueros de individuos con enfermedad de Chagas de dos procedencias geográficas diferentes. Por ELISA, se encontró que los sueros de individuos de Brasil reconocieron en mayor porcentaje a cada uno de los antígenos purificados, mientras que los individuos de México en menor porcentaje a estos mismos antígenos, siendo negativos la mayoría de ellos, incluso a la cruzipaina y a la mezcla de estos antígenos puros. Se encontró además que algunos de los sueros de individuos leishmaniósicos también reaccionaron con los antígenos purificados.

Estos resultados demostraron que el porcentaje de reconocimiento a los antígenos purificados por sueros de individuos mexicanos, analizados de forma global fue del 67% para el antígeno de 40-50 kDa, 35% para el antígeno de 70-80 kDa y de 44% para la cruzipaina. Extrañamente cuando se usó la mezcla de antígenos, sólo se encontró un 41% de positividad. En cambio, los sueros de pacientes brasileños fueron positivos en un mayor porcentaje, 90% para el antígeno de 40-50 kDa, 73% de reconocimiento para el antígeno de 70-80 kDa, 91% para la cruzipaina. También hubo un reconocimiento menor para la mezcla de antígenos del 87%. Además, se observó reacción cruzada con los sueros de individuos leishmaniósicos en un

29% con los antígenos de 40-50, 70-80 kDa y a la mezcla de los tres antígenos y un 25% con la cruzipaina.

Tabla 4. Reconocimiento de los antígenos purificados por sueros de individuos infectados con *T. cruzi* y con *Leishmania* sp.

SUERO	ETAPA	40-50	70-80	CRUZIPAINA	MEZCLA
Sueros de individuos chagásicos Mexicanos					
M-37	S	+	+	+	+
M-93	S	+	+	+	+
M- 116	S	-	-	-	+
M-513	S	+	-	-	-
M-515	S	+	-	-	-
FM	S	+	+	-	+
M39	S	+	+	+	+
AG	S	+	nd	+	nd
JV	S	+	-	+	-
FV	S	-	-	+	-
EO	A	-	-	-	-
A7304	A	-	-	-	-
SBA54	A	-	-	-	-
SBA125	A	-	-	-	+
29379	A	+	-	+	-
29391	A	+	+	+	+
36669	A	+	+	-	-
CUX13	ND	+	-	-	-
POSITOT		12/18	6/17	8/18	7/17
%		67	35	44	41
Sueros de Individuos Chagásicos Brasileños					
Tc1158	S	+	+	+	+
Tc1967	S	+	nd	+	+
Tc1990	S	+	+	+	+
Tc2116	S	+	+	+	+
Tc34	S	nd	+	+	+
Tc58	S	+	-	-	+
Tc183	S	+	+	+	-
Tc758	S	+	-	+	+
Tc1094	S	+	+	+	+
Tc1246	S	-	-	+	+
Tc173	A	+	+	+	+
Tc199	A	+	-	+	-

Tc277	A	nd	+	+	+
Tc313	A	+	-	+	+
Tc508	A	+	+	+	+
Tc2479	A	-	-	-	-
Tc1731	A	+	+	+	+
Tc1796	A	+	+	+	+
Tc899	A	+	+	+	+
Tc1079	A	+	+	+	+
Tc2423	A	+	+	+	+
Tc201	A	nd	+	+	+
Tc205	A	+	+	+	+
POS/TOT		18/20	16/22	21/23	20/23
%		90	73	91	87
Sueros de individuos leishmaniósicos					
L139	L	-	-	-	+
L145	L	-	-	-	-
L173	L	-	-	-	-
L189	L	+	+	+	+
L196	L	-	-	-	-
L197	L	+	-	-	+
L199	L	-	-	+	-
L200	L	-	-	+	-
L201	L	+	-	-	+
L202	L	-	-	-	-
L7	L	-	-	-	-
L8	L	-	+	-	-
L13	L	-	+	-	+
L15	L	+	+	+	-
L16	L	-	-	nd	-
L18A	L	+	-	-	-
L20	L	-	-	-	-
L73	L	-	-	-	-
L83	L	-	-	-	-
L92	L	-	-	-	-
L656	L	+	+	+	+
POS/TOT		6/21	5/21	5/20	6/21
%		29	29	25	29

Crónico sintomático (S), Crónico asintomático (A), Leishmaniósico (L), no determinado (nd), Positivos (+) y Negativos (-).

En la tabla 5, se resume el porcentaje de reconocimiento a los antígenos purificados y a la mezcla de estos dependiendo de si los sueros provenían de individuos con enfermedad en fase crónica asintomática o en fase crónica sintomática tanto de Brasil como de México. Se encontró que el antígeno de 40-50 kDa fue reconocido por 8 de los 9 sueros de enfermos crónicos sintomáticos (89%) y por 10 de 11 sueros de individuos asintomáticos (90%) brasileños, mientras que 8 de 10 sueros de individuos sintomáticos mexicanos (80%) reconocieron a este antígeno. Sin embargo, este antígeno reaccionó con el 42% de los individuos mexicanos en fase asintomática. Con respecto al antígeno de 70-80 kDa, los resultados fueron diferentes con pacientes sintomáticos: mexicanos 44% de seropositividad y brasileños 67%. Sin embargo, se observó una mayor diferencia en los individuos en fase asintomática. Los individuos brasileños reconocieron 77% de los casos a este antígeno mientras que 29% de los mexicanos lo reconocieron. Al evaluar la cruzipaína, los sintomáticos brasileños la reconocieron en 90% mientras que, los mexicanos en esta misma fase de la enfermedad, la reconocieron en 60%. En cambio, los asintomáticos de Brasil la reconocieron en alto porcentaje (92%) y hubo reconocimiento por los individuos mexicanos en 29%. Cuando se hizo la mezcla en el ELISA de los antígenos purificados, se observó que el 55% de los sintomáticos mexicanos tuvieron anticuerpos contra estos antígenos, manteniéndose el reconocimiento por los brasileños en 90%. Los asintomáticos mexicanos reconocieron la mezcla de los tres antígenos en 29% mientras que, los brasileños asintomáticos la reconocieron en 85%.

Tabla 5. Reconocimiento de los antígenos purificados por sueros de individuos infectados con *T. cruzi* en fase crónica sintomática y asintomática.

	Ag 40-50 kDa	Ag 70-80 kDa	Cruzipaína	Mezcla
Sintomática (México)	80% (8/10)	44% (4/9)	60% (6/10)	55% (5/9)
Sintomática (Brasil)	89% (8/9)	67% (6/9)	90% (9/10)	90% (9/10)
Asintomática (México)	42% (3/7)	29% (2/7)	29% (2/7)	29% (2/7)
Asintomática (Brasil)	90% (10/11)	77% (10/13)	92% (12/13)	85% (11/13)

En paréntesis se señala el no. de positivos/no. de sueros probados.

7. DISCUSIÓN

Trypanosoma cruzi presenta un complejo ciclo de vida donde intervienen diferentes formas del parásito dando lugar a que su composición antigénica también sea compleja (Ruiz y cols., 1994). La superficie celular, que es la principal área de contacto del parásito con el hospedero, ha sido ampliamente estudiada, describiéndose distintas proteínas, glicoproteínas y otros componentes de la membrana celular así como los mecanismos involucrados en la respuesta inmune a las mismas (De Lima Rivero y cols., 2001).

En Sudamérica, diversos grupos de investigación, trabajan arduamente en la purificación y caracterización de antígenos de *T. cruzi*, utilizando diferentes metodologías bioquímicas y moleculares, para utilizarlos en el diagnóstico y profilaxis de la enfermedad de Chagas (De Lima y cols., 2001). La producción y purificación de antígenos del parásito por métodos bioquímicos e inmunológicos es difícil y laboriosa, ya que se obtienen pequeñas cantidades de los componentes antigénicos, por lo que es importante definir si alguno de estos antígenos son de utilidad para el estudio de la biología del parásito ó en el reconocimiento antigénico por sueros de individuos con enfermedad de (Da Silveira y cols., 2001).

En México, la mayoría de los estudios se habían realizado con antígenos de cepas de origen sudamericano, no evaluándose antígenos de cepas mexicanas, que pudieran ser diferentes a los descritos. Actualmente diferentes grupos de investigación utilizan cepas mexicanas de *T. cruzi* para realizar sus estudios. En un estudio, encontraron un reconocimiento preferencial, de individuos con enfermedad de Chagas, hacia los antígenos de 74, 44,31, 25 y 18 kDa en un extracto total del parásito (Bucio y cols., 1999). Otro estudio reportó como antígenos inmunodominantes los de peso molecular de 30, 32, 40, 42, 65, 70 y 83 kDa de la cepa Querétaro. Este último trabajo, dio la pauta para purificar los antígenos a partir de un extracto de epimastigotes de *T. cruzi* y que se localizaban en el rango de 40-50 y 70-80 kDa. Además se purificó la cruzipaina por fraccionamiento ácido. Los resultados que se obtuvieron en este trabajo mostraron menor reconocimiento con los tres antígenos purificados de los

sueros de individuos mexicanos en las dos diferentes fases de la enfermedad, comparados con los sueros que provenían de pacientes brasileños por lo que, es posible que exista heterogeneidad de síntomas clínicos durante la fase crónica de la enfermedad, sobre todo en áreas rurales donde la enfermedad es endémica y puede no haber síntomas o presentarse manifestaciones clínicas severas (Añez y cols., 1999).

En un estudio previo realizado en México, se encontró que los pacientes sintomáticos mexicanos mostraron diferentes niveles de anticuerpos comparados con los individuos asintomáticos en ELISA utilizando un extracto de origen mexicano, diferencia que no se observó con un kit de diagnóstico comercial (Pérez-Fuentes y cols., 1998). Otro grupo de investigación en Brasil no encontró diferencias en los niveles de anticuerpos en fase asintomática y sintomática, por medio de la fijación del complemento y ELISA pero si con la técnica de aglutinación, posiblemente debido a que en cada una de las pruebas se utilizaron diferentes antígenos (Zicker y cols., 1990).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron una intensa variación en la respuesta inmune humoral entre una población mexicana y otra brasileña que pertenecen a regiones del continente muy alejadas. Estos hallazgos podrían estar relacionados con un estudio de seis antígenos recombinantes donde se observó una gran heterogeneidad en el reconocimiento por sueros de individuos del Salvador comparado con lo observado con individuos provenientes del Cono Sur (Umezawa y cols., 1999).

Además, en este estudio se llevó a cabo el trabajo de la caracterización de antígenos del parásito, encontrando que los antígenos purificados son glicoproteínas ya que reconocen diferentes azúcares. En otros estudios en Sudamérica determinaron que los epitopes glicosídicos como las proteínas juegan un papel muy importante en la respuesta parásito-hospedero (De lima y cols., 2001, Cabriola y cols., 1999).

También se purificó la cruzipaina, molécula ampliamente estudiada por presentar actividad proteolítica, capaz de degradar albúmina sérica, hemoglobina y proteínas solubles de

T. cruzi (Cazzulo y col., 1989), importante en el desarrollo y sobrevivencia del parásito dentro de la célula hospedera y por lo tanto fue necesario determinar su estructura cristalina (McGrath y cols., 1995). Los pacientes con enfermedad de Chagas desarrollan una respuesta inmune celular y humoral contra la cruzipaina (Ramos y cols., 2002; Morrots y cols., 1997). En México esta proteasa, se evaluó con sueros de individuos mexicanos con enfermedad de Chagas, observándose un reconocimiento diferente de la cruzipaina por los anticuerpos de los sueros de individuos infectados, de diferentes zonas geográficas que podría explicarse en términos de la expresión de distintas isoformas de la cruzipaina en las cepas de *T. cruzi* que se encuentran circulando en cada zona geográfica, o a diferencias en la respuesta humoral montada por diferentes individuos. Probablemente la isoforma de la cruzipaina de la cepa Y (que fue la empleada en este trabajo) no es la misma que la cruzipaina de las cepas de *T. cruzi* que se encuentran en México y por ello tal vez los anticuerpos de los sueros brasileños reconocen mejor a la cruzipaina que los mexicanos (Nieto, 2001). Esto confirmaría que los antígenos purificados y caracterizados provenientes de otras regiones, podrían ser menos antigénicas para la población mexicana infectada (Sánchez y cols., 2001; Pérez-Fuentes y cols., 1998).

Nuestros hallazgos indicaron que la mezcla de antígenos no aumenta el porcentaje de reconocimiento por los sueros de individuos chagásicos. Esto es contrario a lo encontrado en Brasil con una mezcla de antígenos recombinantes, donde se observó el aumento del porcentaje de reconocimiento hasta en 98.5%, confirmando que los antígenos recombinantes o los péptidos sintéticos pueden ser una mejor alternativa que los Kits comerciales (Umezawa y cols., 2003).

Las diferencias tan evidentes de la respuesta inmune de las dos poblaciones estudiadas brasileña y mexicana podrían no solo ser debidas al linaje de *T. cruzi* presente en las diferentes regiones (en nuestro país los parásitos pertenecen al linaje I (Bosseno y cols., 2002), y los parásitos que infectan a humanos en Sudamérica pertenecen principalmente al linaje II (Di Noia y cols., 2002)), sino también a diferencias genéticas del hospedero, ya que estudios

preliminares del complejo principal de histocompatibilidad y de los genes de clase II en pacientes con CCC y chagásicos sin sintomatología muestran resultados que apoyan esta idea (Cruz-Robles y cols., 2004).

Nuestros resultados así como otros reportes en la literatura sugieren que las pruebas serológicas convencionales pueden ser incapaces de detectar la infección en algunos individuos chagásicos crónicos. Esto puede ser debido a la depresión humoral específica en esos pacientes o la incapacidad de las pruebas para detectar bajos niveles de anticuerpos dirigidos contra *T. cruzi* como los que presentan los individuos mexicanos (Gomes y cols., 1999).

T. cruzi, tiene un alto grado de heterogeneidad genética, la cual puede estar reflejada en varios aspectos de su comportamiento biológico y en las diferentes manifestaciones clínicas o patológicas de los individuos infectados (Morgan y cols., 1998). Este parásito se ha dividido en dos grupos genéticos divergentes o linajes llamados *T. cruzi* I y II (Di Noia y cols., 2002). Esta estructura en la población ha sido consecuencia de su historia evolutiva divergente y de su clonalidad (Tibayrenck y cols., 1986). Recientemente, se han utilizado varios marcadores moleculares como el análisis de genes de miniexon y del ARN ribosomal 24Sa, que muestran un dimorfismo estrictamente concordante con los dos linajes de *T. cruzi* (Di Noia y cols., 2002). Datos epidemiológicos y biológicos proporcionan la evidencia de una asociación de *T. cruzi* II con el ciclo doméstico y por lo tanto la enfermedad humana y *T. cruzi* I con el ciclo selvático (Thomaz Soccol y cols., 2002; Rodrigues-Coura y cols., 2002). Las características clínicas de la infección también muestran variabilidad debido a que se ha encontrado que las cepas brasileñas producen cardiomiopatías y megasíndromes mientras que en otras áreas como Venezuela, los síntomas de la enfermedad no se manifiestan de la misma manera (Añez y cols., 1999; Fernández-Mestre y cols., 1998).

Estudios realizados en México sobre la caracterización de cepas han demostrado que el tipo de parásito que está presente en nuestro país corresponde predominantemente al zimodemo 1, renombrado recientemente *T. cruzi* I (López-Olmos y cols., 1998; Boseeno y cols.,

2002), linaje que causa infección natural en humanos en la región urbana central de México (Rangel-Flores y cols., 2001). También se sabe que los insectos vectores de *T. cruzi* de México son diferentes a los de Sudamérica (Ramsey, 2003).

Se ha sugerido que la variabilidad entre los aislados de *T. cruzi* I Y II junto con las características genéticas del humano (Fernandez-Mestre y cols., 1998) podrían ser responsables del gran espectro de manifestaciones clínicas de la enfermedad en la forma crónica sintomática y de los diferentes grados de cardiomiopatías y las formas digestivas, ya que se han encontrado altos títulos de IgG dirigidos contra el parásito en pacientes con daño cardíaco mientras que en la forma digestiva se presentan altos niveles de IgA (Morgan y cols., 1998; Hernández-Becerril y cols., 2001).

Otros estudios realizados en Venezuela, mostraron patrones de IET de los sueros de individuos chagásicos hacia las proteínas de 70-85 kDa, no encontrándose correlación entre el patrón de proteínas reconocidas, los títulos de anticuerpos o la severidad de la enfermedad (O'Daly y cols., 1994). Confirmamos en este estudio que la respuesta inmune generada contra antígenos de *T. cruzi*, en diferentes individuos puede variar regionalmente siendo esta respuesta inmune en unas zonas mas fuerte que en otra y produciéndose anticuerpos contra diferentes antígenos del parásito (Pérez-Fuentes y cols., 1998, Sosa-Jurado y cols., 2003) o incluso presentar reacción cruzada con los antígenos de *Leishmania* sp. (Martins Goncalves y cols., 2002; Telles y cols., 2003).

Estos resultados enfatizan la necesidad de realizar estudios mas detallados de la respuesta inmune de la población mexicana infectada por *T. cruzi* para poder definir los antígenos más adecuados para ser utilizados no sólo en pruebas de diagnóstico sino en experimentos de inmunidad protectora encaminadas a la profilaxis de la enfermedad como lo han desarrollado otros países del continente Americano (Michailowsky y cols., 2003). Apenas recientemente, un número reducido de sueros de pacientes mexicanos fue estudiado con respecto al reconocimiento de antígenos clonados (Umezawa y cols., 2004) por lo que, es

importante aumentar el estudio de antígenos potencialmente útiles para el inmunodiagnóstico y profilaxis de esta importante enfermedad presente en México

8. CONCLUSIONES

- Los extractos de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* presentaron un patrón electroforético similar variando en la concentración de algunas de las proteínas observadas.
- Los antígenos purificados de epimastigotes son glicoproteínas y no mostraron actividad proteolítica a excepción de la cruzipaina y el antígeno purificado por cromatografía de afinidad.
- Hubo un reconocimiento diferencial con extracto total por los sueros de individuos mexicanos y brasileños en fase crónica sintomática y asintomática.
- Los sueros de los individuos en fase crónica sintomática y asintomática de Brasil, reconocen mejor a los antígenos purificados que los sueros de los individuos mexicanos infectados con *T. cruzi*. Lo que indica que la respuesta inmune humoral en individuos con enfermedad de Chagas brasileños y mexicanos es diferente.
- Con estos antígenos, hubo reacción cruzada con los sueros de individuos leishmaniosicos lo que indica que se necesita identificar y estudiar otros antígenos para detectar cuales son específicos de *T. cruzi*.

9. BIBLIOGRAFIA

Alberti, A. E., Fachado, C.A., Montalvo, A. M., Izquierdo, P. L. y Fonte, G. L. 1998. Proteasa dependiente de cisteína en *Trypanosoma cruzi* útil en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Rev. Cubana. Med. Trop 50:75-81.

Andrade, S. G. 1974. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Reconcavo Baio (contribuição a o estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). Rev. Patol. Trop. 3:65-121.

Andrade, S. G., Andrade, V., Rocha Filho, F. e Barral Netto, M. 1981. Análise antigénica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 23:245-250.

Andrews, N. S. and Colli, W. 1982. Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. J. Protozool. 29:264-269.

Añez, N., Carrasco, H., Parada, H., Crisante, G., Rojas, A., González, N., Ramírez, J. L., Guevara, P., Rivero, C. Borges, R. and Scorza, J. V. 1992. Acute Chagas disease in western Venezuela: a clinical seroparasitologic and epidemiologic study. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60:215-222.

Almeida, E., Krieger, M. A., Carvakgi M. R., Oelemann, W. and Goldenberg, S. 1990. Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas disease and blood bank screening. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85:513-517.

Bautista, L. N. 1993. Estudios de transmisores de *Trypanosoma cruzi* en el estado de Morelos. Tesis Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.98 pp.

Bosseno, M. F., Barnabé, C., Magallón-Gastélum, E., Lozano-Kasten, F., Ramsey, J., Espinoza, B. and Breniere, F. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. J. Clin. Microbiol. 40:627-632.

Brabin, L. 1992. The epidemiological significance of Chagas disease in women. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 87:73-79

Bradford, M. M. 1976. A Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Brener, Z. and Krettli, A. U. 1990. Immunology of Chagas disease. In: Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects. Ed. Freeman Company, NewYork. 247 pp.

Bucio, M. I, Cabrera M, Segura E. L., Zenteno E, Salazar-Schetino P. M. 1999. Identification of immunodominant antigens in Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. Immunol. Invest. 28:257-68.

Caballero, G. M. L. 1996. Estudio de la respuesta inmune humoral inducida por cuatro aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi* en modelo murino. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 92 pp.

Carrasco, R. E. 2000. Estandarización y evaluación del ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de antígenos circulantes de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. 91 pp.

Carrasco, E., Sánchez, B., Caballero, M. L., Reyes, P. A., Monteón, V., Rangel, H., Ramos, C. y Espinoza, B. 2000. Experiencia en México con la utilización de ELISA y Western blot en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas empleando antígenos puros. Memorias del XIV Congreso Nacional de Inmunología, Guanajuato. p. 56.

Cazzulo, J.J., Couso, R., Raimondi, A., Wernstedt, Ch, and Hellman, U. 1989. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 33:33-42.

Chagas, C. 1909. Nova Tripanozomíaze Humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo Evolutivo do *Schizotripanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1:159-218.

Copeland, R. 1994. Methods for protein quantitation. In: Methods for proteins analysis, a practical guide to laboratory protocols. Ed. Chapman and Hall. International Thomson Publishing Was. p. 39-56.

Corbett, C. E. P., Ribeiro, U., Prianti, M. G., Habr-Gama, A., Okumura, M., and Gama-Rodríguez, J. 2001. Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas disease. Dis. Colon Rectum. 44:993-998.

Cordeiro Da Silva, A., Espinoza, A. G. Taibi, A., Ouaisii, A. and Minoprio, P. 1998. A 24000 MW *Trypanosoma cruzi* antigen is a B-cell activator. Immunology 94:189-196.

Cruz-Robles, D., Reyes, P. A., Monteón-Padilla, V. M., Ortiz-Muñiz, A. R. and Vargas-Alarcón, G. 2004. MHC clasS I and class II genes in mexican patients with Chagas disease. Human Immunol. 65:60-65.

Da Silveira, J. F., Umezawa, E. S. and Luquetti A. O. 2001. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. Trends Parasitol. 17:64-70.

De Tito, E., Moreno, M., Braun, M. and Segura, E. 1987. Chagas´disease: humoral response to subcelular fraction of *Trypanosoma cruzi* in sytomatic and asympomatic patients. Trop. Med. Parasitol. 38:163-166.

DeLima Rivero, A. R., Farias Tamoy, MN., Tortolero Leal, E., Navarro Aguilera, M. C. y Contreras Alvarez, V. T. 2001. Purificación parcial y empleo de fracciones glicosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Acta Cient. Venez. 52:235-247.

Di Noia, J. M., Buscaglia, C. A., De Marchi, C. R., Almeida, I. C. and Frasc, A. C 2002. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas´disease is due to a single parasite lineage. J. Exp. Med. 195:401-413.

Dumonteil, E. 1999. Update on Chagas disease in Mexico. Sal. Pub. Mex. 41:322-327.

- Dumonteil, E., Gourbiere, S., Barrera-Pérez, M., Rodríguez-Felix, E., Ruiz-Piña, H., Baños-López, O., Ramírez-Sierra, M. J. Menu, F. and Ravinovich, J. E. 2002. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmisión dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67:176-183.
- Dusanic, G. D. 1991. *Trypanosoma cruzi* (*Schistotrypanum cruzi*). In: Parasitic Protozoa. Ed. Academic Press, London. Vol 1. p 137-194.
- Duschak, V. G., Riarte, A., Segura, E. and Laucella, S. A. 2001. Humoral immune response to cruzipain and cardiac dysfunction in chronic Chagas disease. *Immunol. Let.* 78:135-142.
- Espinoza, B., Vera-Cruz, J. M. González, H., Ortega, E. and Hernández, R. 1998. Genotype and virulence correlation within mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Tropica.* 70:63-72.
- Frank, F. M., Fernández, M. M., Taranto, N. J., Cajkal, S. P., Margni, R. A., Castro E., Thomaz-Soccol, V. and Malchiodi, E. L. 2003. Characterization of human infection by *Leishmania* spp in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *T. cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitol.* 123:31-39.
- Fernandez-Mestre, M. T., Layrisse, Z., Montagnani, S., Acquatella, H., Catalioti, I., Matos, M., Balbas, O., Makhatadze, N., Dominguez, E., Herrera, F. and Madrigal, A. 1998. Influence of the HLA class II polymorphism in chronic Chagas disease. *Parasite Immunol.* 20:197-203.
- Freilij, H. y Storino, R. 1994. Diagnóstico de Laboratorio. En: Enfermedad de Chagas. Eds. Storino, R. and Milei, J. Ed. Mosby, Argentina. 343-357.
- Giordanengo, L., Guñafazú, N., Stempin, C., Fretes, R., Cerbán, F. and Gea, S. 2002. Cruzipain , a mayor *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. *Eur. J. Immunol.* 32:1003-1011.
- Girones, N. and Fresno, M. 2003. Etiology of Chagas disease myocarditis, autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trens Parasitol.* 19:19-22.
- Goldsmith, R.S., Zárate, R., Kagan, I., Cedeño, F. J., Galindo, V. y Paz, E. 1978. El Potencial de la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea: hallazgo serológico entre donadores en el estado de Oaxaca. *Sal. Púb. Méx.* 20:439-444.
- Gomes, Y., Abath, F., Nakazawa, M., Minoprio, P., Vouldoukis, I. and Monjour, L. 1999. Partial protection of mice against *Trypanosoma cruzi* after immunizing with the TCy72 antigenic preparation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94:167- 172.
- Gomes, Y.M., Pereira, V. R., Nakasawa, M., Rosa, D. S., Barros, M. D., Ferreira, A. C., Silva, E. D., Ogatta, S. F., Krieger, M. A. and Godenberg, S. 2001. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinat-Chagas-Biomanguintos kit. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96:497-501.
- Gulh, F. 1990. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of south American Trypanosomiasis (Chagas disease). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 85:531-532.

Guzmán-Bracho C., García-García L., Floriani-Verdugo J., Guerrero-Martínez S., Torres-Cosme M., Ramírez-Melgar C. y Velasco-Castrejón O. 1998. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. *Pan. Am. J. Public. Health.* 4:94-99.

Harlow, E. and Lane, D. 1988. Antibodies a Laboratory Manual. Ed. Cold Spring Harbour Laboratory. New York. USA. 726 pp.

Harris, E. L. and Angal, S. 1989. Purification by exploitation of activity. In: Protein purification, methods a practical approach. Ed. Oxford, New York. 317 pp.

Hernández-Becerril, N., Nava, A., Reyes, P. and Monteón, V. 2001. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *Arch. Cardiol. Mex.* 71:199-205.

Higuchi, M. L. 1999. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasite antigens subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94 (suppl1): 263-267.

Hölscher, C., Hartmann, R., Mossmann, H. and Schaub, C. A. 2003. Effects of the isolation methodology on protein profiles of blood trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* 126: 41-51.

Houghton R., Benson D., Reynolds L., McNeill P., Sleath P., Lodes M., Skeiky W., Badaro R., Krettli A. and Reed S. 2000. Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated or untreated Chagas disease. *J. infec. Dis.* 181:325-330.

Houghton, R., Benson, D., Reynolds, L. and McNeill, P. 1999. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and concensus-positive sera. *J. Infec. Dis.* 179:1226-34.

Kierzenbaum, F. and Szein, M. 1994. Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). In: Parasitic infection and the immune system. Ed. Kierzenbaum, F. Academic Press, Inc. pp. 53-85.

Kuhn, R. 1981. Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. In: Parasitic Diseases. Ed. Mansfield, J.M. Marcel Decker, U. S. A. p. 137-166.

Labriola, C., Cazzulo, J. and Parodi, A. 1999. *Trypanosoma cruzi* calreticulin is a lectin that binds monoglucosylated oligosaccharides but not proteins moieties of glycoproteins. *Mol. Biol. Cell.* 10:1381-1394.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

Levine, N. D., Corliss, J.O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loedic, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, E. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., and Wallace, F. G. 1980. A Newly Revised Classification of the Protozoa. *J. Protozool.* 27:37-58.

López-Olmos. V. 1994. Caracterización biológica in vitro de 17 cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 96 pp.

López-Olmos. V. 1999. Identificación y caracterización de epitopos protéicos de una cepa mexicana de *Trypanosoma cruzi* a través del uso de anticuerpos monoclonales. Tesis de Maestría, UACPyPCCH. UNAM.127 PP.

López-Olmos, V., Pérez-Nasser, N., Piñero, D., Ortega, E., Hernández, R. and Espinoza, B. 1998. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 69: 239-254.

Markell, E. J. and Vague, W, 1999. Medical parasitology. Saunders Company, Philadelphia. P. 134-145.

Marshak, D. R., Kadonaga, Y. T., Burges, R. R., Knuth, M. W., Brennan and Lin, S. H. 1996. Strategies for protein purification and characterization. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 396 pp.

Martínez-Días, R. A., Escario, J. A., Nogal-Ruiz, J. J. 2001. Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 96:53-59.

Martins Goncalves, C. C., Vissoci Reiche, E. M., Alves de Abreu, B., Gomes Verzignassi, Silveira T., Felizardo, T. C., Rocha Maia, K., Costacurta, R., Padovesi, E. J., Prado Dias Filho, B., Itow Jankevicius S., and Jankvicius, J. V. 2002. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a Western blot for diagnosis of American tegumentary Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66:91-102.

Martínez, J., Campetella, O., Frasch, A. C. and Cazzulo, J. J. 1991. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is antigenic in human infections. *Infect. Immun.* 59:4275-4277.

Martínez-Ibarra, J. A., Bárcenas-Ortega, N. M., Noguera-Torres, B., Alexandre-Aguilar, R., Rodríguez, M. L., Magallón-Gastélum, E., López-Martínez, V. and Romero-Nápoles, J. 2001. Role of two triatoma (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) species in the transmission of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastidae: Trypanosomatidae) to man in the west coast of Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 96:141-144.

Matsumoto, T., Cotrim, P., DaSilveira Franco, J., Stolf, A. M. and Umezawa, E. 2002. *Trypanosoma cruzi*: isolation of an immunodominant peptide of TESA (trypomastigote excreted secreted antigens) by gene cloning. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 42:187-192.

McGrath, M., Eakin, A. E., Engel, J. C., Mckenrow, J., Craik, Ch. and Fletterick, R. J. 1995. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas disease . *J. Mol. Biol.* 247:251-257.

Mendes, R., Hoshino, S., Moura, A., Mota, I., Rimmel, A., Heredia, G. Luquetti, A. and Leser, P. 1997. Serological diagnosis of Chagas' disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J. Clin. Microbiol.* 35:1829-1834.

Mendoza -González, J., Miranda Lluck, E., Velasco Castrejon, O., Tinoco Reina, O. y Maciel Pérez, M. J. 1992. Cardiopatía chagásica crónica, presentación de 60 casos. *Arch. Cardiol. Mex.* 65:546-550.

- Michailowsky, V., Luhrs, K., Rocha, O. M., Fouts, D., Gazzinelli, R. and Manning, J. E. 2003. Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infect. Immun.* 71:3165–3171.
- Miles, M. A., Toye, P. J., Oswald, S. C. and Gofrey, D. G. 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71:217-225.
- Miles, M. A., Souza, A., Pova, M., Shaw, J. J., Lainson, R., Toye, P. 1978. Isoenzymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature.* 272:819-821
- Monteón-Padilla, V., Guzman, L., Ingrate, C., Rosales, J. L. and Reyes, P. 1997. Serodiagnosis of American Trypanosomiasis by using nonpathogenic trypanosomatid antigen. *J. Clin. Microbiol.* 12:3316-3319.
- Monteón-Padilla V., Negrete Garcia, C. and Reyes López, P. 1996. Chronic Chagasic cardiopathy with parasitemic state (preliminary report). *Arch. Med. Research.* 27:335-337.
- Monteón-Padilla, V., Hernández-Becerril, N., Guzmán-Bracho, C., Rosales-Encina, J. L. and Reyes-López, P. 1999. American trypanosomiasis (Chagas disease) in blood banking in Mexico City: seroprevalence and its potential transfusional transmission risk. *Arch. Med. Research.* 30: 393-398.
- Monteón-Padilla, V. M., Vargas-Alarcón, G., Vallejo-Allende, M. y Reyes, P. A. 2002. Miocardiopatía dilatada específica. La cardiopatía chagásica crónica en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. *Arch. Cardiol. Mex.* 72. Supl 1:S148-S152.
- Morgan, J., Colley, D. G., Pinto Dias, J. C., Gontijo, E. D., Bahia Oliveira, L., Correa Oliveira, R. and Powell, M. R. 1998. Analysis of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype specificities by Western blot in sera from patients with different forms of Chagas disease. *J. Parasitol.* 84:641-643.
- Nieto, C. G. 1997. Caracterización de proteasas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Querétaro. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 94 pp.
- Nieto, C. G. 2001. Participación de complejos inmunes formados por cruzipaina y anticuerpos anticruzipaina, en fenómenos de inflamación. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. 88 pp.
- O'Daly, J. A., Carrasco, H., Fernandez, V. and Rodriguez, M. B. 1994. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardiopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Acta Tropica.* 56:265-287.
- OMS. 1991. Control de la Enfermedad de Chagas. Informe de un comité de expertos de la OMS. Serie de informes técnicos. OMS. Ginebra. 106 pp.
- Ouaisi, A., Guilvard, E., Delneste, Y., Caron, G., Magistelli, G., Herbault, N., Tieblemont, N. and Jeannin, P. 2002. The *Trypanosoma cruzi* Tc52 released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Tcell-like receptor 2 and confers protection against lethal infection. *J. Immunol.* 168:6366-6374.

Peralta, J. M., Teixeira, M., Shreffler, W. G., Pereira, J. B., Burns, J. M., Sleath, P. R. and Reed, S. G. 1994. Serodiagnosis of Chagas disease by Enzyme Linked Immunosorbent Assay using two synthetic peptides as antigens. *J. Clin. Microbiol.* 32:971-974.

Pereira, M. 1990. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. In: *Modern Parasite Biology*. Ed. Wyler, D. Freeman-Company, New York. 560 pp.

Pereira, L. V., Levy M. A. and Boainain, E. 1989. Xenodiagnóstico, Hemocultura e Teste de Lise Mediada pelo Complemento, Como Criterios de Selecao de Pacientes Chagásicos Crônicos para Quimioterapia. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 5:301-307.

Pereira, V., Nakasawa, M., Furtado, V., Abath, F. and Gomes, Y. 2000. Immunodiagnosis of chronic Chagas disease using the Tc46 and Tc58 as antigens. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33:367-370.

Pérez-Fuentes, R., Sánchez-Guillén, M. C., González-Álvarez, C., Monteón, V., Reyes, P. and Rosales-Encina, J. L. 1998. Humoral nitric oxide levels and antibody immune response of symptomatic and indeterminate Chagas disease patients to commercial and autochthonous *Trypanosoma* antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58:715-720.

Pinto, D. J. 1984. Enfermedad de Chagas: Epidemiología-Clinica-Terapeútica. Programa de Salud Humana. Buenos Aires, Argentina. 106 pp.

Ramos, A., Duschak, V., Gerez de Burgos, N., Barboza, M., Remedi, M., Vides, M. and Chiabrando, G. 2002. *Trypanosoma cruzi*: cruzipain and membrane-bound cysteine proteinase isoform(s) interacts with human α_2 -macroglobulin and pregnancy zone protein. *Exp. Parasitol.* 100:121-130.

Ramos-Echevarría, A. Monteón-Padilla, V. y Reyes-López, P. 1993. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Donadores de Sangre. *Sal. Pub. Méx.* 35:56-64.

Ramsey, J. M. and Schofield, C. J. 2003. Control of Chagas disease vectors. *Sal. Púb. Méx.* 45:123-128.

Rangel, H., Gatica, R. and Ramos, C. 1998. Detection of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in donors from a blood bank in Cuernavaca, Morelos, Mexico. *Arch. Med. Res.* 29:79-82.

Rangel-Flores, H., Sánchez, B., Mendoza-Duarte, J., Barnabe, C., Breniere, F., Ramos, C., and Espinoza, B. 2001. Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central Mexico: correlation with electrocardiographic alterations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65:887-895.

Reyes, P., Mendoza Cifuentes, M., Marcuschamer, J. y García-Coste, Z. 1983. Miocardiopatía congestiva y tripanosomiasis americana (estudio clínico y serológico). *Sal. Pub. Mex.* 25:139-144.

Rodrigues-Coura, J., Junqueira, A., Fernandes, O. Valente, S. and Miles, M. 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 118:171-176.

- Romero, C. R. 1993. Parasitología médica. Bases biológicas de las enfermedades infecciosas. Ed. Panamericana. Pp. 543-549.
- Ruiz, A., Búa, J. and Segura, E. 1994. Antígenos del *Trypanosoma cruzi*: Perspectivas futuras. En: Enfermedad de Chagas. Eds. Storino, R. and Milei, J. Mosby, Doyma, Argentina. Pp 629-640.
- Salazar Schettino, P. M., Bucio, M. I., Cabrera, M. And Bautista, J. 1997. First case of natural infection in pigs. Review of *Trypanosoma cruzi* reservoirs in Mexico. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 92: 499-502.
- Sánchez, B. 1996. Uso de ELISA, western blot y hemocultivo para el estudio de la enfermedad de Chagas en el Estado de Morelos. Tesis. Prof. Escuela de Ciencias Químicas, UABJ. 66 pp.
- Sánchez, B., Monteón, V., Reyes, P. and Espinoza, B. 2001. Standarization of Micro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western Blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from mexican strain as antigens. Arch. Med. Research 32:382-388.
- Sánchez-Guillén, M. C., Barnabé, C., Guégan, J. F., Tibayrenc, M., Velásquez-Rojas, M. Martínez-Munguía, J., Salgado-Rosas, H., Torres-Rasgado, E., Rosas-Ramírez, M. I. and Pérez-Fuentes, R. 2002. High prevalence anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, among blood donors in the state of Puebla, a non- endemic area of Mexico. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97:947-952.
- Santos, V. M., DeLima, M. A., Cabrine Santos, M., Márquez, D. E., Gracias Reis, M., De Araujo Pereira, G., Lages-Silva, E. and Ramirez, L. E. 2002. Pancreatic hepatocytes in hamster (*Mesocricetus auratus*) infected with *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 100:103-111.
- Scharfstein, J., Luquetti, A., Murtha, A. Senna, M., Resende, J., Rassi, A. and Mendoça, L. 1985. Chagas disease: serodiagnosis with purified Gp 25 antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34:1153-1160.
- Schmidh, G. D. and Roberts, L. S. 1989. Foundations of Parasitology. Ed. Timer Mirror/Mosby College Publishing, USA. 750 pp.
- Snary, D. and Hudson, L. 1979. *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins: identification of one mayor glycoprotein. Febs. Lett. 100:166-170.
- Soares, M., Pontes de Carvalho, L. and Ribeiro dos Santos, R. 2001. The pathogenesis of Chagas disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. An. Acad. Bras. Cienc. 73: 547-559.
- Solis Franco, R. R., Romo Zapata, J. A. and Martínez Ibarra, A. 1997. Wild reservoirs infected by *Trypanosoma cruzi* in the ecological park "el Zapotal", Tuxtla Gutiérrez Chiapas, Mexico. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 92:163-164.
- Sosa-Jurado, F., Mazariego-Aranda, M., Hernández-Becerril, N., Garza-Murillo, V., Cárdenas, M., Reyes, P. A. Hirayama, K. and Monteón, V. M. 2003. Electrocardiographic finding in mexican chagasic subjects living in high and low endemic region of *Trypanosoma cruzi* infection. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98: 605-610.

- Tachibana, H., Nagakura, H. and Kaneda, Y. 1988. Serodiagnosis of Chagas disease using a monoclonal antibody against *Trypanosoma cruzi* specific Mr.25000 Antigen. *Parasitol. Res.* 74:409-414.
- Tarleton, R. L. and Zang, L. 1999. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol. Today.* 15:94-99.
- Tay, J., Schenone, H., Sanchez, J. y Robert, L. 1992. Estado actual de los conocimientos de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Bo1. Chil. Parasitol.* 47:43-53.
- Teixeira, M., Grazzinelli, R. and Silva. 2002. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.* 18:262-266.
- Telles, S., Abate, T., Slezzynger, T. and Henriquez, D. A. 2003. *Trypanosoma cruzi* ubiquitin as an antigen in the differential diagnosis of Chagas disease and leishmaniasis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 37: 23-28.
- Ternynck, T., and Avrameas, S. 1990. *Immuno-Enzymatic Techniques*. Elsevier. New York. 131 pp.
- Thomaz Soccol, V., Barnabe C., Castro, E., Luz, E. and Tibayrenc, M. 2002. *Trypanosoma cruzi*: isoenzyme analyses suggest the presence of an active Chagas sylvatic cycle of recent origin in Paraná state, Brazil. *Exp. Parasitol.* 100:81-86.
- Tibayrec, M., Ward, P., Moya, A. and Ayala, F. J. 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Evolution.* 83:115-117.
- Trujillo Contreras, F., Villanueva Yerenas M. A., Soto Gutiérrez, M., Raygoza Anaya, M. y Jiménez Corder A. 2000. Seguimiento serológico de infección por *Trypanosoma cruzi* en individuos estudiados de 50 municipios del estado de Jalisco, México. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33: 591-596.
- Umezawa, E., Shikanai, Y. M., Franco, S. J., Cotrim, P. C., Paranhos, G. and Katzin, A. 1993. *Trypanosoma cruzi*: detection of a circulating antigen in urine of chagasic patients sharing common epitopes with an immunodominant repetitive antigen. *Exp. Parasitol.* 76:352-357.
- Umezawa, E., Bastos, S., Camargo, M., Yamaguchi, L., Santos, M., González, A., Zingales, B., Levin, M., Sousa, O., Rangel-Aldao, R. and da Silveira, J. F. 1999. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas disease in South and Central America. *J. Clin. Microbiol.* 37:1554-1560.
- Umezawa, E., Bastos, S., Coura, J., Levin, M., González, A., Rangel-Aldao, R., Zingales, B., Luquetti, A. and da Silveira, J. F. 2003. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion.* 43: 91-97.
- Umezawa, E., Luquetti, A., Levitus, G., Ponce, C., Ponce, E., Henriquez, D., Revollo, S., Espinoza, B., Sousa, O., Khan, B. and da Silveira, J. F. 2004. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. *J. Clin. Microbiol.* 42: 449-452.

Velasco-Castrejón, O., Valdespino, J., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Guzmán-Bracho, C., Magos, C., Llausás, A., Gutiérrez, G. y Sepúlveda, J. 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Pública Mex.* 34:186-196.

Vera-Cruz, J. M., Magallón –Gastelum, E., Grijalva, G., Rincón, A. R. Ramos-García, C. and Armendáriz-Borunda, J. 2003. Molecular diagnosis of Chagas disease and use of an animal model study parasite tropism. *Parasitol Research.* 89: 480-486.

Vidal-Acosta, V., Ibañez-Bernal, S. y Martínez-Campos, C. 2000. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Pública Mex.* 42: 496-503.

Yoshida, N., Dorta, M., Ferreira, A., Oshiro, M., Mortara, R., Acosta, A. and Favoreto S. 1997. Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84:57-67.

Zárate, L. and Zárate, R. 1985. A checklist of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) of México. *Int. J. Entomol.* 27:102-127.

Zavala, V. J., Rodríguez, L. M. y Baqueiro, D. A. 1993. Enfermedad de Chagas en el estado de Yucatán, México. Informe de cuatro casos clínicos. *Patología (México).* 13:355-363.

Zambrano-Villa, S., Rosales-Borjas, D., Carrero J. C. and Ortiz-Ortiz, L. 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 18:272-278.

Zicker, F., Smith, P. G., Luquetti, A. O. and Oliveira, O. S. 1990. Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter-paper. *Bulletin WHO.* 68: 465-471.

Zuñiga, E., Motran, C., Montes, C., Yagita, H. and Gruppi, A. 2002. *Trypanosoma cruzi* infection selectively renders parasite-specific IgG+B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fracticide. *J Immunol.* 168:3865-3973.

APÉNDICE 1

Medio de cultivo para el crecimiento de epimastigotes

Medio LIT

Cloruro de sodio (NaCl SIGMA, núm. de catálogo S9888)	4 g
Cloruro de potasio (KCl MERCK, núm. de catálogo 4936.1000)	0.4 g
Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ HPO ₄ BAKER, núm. de catálogo 3828-01)	8 g
Glucosa (o dextrosa MERCK, núm. catálogo 834)	2g
Triptosa (DIFCO, núm. de catálogo 0124-01-0)	5g
Infusión de caldo de hígado (DIFCO, núm. de catálogo 0269-17-7)	5 g
Hemina (SIGMA, núm. de catálogo H-2250)	0.025g
Suero Fetal de Bovino (SFB) (GIBCO, núm. de catálogo 200-614a)	100 ml

Modo de preparación.

Todos los componentes del medio, excepto el SFB y la hemina se disuelven en 1000 ml de agua bidestilada, ajustando el pH a 7.2. Se esteriliza en autoclave a 120° y con presión de 1 atmósfera por 20 minutos. El medio se somete a una prueba de esterilidad, dejándose a temperatura ambiente y en oscuridad durante tres días, finalizando la prueba de esterilidad, el medio se complementa con 50 µl de hemina por cada 100 ml de medio a complementar (quedando a una concentración de 25 µg de hemina/ml) y con 10% de SFB inactivado. Previo a su uso se realiza la misma prueba de esterilidad ya mencionada.

Medio de cultivo para el crecimiento de promastigotes de *Leishmania* sp

El medio RPMI (GIBCO, núm. de catálogo 31800-014) se encuentra disponible comercialmente, para preparar 1 L de medio se disuelve un sobre de RPMI en 900 ml de agua, y se le agrega 293 mg de glutamina (GIBCO, núm. de catálogo 25030-081) 10 ml de hepes pH 7.3 (SIGMA, núm. de catálogo H3375; 1.5 g de hepes en 500 ml), 5 % de SFB, 1000 u/ ml de penicilina y 1 mg/ml de estreptomycin. Este se filtra con una membrana de 0.22 µm (MILLIPORE, núm. de catálogo GSWPO4700).

Medio D-MEM para el crecimiento de células Vero

El medio D-MEM (GIBCO, núm. de catálogo 12100-038) se encuentra disponible comercialmente. Para prepararlo, se disuelve un sobre de 13.4 g y 3.7 g de NaCO₃ en menos de 1000 ml de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.1-7.3 y se afora a 1000 ml. Después se filtra

con una membrana de 0.22 μ (MILLIPORE, núm. de catálogo GSW P04700) y se deja a temperatura ambiente al menos un día para la prueba de esterilidad. Al día siguiente se complementa con el porcentaje deseado de SFB (10%), glutamina, piruvato, vitaminas, aminoácidos no-esenciales y antibióticos.

Antibióticos

Da una protección básica contra la infección por bacterias.

Para preparar 250 ml se agrega 1.5 g de penicilina (1000 unidades SIGMA, núm. de catálogo P7794) y 2.5 g de estreptomycin (1000 unidades, SIGMA, núm. de catálogo S1277) se disuelven en PBS, se filtra con una membrana de 0.22 μ (MILLIPORE, núm. de catálogo GSW P04700) y se guarda a -20°C . Se agrega 10 ml de la solución a un litro de medio de cultivo.

L-Glutamina 2mM

Es un nutriente esencial.

Para preparar 100 ml de L-glutamina se mezclan 2.92 g de glutamina (GIBCO, núm. de catálogo 25030-081) agua destilada. La solución se filtra con una membrana de 0.22 μ y se congela a -20°C . Se agregan 10 ml de la solución a 1 l de D-MEM.

De los **aminoácidos no esenciales 10 mM** (GIBCO núm. catálogo 11140-019), las **vitaminas 100x** (GIBCO, núm. de catálogo 11120-052) y del **piruvato de sodio 100 mM** (SIGMA, núm. de catálogo 11360-070) se agregan del stock 10 ml por cada litro de medio de cultivo.

EDTA

Es un quelante que permite que las células Vero se separen entre sí.

Se prepara una solución stock de EDTA 0.5M (100x) PM EDTA=292.25g/mol

Para 100 ml se pesó 14.6125 g de EDTA y se afora a 100 ml con PBS.

Para las células, se utiliza a una concentración de 5mM, por lo que se obtiene 1 ml de la solución stock y se afora a 100 ml de PBS. Esta solución se esteriliza con una membrana (MILLIPORE, núm. de catálogo GSW P04700) de 0.22 μm y se conserva a 4°C .

Tripsina

Permite que las células se despeguen de las botellas de cultivo.

Pesar 1 mg / ml de solución, se pesan 100 mg (0.1g) y se disuelve en 100 ml de PBS y se esteriliza con membrana de 0.22 μ m (MILLIPORE, núm. de catálogo GSW P04700) y se conserva a 4°C.

Solución de fosfatos glucosada (PSG pH 7.5)

Solución que se utilizó para diluir la sangre de los ratones infectados y separar de tripomastigotes sanguíneos en un gradiente de Ficoll-paque (PHARMACIA BIOTECH, núm. de catálogo 17-0840-02).

Fosfato de sodio monobásico (BAKER, núm. de catálogo 3818-01)	0.78g
Fosfato de sodio dibásico (BAKER, núm. de catálogo 3828-01)	13.48g
Cloruro de sodio (SIGMA, núm. de catálogo S9888)	4.25g
Glucosa (o dextrosa MERCK, núm. catalogo 8342)	5 g

Los reactivos se disuelven en 900 ml de agua destilada, se ajusta el pH y se afora a 1000 ml con agua destilada.

PBS (Fosfato de sodio salino)

Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (BAKER, núm. de catálogo 3818-01) 0.36 g

Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) (BAKER núm. de catálogo 3828-01) 1.10 g

Cloruro de sodio (NaCl) (SIGMA, núm. de catálogo S9888) 9.00 g

Aforar a 1 litro con agua destilada

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

APÉNDICE 2

Soluciones y modo de preparar geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). La separación de las proteínas tanto de los extractos totales de parásitos así como de los antígenos purificados se realizó en una cámara Mini-Protean II Dual Slab Cell (BIORAD núm. de catálogo 165-2944).

Preparación de dos geles

a) Gel separador al 12%

Acrilamida al 30%- Bisacrilamida al 1%	4.0 ml
4X Tris-HCl 1.5 M/SDS 0.4% pH 8.8	2.5 ml
Agua bidestilada	3.5 ml
Persulfato de amonio al 10%	32 μ l
Temed	6.6 μ l

La mezcla se agrega entre los cristales montados, se agrega agua para que el gel polimerice de manera uniforme.

b) Gel concentrador al 5%

Acrilamida al 30%-Bisacrilamida al 0.8%	0.420 ml
4X Tris-HCl 0.5 M/SDS 0.4% pH 6.8 0	0.834 ml
Agua bidestilada	2.034 ml
Persulfato de amonio al 10%	16.6 μ l
Temed	3.2 μ l

Se desecha el agua que estaba sobre el gel separador para vaciar el concentrador, se colocan los peines de 0.75 mm.

c) Preparación de la muestra

La muestra a analizar se prepara con 3 volúmenes del siguiente amortiguador y un volumen de muestra.

Tris-HCl (SIGMA, núm. de catálogo T1503) pH 6.8 0.5 M	
Glicerol (BAKER, núm. de catálogo 2136-02)	20%
SDS (BIORAD, núm. de catálogo 161-0301)	2%
2-B Mercaptoetanol (BIORAD, núm. de catálogo 161-0710)	2%
Azul de bromo fenol (BIORAD, núm. de catálogo 161-0404)	1%

La muestra se hierve durante 5 minutos y se coloca en el gel con micropipetas.

d) Condiciones de corrida

Se coloca el amortiguador de corrida, Tris (SIGMA, núm. de catálogo T1503) 25 mM, Glicina (BIORAD, núm. de catálogo 161-0718) 192 mM y SDS (BIORAD, núm. de catálogo 161-0301) 0.1% a 200 volts durante 1 h aproximadamente.

e) Tinción

Al término de la electroforesis el gel se coloca en una solución de azul de Coomassie durante media hora aproximadamente:

Metanol (BAKER, núm. de catálogo 9070-03) 50%

Ácido acético (BAKER, núm. de catálogo 9507-05) 10%

Azul de Coomasie (BIORAD, núm. de catálogo 161-0400) 0.05%

Agua desionizada 40%

Para aclarar y visualizar las proteínas se prepara la siguiente solución:

Metanol (BAKER, núm. de catálogo 9070-03) 20%

Ácido acético (BAKER, núm. de catálogo 9507-05) 7%

Se realizan varios cambios hasta aclarar totalmente el gel.

APÉNDICE 3

Gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina

La separación de las proteínas purificadas se realiza en una cámara mini-protean II dual slab cell (BIORAD núm. de catálogo 165-2944).

Preparación de un gel

Gel separador al 11%

Acrilamida 30% - bisacrilamida 1% (BIORAD, 161-01-01/161-02-01)	1.15 ml
4x tris-HCl 1.5 M-SDS 0.4% pH 8.8 (SIGMA, núm. de catálogo T1503)	1.125 ml
PBS 1X	0.5 ml
Gelatina 2% ((SIGMA, núm. de catálogo G-0510, 0.02 g/ml)	0.450 ml
Agua bidestilada	1.225 ml
TEMED (BIORAD, núm. de catálogo 161-0800)	0.005 ml
Persulfato de amonio (BIORAD, núm. de catálogo 161-0700, 100 mg/ml)	0.010 ml

Gel concentrador al 4%

Acrilamida 30% - bisacrilamida 1%	0.210 ml
4x Tris-HCl 1.5 M-SDS 0.4% pH 6.8	0.417 ml
Agua bidestilada	1.017 ml
TEMED	0.0016 ml
Persulfato de amonio (100 mg/ml)	0.0083 ml

Preparación de la muestra y condiciones de corrida

Los antígenos puros se mezclaron en una proporción de 1:3 en amortiguador de muestra sin mercaptoetanol y se depositaron en los carriles respectivos de los geles. La migración se realizó a 4°C a 130 V con amortiguador de corrida (Tris 25 Mm, glicina 192 Mm y SDS 0.1%)

Activación de proteasas

Después de la corrida, el gel se incubó durante 1h en solución de tritón X-100 (SIGMA, núm. de catálogo X-100) al 2.5% a temperatura ambiente en agitación, después se incubó con solución de acetatos 1mM a 37°C. Posteriormente se tiñó con solución de negro amido al 0.1% en 10% de ácido acético y 30% de metanol, durante 1h en agitación a temperatura ambiente. La actividad proteolítica se distingue por la presencia de zonas claras en el fondo azul del gel.

APÉNDICE 4

Transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa

La preparación del gel para IET se realiza de la misma manera como se explicó en el apéndice 3, solo que el gel concentrador se forma con un peine para geles preparativos de 0.75 mm. En este caso, el gel se incuba con el amortiguador de transferencia.

El amortiguador de transferencia se prepara con los siguientes reactivos:

Tris 25 mM (SIGMA, núm. de catálogo T1503)	3.0 3g
Glicina 192 mM (BIORAD, núm. de catálogo 161-0718)	14.4g
Metanol 20% (BAKER, núm. de catálogo 9070-03)	200 ml

El papel de nitrocelulosa (PROTAN) de 8.5 x 6 cm, papel filtro y esponjas se humedecen en el amortiguador de transferencia antes de iniciar a la transferencia. Después se coloca en un dispositivo de acrílico en forma de un emparedado: una esponja, un papel filtro, el gel de acrilamida, el papel de nitrocelulosa otro papel filtro y otra esponja. Todo esto debe quedar totalmente centrado en el casete y libre de burbujas para evitar resistencia de las proteínas a transferirse al papel de nitrocelulosa. El gel debe estar hacia el electrodo negativo y el papel de nitrocelulosa hacia el positivo.

Dentro de la cámara Mini Trans-blot (BIORAD núm. de catálogo 170-3930) se coloca una unidad de enfriamiento con agua desionizada congelada previamente. La transferencia se realiza durante 1 h a 100 volts. Para verificar la transferencia, una tira de nitrocelulosa se tiñe con negro amido al 0.1%, isopropanol al 25% y ácido acético al 10% durante 5 minutos, después se lava con solución desteñidora de isopropanol al 25% y ácido acético al 10%.

APÉNDICE 5

Soluciones para ELISA

Amortiguador de carbonatos pH 9.6

Este amortiguador favorece el pegado del antígeno a la placa de ELISA.

Para preparar 100 ml se disuelven en agua bidestilada 0.159 g de Na_2CO_3 (MERCK, núm. de catálogo 900278) y 0.293 g de NaHCO_3 (BAKER, núm. de catálogo 3506) y 0.02 g de azida de sodio (SIGMA, núm. de catálogo S20029).

PBS-Tween 0.05%

Amortiguador de lavado

A un litro de PBS se le agrega 0.5 ml de tween (SIGMA, núm. de catálogo P-1379).

Albúmina al 1%

Se disuelven 1 g de albúmina (SIGMA, núm. de catálogo A7030) en 100 ml de PBS.

Amortiguador de Citrato-Fosfato

Se utiliza para revelar la reacción

Se prepara ácido cítrico 0.1 M (BAKER, núm. de catálogo 018-20) y

Fosfato de Sodio Dibásico 0.2 M (BAKER, núm. de catálogo 3828-01)

Se mezclan 2.43 ml y 2.57 ml aproximadamente de cada uno hasta obtener un pH de 5.0.

Ácido sulfúrico 2.5 N

Es la solución para detener la reacción de ELISA

Para 50 ml se utilizan 3.3 ml de H_2SO_4 y se lleva a 50 ml con agua destilada.

APÉNDICE 6

Geles de poliacrilamida para cámara de electroforesis grande

Preparación de dos geles	al 12%	al 10%
a) Gel separador		
Acrilamida 30%/bisacrilamida 1% (BIORAD, 161-01-01/161-02-01)	18 ml	15 ml
4XTris-HCl-SDS pH 8.8 (SIGMA, núm. de catálogo T1503)	11.350	11.24 ml
Agua bidestilada	15.75 ml	18.37 ml
Persulfato de amonio 10% (BIORAD, núm. de catálogo 161-0700)	150 μ l	150 μ l
Temed (BIORAD, núm. de catálogo 16-0800)	30 μ l	30 μ l
b) Gel concentrador al 5%		
Acrilamida 30%/ bisacrilamida 1%	1.92 m	1.92 ml
4xTris-HCl-SDS pH 6.8	3.75 ml	3.75 ml
Agua bidestilada	9.14 ml	9.14 ml
Persulfato de amonio 10%	75 μ l	75 μ l
Temed	15 μ l	15 μ l

Preparación de la muestra y condiciones de corrida

Los geles grandes se utilizaron para separar proteínas del extracto total del parásito el cual se mezcló en una proporción de 1 volumen con 3 volúmenes de amortiguador (Apéndice 2 inciso c) y se depositaron en el carril preparativo de los geles. La migración se realizó a 4°C a 200 V con amortiguador de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1%) por 3 o 4 horas.

Descripción del aparato de electroelusión Little Blue Tank (ISCO)

Consiste de un tanque azul donde se le agrega el amortiguador (Tris 12.5 mM, glicina 96 mM y SDS 0.05%), trampas para colocar las muestras y anillos pequeños y grandes como accesorios. Las trampas de electroelusión tienen un pozo grande donde se colocan los trozos del gel y uno pequeño donde se concentra la muestra electroeluida, el fondo de cada uno de estos se cubre con una membrana de diálisis (SPECTRUM, núm. de catálogo 13267) la cual se reemplaza en cada electroelusión.

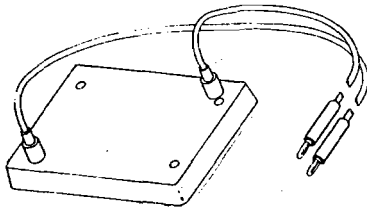
Las membranas se hierven en agua bidestilada por 10 minutos antes de usarlas, se cortan de acuerdo al tamaño de ambos fondos de las trampas y se ajustan con los anillos con el

borde biselado hacia arriba. Después las trampas se sumergen en el tanque azul, el gel que contiene la muestra se coloca en el pozo grande y la proteína va a migrar hacia el pozo chico de la trampa. Finalmente se coloca la tapa de tal manera que se ajuste a los electrodos del tanque azul.

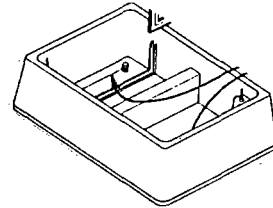
La electroelución se lleva a cabo a 4°C utilizando una fuente de poder (BIORAD) modelo 350 a 5 mA por trampa durante 4 horas.

En los esquemas siguientes se muestra al aparato de electroelución con sus accesorios.

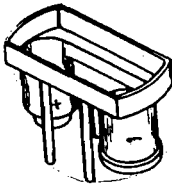
Tapa del tanque con electrodos



tanque azul de electroelución



Trampa de electroelución



Amortiguador de acetatos pH 5

Esta solución se emplea para dializar las muestras obtenidas de la electroelución, eliminar el detergente SDS y así determinar la concentración de proteína de las muestras.

Para preparar 1 L se pesan 1.361 g de acetato de sodio 10 mM (BAKER, núm. de catálogo 3470), 0.5845g de EDTA (2 mM) y 0.8766 g de Na Cl 15 mM (SIGMA, núm. de catálogo S9888).

APÉNDICE 7

Purificación de anticuerpos

Las soluciones empleadas para la purificación de IgGs de conejo fueron las siguientes:

Amortiguador de fosfatos 0.14 M pH 8 (PB)

Se utiliza para lavar la columna de proteína A (GIBCO)

Se prepara a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach donde

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{\text{ácido}}{\text{base}}$$

Para preparar un litro de amortiguador se pesan 17.03 g (Na_2HPO_4 BAKER, núm. de catálogo 3828-01) y 2.75 g ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ BAKER, núm. de catálogo 3818-01).

Glicina 0.2 M pH 2.8

La glicina (BIORAD, núm. de catálogo 161-0718) se utilizó para despegar a los anticuerpos unidos a la columna de proteína A.

Se pesan 2.75 g de glicina para preparar 250 ml. Se ajusta el pH con HCl concentrado.

Tris 1 M pH 8

Esta solución se utilizó para neutralizar el pH de la glicina

Se utilizó la ecuación de Henderson-Hasselbach para preparar 250 ml de solución, se pesaron 22.2 g de tris-base (SIGMA, núm. de catálogo T1503) y 13.25 g de tris-HCl (SIGMA, núm. de catálogo T3253).

PB al 0.02% de azida de sodio

Se utilizó para guardar la columna a 4°C y evitar alguna contaminación.

A 100 ml de PB se le agrega 0.02 g de azida de sodio (SIGMA, núm. de catálogo S2002).

APÉNDICE 8

Preparación de la resina agarosa Affi-Gel 10 (BIORAD, núm. de catálogo 153-6046).

Esta resina ha sido usada para acoplar una gran variedad de materiales en cromatografía de afinidad, inmunoabsorción y otras técnicas.

En este trabajo, se utilizó para acoplar inmunoglobulinas de conejo (IgGs). Según el proveedor, es recomendable acoplar 25-30 mg de proteína por mililitro de resina.

Las soluciones que se utilizaron para el acoplamiento de las IgGs con el gel fueron las siguientes:

Hepes 0.1M pH 8

Solución de acoplamiento, que se utilizó para lavar el gel de agarosa y para dializar las IgGs de conejo.

Se pesaron 23.8 g de hepes (SIGMA, núm. de catálogo H-3375), se disolvió en 900 ml de agua y después de aforó a 1L de agua destilada.

Etanolamina 0.1 M pH 8

Se utilizó para bloquear sitios no ocupados por los anticuerpos en el gel de agarosa.

Se pesaron 3.05 g de etanolamina (MERCK, núm. catálogo 1.008.451000), se disolvió en 400 ml de agua después se aforó a 500 ml con agua destilada.

Glicina 0.1 M pH 2.5

Se utilizó para quitar anticuerpos pegados débilmente.

Se pesaron 1.87 g de glicina (BIORAD, núm. de catálogo 161-0718) y se aforó con agua destilada a 250 ml.