

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**TESIS**

Identificación de antígenos inmunodominantes en distintas fases de la enfermedad de Chagas, utilizando un extracto de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**NOEMI LOZANO HERNÁNDEZ**

MÉXICO, D.F.

2009



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.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Profesor: Saturnino de León Chapa

**VOCAL:** Profesor: Abel Gutiérrez Ramos

**SECRETARIO:** Profesor: Bertha Espinoza Gutiérrez

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Constantino III Roberto López Macías

**2º SUPLENTE:** Profesor: José Cordero Hernández

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Departamento de Inmunología. Laboratorio de Tripanosomiasis.

**ASESOR DEL TEMA:** Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO:** M. en C. Ignacio Martínez Martínez \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:** Noemi Lozano Hernández \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación y por confiar en mí para realizar este trabajo, así como también por sus enseñanzas a lo largo del proyecto.

Al M. en C. Ignacio Martínez Martínez por el apoyo técnico en el cultivo de epimastigotes utilizados en este trabajo y por sus valiosas aportaciones que enriquecieron este proyecto.

A la M. en C. Ma. Luisa Martínez Velasco por su asesoría técnica en el montaje de las metodologías empleadas en este trabajo y por la paciencia que siempre me tuvo.

A la Bióloga Andrea Jiménez Marín por el apoyo en la obtención de tripomastigotes utilizados en este trabajo.

Al Dr. Pedro Reyes del Instituto Nacional de Cardiología por la donación de los sueros de pacientes empleados en este trabajo.

Al Dr. Javier Ambrosio y a la Bióloga Olivia Reynoso de la Facultad de Medicina de la UNAM por el apoyo en la adquisición de las imágenes digitales.

Al CONACYT por el apoyo mediante el proyecto No. 47822Q.

A los sinodales por sus aportaciones al trabajo.

## **DEDICATORIAS**

A mi abuela María por que eres mi ejemplo de ternura y de dureza a la vez, por que solo en ti no importa cuanto te haya cambiado el paso del tiempo, siempre van a permanecer las cosas maravillosas que me diste y que espero me des por 100 años más.

A mi tía Consuelo por criarme, por haber dedicado tu vida a darme amor y cuidados y por darme el privilegio de ser tu hija.

A mi papá Rubén por tu sabia manera de educarme, por quererme tanto y por que lo que he logrado hasta hoy es gracias a ti.

A mi mamá Mary por cumplir todos mis deseos y caprichos, por quererme tanto y porque no hay mejor ejemplo de sacrificio que el que tu hiciste para darme tantas cosas que no tengo como agradecer.

A mi hermano Rubén por compartir tu infancia conmigo, por siempre estar cuando te necesito y por ser mi apoyo incondicional.

A Román por el apoyo, los cuidados, las risas, la protección, el amor, la compañía, las peleas y porque cada día me demuestras la gran persona que eres a pesar de las adversidades.

A Daniela, Gary, Gigio, Beto y Lalo porque se que a pesar del tiempo y la distancia siempre estarán ahí.

A mis compañeros de laboratorio Nacho, Andrea, Ma. Luisa, Deyanira, Rodrigo, Natalia y Wendy porque con ustedes era tan placentero trabajar....., gracias por todos los momentos de risas, de comida, de chisme, y de más y más risas, incluso gracias por los momentos de trabajo.

## INDICE

	Pag.
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 EL PARÁSITO <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
2.1.1 Clasificación taxonómica.....	2
2.1.2 Genética.....	2
2.1.3 Morfología.....	4
2.1.4 Ciclo de vida.....	6
2.2 LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	7
2.2.1 Epidemiología.....	8
2.2.2 Transmisión.....	9
2.2.3 Fisiopatología.....	11
2.2.4 Diagnóstico.....	11
2.2.5 Tratamiento.....	13
3. ANTECEDENTES.....	14
3.1 Diferencias antigénicas en los estadios de <i>T. cruzi</i> .....	14
3.2 Extractos antigénicos de <i>T. cruzi</i> utilizados para el diagnóstico.....	16
3.3 Respuesta inmune en cada fase de la enfermedad de Chagas.....	17
3.4 Antígenos inmunogénicos de <i>T. cruzi</i> expresados en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.....	20
3.5 Factores que propician la evolución de la enfermedad hacia la fase crónica sintomática.....	22
4. JUSTIFICACIÓN.....	23
5. HIPÓTESIS.....	24

6. OBJETIVOS.....	25
6.1 Objetivo General.....	25
6.2 Objetivos particulares.....	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1 Colección de sueros.....	26
7.2 Cultivo de parásitos.....	26
7.3 Preparación de los extractos proteicos.....	27
7.4 Cuantificación de los extractos proteicos.....	28
7.5 Electroforesis.....	28
7.6 Transferencia.....	29
7.7 Revelado por Western-blot.....	29
7.8 Análisis de resultados.....	30
8. RESULTADOS.....	31
8.1 Patrón proteico de los extractos.....	31
8.2 Comparación antigénica entre ETD y EES.....	34
8.3 Evaluación de sueros negativos.....	37
8.4 Reconocimiento antigénico de sueros chagásicos crónicos indeterminados y sintomáticos.....	39
8.5 Evaluación de reacción cruzada.....	43
9. DISCUSIÓN.....	46
9.1 Diferencias entre ETD y EES.....	46
9.2 Reconocimiento inespecífico por sueros negativos.....	47
9.3 Reconocimiento antigénico de sueros indeterminados y sintomáticos...47	
9.4 Diferencias antigénicas entre cepas.....	49
9.5 Reacción cruzada.....	51

10. CONCLUSIONES.....	52
11. BIBLIOGRAFIA.....	53
12. ANEXO I: Soluciones.....	61



# 1. RESUMEN

*Trypanosoma cruzi* es el parásito que causa la enfermedad de Chagas, la cual presenta dos fases, aguda y crónica, esta última se divide en crónica asintomática o indeterminada y crónica sintomática. La respuesta inmune de los pacientes es heterogénea por lo que estudiar diferencias en el reconocimiento antigénico durante las fases de la enfermedad permitiría identificar antígenos importantes de la enfermedad y asociarlos a características y/o sintomatología de cada fase. En este trabajo se identificaron antígenos inmunodominantes reconocidos por sueros de individuos mexicanos de los dos estados clínicos de la fase crónica; para esto, se obtuvieron tripomastigotes de *T. cruzi* de un cultivo de células vero infectadas con las cepas Ninoa y Querétaro (QRO) y se extrajeron las proteínas mediante detergentes y agentes caotrópicos; 100 µg de proteína de cada cepa se separaron por electroforesis y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para realizar Western-blot con 38 sueros de fase crónica indeterminada, 35 de fase crónica sintomática y 13 seronegativos. Se identificaron 30 antígenos, siendo 8 los inmunodominantes para las dos cepas (110, 83, 74, 72, 70, 35, 32 y 26 kDa). Entre los 22 antígenos restantes se identificaron 2 específicos para Ninoa (95 y 80 kDa), uno para QRO (34 kDa), uno para individuos de fase crónica sintomática (62 kDa) y un patrón de reconocimiento para individuos de fase indeterminada en donde las bandas entre 37-68 kDa disminuyen en cantidad e intensidad con respecto al reconocimiento por individuos sintomáticos. También se evaluaron sueros de individuos leishmaniasicos, encontrándose reacción cruzada con 6 antígenos que también son reconocidos por sueros chagásicos (110, 74, 72, 70, 48 y 40 KDa). Aunque hay reacción cruzada, la banda de 62 kDa que se relacionó con individuos sintomáticos no fue reconocida. El hecho de que haya diferente reconocimiento por las cepas usadas nos da una idea de la problemática que existe alrededor del diagnóstico; en cuanto a la identificación de un antígeno de 62 kDa reconocido solo por individuos sintomáticos así como el patrón de reconocimiento observado en individuos indeterminados nos permite diferenciar los dos estados clínicos de la fase crónica, y enfocar la atención hacia la posterior caracterización molecular de antígenos como el de 62 kDa con la finalidad de encontrar alguna aplicación terapéutica.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. EL PARÁSITO *Trypanosoma cruzi*

#### 2.1.1. Clasificación taxonómica

*Trypanosoma cruzi* es un parásito protozoario flagelado y digenético que pertenece al phylum Sarcomastigophora, subphylum Mastigophora, orden Kinetoplastida que comprende organismos flagelares con un cinetoplasto, el cual es un organelo localizado en la mitocondria y contiene una red fibrosa de DNA extracelular. *T. cruzi* está incluido en la sección estercoraria junto con el grupo de tripanosomas de los cuales sus estadios infectivos se desarrollan en el tracto digestivo del vector y contaminan a los hospederos mamíferos a través de las heces. El subgénero *Schizotrypanum* comprende tripanosomas que se multiplican en vertebrados vía estadios intracelulares, por lo tanto, como éste es el caso del parásito su nombre taxonómico es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (WHO, 2002).

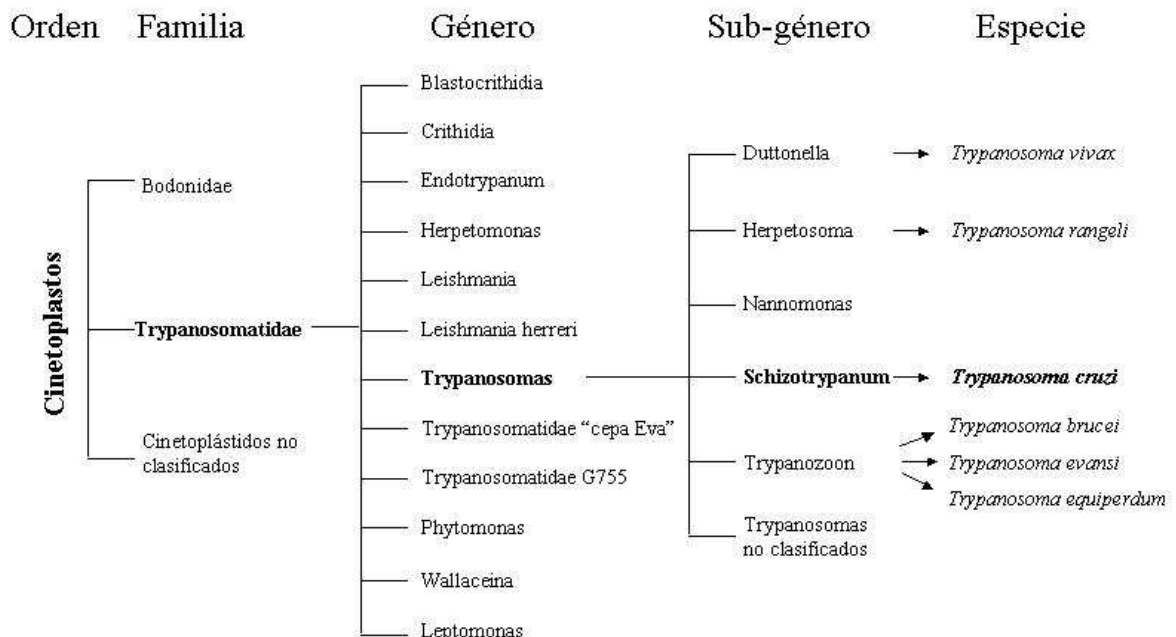


Figura 1. Cuadro taxonómico de *T. cruzi* y otros tripanosomatidos. Tomado de Cevallos y Hernández, 2001.

#### 2.1.2. Genética

*T. cruzi* presenta un pleomorfismo natural, a lo cual se ha atribuido que la enfermedad curse con distinta severidad en los pacientes, esto a llevado a la

necesidad de caracterizar las cepas de *T. cruzi* buscando abarcar aspectos biológicos, bioquímicos y moleculares que permitan agruparlas, o aún mejor, encontrar alguna cepa representativa de algún grupo (López-Olmos *et. al.*, 1998). Para ello se han buscado marcadores genéticos moleculares que permitan correlacionar las diferentes cepas con sus propiedades biológicas, sus características epidemiológicas y las manifestaciones clínicas que producen.

Se han realizado estudios de genética de poblaciones para aislados de *T. cruzi*, uno de estos ha sido el estudio de isoenzimas que permite detectar diferencias entre enzimas con propiedades catalíticas similares pero con distinta estructura molecular, esto reveló la existencia de 3 grupos llamados zimodemos (Z1, Z2 y Z3) en donde se encuentran cepas agrupadas de acuerdo a sus perfiles isoenzimáticos (Miles *et. al.*, 1977). Estudios posteriores revelaron una mayor heterogeneidad, y la conclusión principal de estos estudios fue que la estructura de la población de *T. cruzi* es clonal más que sexual, y por consiguiente, que la actual variabilidad biológica y genética es el resultado de la evolución independiente de líneas clonales (Tibayrenc, 1995).

Estudios con otros marcadores genéticos como los minicírculos de DNA (esquizodemos) y estudios de comportamiento biológico de las cepas en ratones (biodemos), arrojaron resultados que demostraban una gran heterogeneidad entre las cepas (Brenière *et. al.*, 1999). Tomando en cuenta todo esto, se llegó al análisis de las secuencias génicas e intergénicas del RNA ribosómico y se obtuvo un dimorfismo entre las cepas en comparación a la heterogeneidad que presentan los otros análisis, es decir, la amplificación mediante PCR de una región del gen del RNAr 24S alfa, produjo fragmentos de 125 y 110 pares de bases que definían dos grupos principales de cepas, *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Souto *et al.*, 1996). En Sudamérica las cepas pertenecientes al grupo genético *T. cruzi* I se encuentran asociadas con el ciclo de transmisión selvático e infección de marsupiales, y las de *T. cruzi* II están asociadas al ciclo de transmisión doméstico e infección de mamíferos, en contraste, en México se a relacionado a cepas pertenecientes al grupo *T. cruzi* I con casos de infección humana (Bosseno *et. al.*, 2002).

El genoma de *T. cruzi* fue determinado en la cepa CL Brener perteneciente al grupo *T. cruzi* II, se ha calculado que el genoma haploide tiene 55 Mb, está

distribuido en aproximadamente 28 cromosomas y posee alrededor de 12 000 genes codificadores de proteínas (El-Sayed *et al.*, 2005).

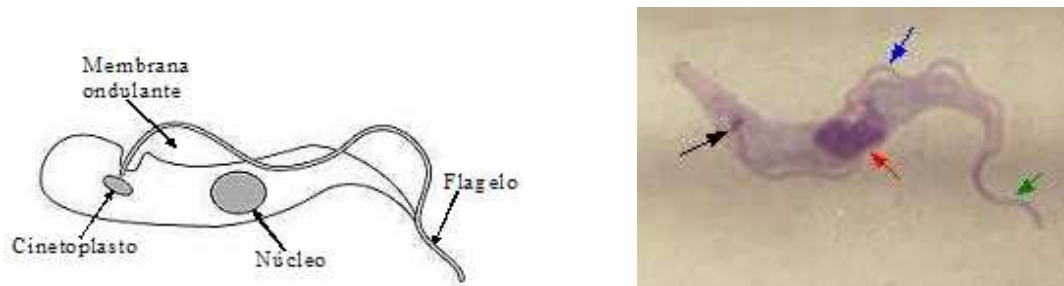
### 2.1.3. Morfología

*T. cruzi* presenta estructuras celulares características de un organismo eucarionte como núcleo, mitocondria, aparato de Golgi, vacuola, citoplasma, ribosoma y retículo endoplásmico, pero además, el grupo de cinetoplastidos, cuenta con estructuras únicas que lo distinguen de otros protozoarios, entre las más sobresalientes se encuentra una red de microtúbulos subpeliculares que se encuentran adosados a la membrana citoplasmática conformando un citoesqueleto periférico muy rígido, esta red de microtúbulos se distribuye a lo largo de la membrana excepto en la zona de donde emerge el flagelo, esta región llamada “saco flagelar” es de gran importancia ya que es el único sitio donde se realiza endocitosis o exocitosis de moléculas. Otra estructura característica es una malla o red de DNA extracelular localizada en un punto específico de la mitocondria. Esta red llamada “cinetoplasto” representa una proporción importante del DNA total celular, que dependiendo de la especie, puede ser desde un 10 hasta un 20% del DNA total de la célula (De Souza, 2002).

Existen 3 formas morfológicas principales de *T. cruzi*: tripomastigote, epimastigote y amastigote, que se diferencian entre sí por la posición del cinetoplasto en relación al núcleo y por la presencia o ausencia de membrana ondulante (Cevallos y Hernández, 2001).

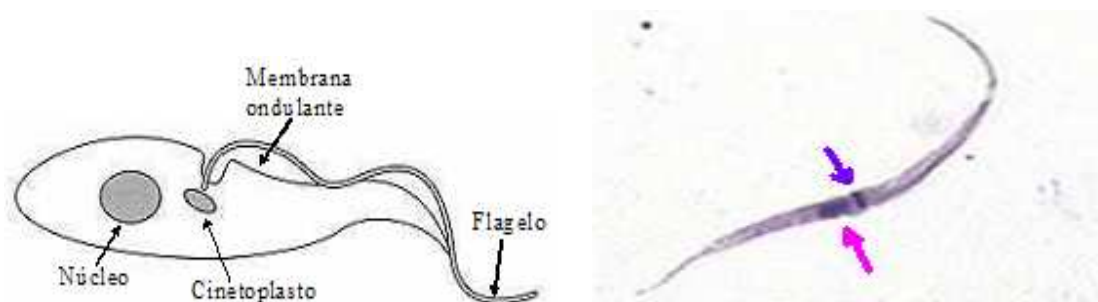
**-Tripomastigote:** Mide aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  de longitud y 2  $\mu\text{m}$  de diámetro; en la figura 2 se puede observar que el cinetoplasto se encuentra localizado posterior al núcleo, usualmente en la porción más posterior del parásito; el flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia adelante a lo largo de todo el cuerpo, formando una membrana ondulante y emergiendo en forma libre en su extremo anterior. Esta forma es infectiva y carece de capacidad replicativa, pero si tiene la capacidad de invadir otras células, durante su ciclo de vida natural se encuentra en el insecto vector y en la sangre de mamíferos infectados (Brenner, 1973). Si se le cultiva experimentalmente se encuentra en la fase estacionaria de

crecimiento de cultivos axénicos del parásito y en la fase líquida de cultivos celulares (De Souza, 2002).



**Figura 2.** Tripomastigote de *T. cruzi*. Representación esquemática (modificado de <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch082.htm>) y microfotografía de luz indicando con flecha negra el cinetoplasto, roja el núcleo, azul la membrana ondulante y verde el flagelo (tomado de [www.ufrgs.br/.../Protozoa/Trypanosomacruzi.htm](http://www.ufrgs.br/.../Protozoa/Trypanosomacruzi.htm)).

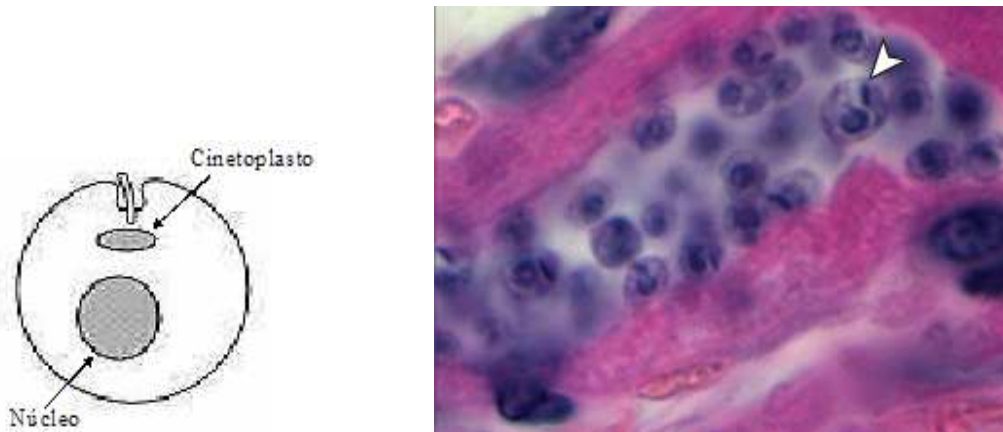
**-Epimastigote:** Tiene forma de huso, mide de 20-40  $\mu\text{m}$  de largo, en la figura 3 se puede observar que el cinetoplasto se encuentra localizado en la parte media del organismo justo por delante del núcleo, el flagelo emerge de la parte media del parásito y forma una membrana ondulante más pequeña que la observada en los tripomastigotes, es un estadio proliferativo que se replica mediante fisión binaria (De Souza, 2002). Durante su ciclo de vida natural se encuentra en el intestino del hospedero vector (Brener, 1973) y si se le cultiva experimentalmente prolifera logarítmicamente en cultivos axénicos (De Souza, 2002). Una característica importante de este estadio es que generalmente es el que se utiliza en los experimentos de laboratorio debido a que se cultiva más fácilmente comparado con los otros estadios y se obtiene un gran número de parásitos (Fernandes *et al.*, 2005).



**Figura 3.** Epimastigote de *T. cruzi*. Representación esquemática (modificado de <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch082.htm>) y microfotografía de luz indicando con flecha rosa el núcleo y con flecha morada el cinetoplasto (tomado de [www.ufrgs.br/.../Protozoa/Trypanosomacruzi.htm](http://www.ufrgs.br/.../Protozoa/Trypanosomacruzi.htm)).

**-Amastigote:** Tiene forma esférica, mide de 2-4  $\mu\text{m}$  y es intracelular. En la figura 4 se puede observar que el cinetoplasto se ve como un cuerpo oscuro cerca

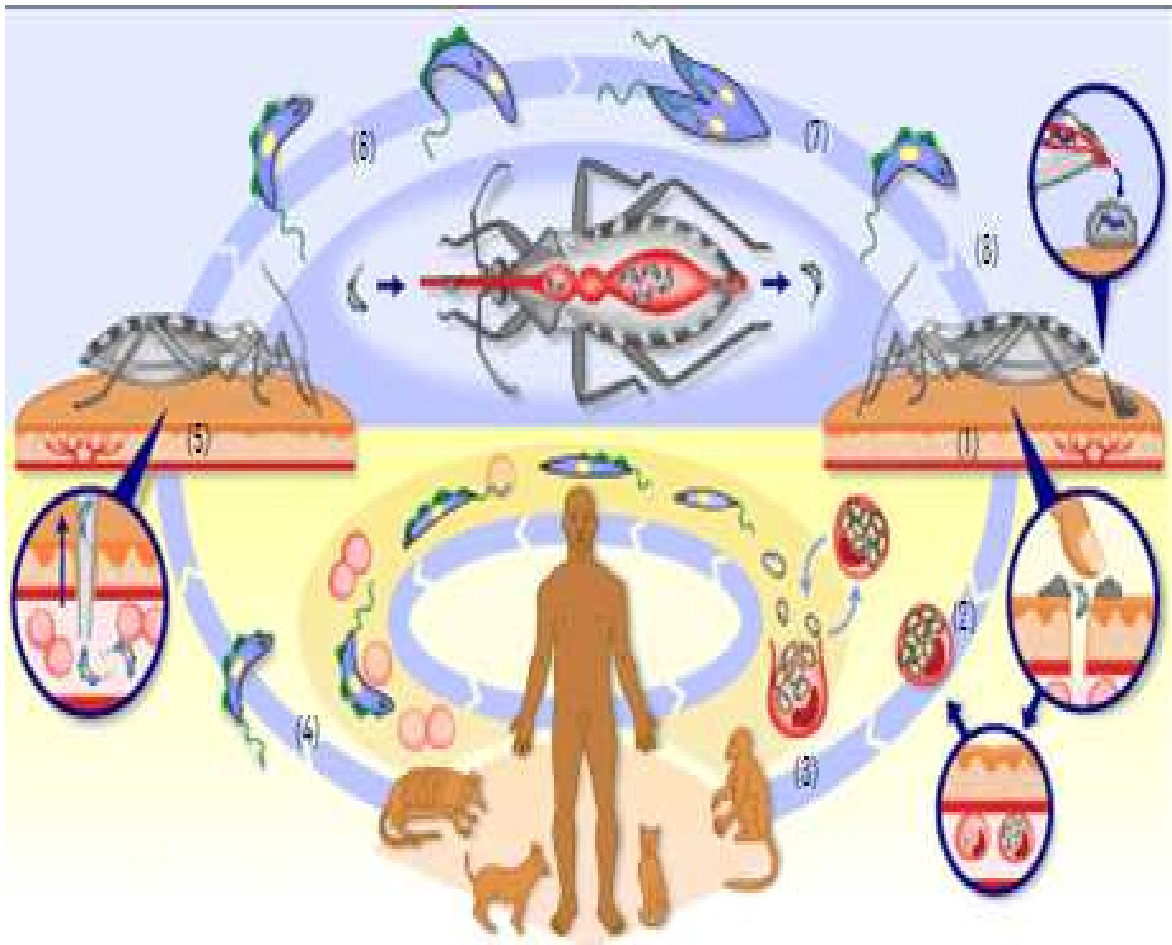
del núcleo, no tiene flagelo libre y carece de membrana ondulante, tiene muy poca movilidad y es capaz de dividirse por fisión binaria (De Souza, 2002). Durante su ciclo de vida natural se encuentra en el interior de células de mamíferos y si se le cultiva experimentalmente se obtiene a partir de la transformación de tripomastigotes en medio de cultivo ácido (Brener, 1973).



**Figura 4.** Amastigote de *T. cruzi*. Representación esquemática del estadio de amastigote de *T. cruzi* (modificado de <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch082.htm>) y microfotografía de luz de un miocito con amastigotes intracelulares indicando el cinetoplasto (tomada de <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/full/298/18/2171/JCR70012F2>).

#### 2.1.4. Ciclo de vida

*T. cruzi* es transmitido al hombre y otros mamíferos por insectos conocidos comúnmente como chinches, las cuales son hemípteros de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae que miden entre 3 y 6 cm dependiendo de la especie (Dias, 1992). Este parásito es un organismo digenético ya que durante su ciclo de vida utiliza dos tipos de hospederos, un vertebrado (mamífero) y otro invertebrado (insecto triatomino), además atraviesa por diversos estadios morfológicos que implican divisiones celulares, cambios morfológicos y procesos de invasión celular, por lo cual su ciclo de vida es complejo. En la figura 5 se ilustra el ciclo de vida de *T. cruzi*.



**Figura 5.** Ciclo de vida de *T. cruzi*. (1) La infección comienza cuando la chinche infectada se alimenta del huésped mamífero y excreta heces con tripomastigotes metacíclicos, de esta forma los parásitos penetran por mucosas o heridas, (2) llegan a torrente sanguíneo e invaden distintos tipos celulares en donde se diferencian en amastigotes, (3) estos amastigotes a su vez, después de varias replicaciones, pasan al estadio de tripomastigotes sanguíneos, que al lisarse la célula salen hacia torrente sanguíneo, (4) una vez ahí pueden ser ingeridos por el vector o bien pueden infectar otras células. (5) Si los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el vector (6) llegan al intestino medio del insecto y se diferencian en epimastigotes, (7) del intestino medio migran hacia la ampolla rectal y se adhieren al intestino para diferenciarse en tripomastigotes metacíclicos, (8) los cuales son eliminados en las deyecciones del insecto continuando de esta manera con el ciclo. Modificado de <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle/htm>

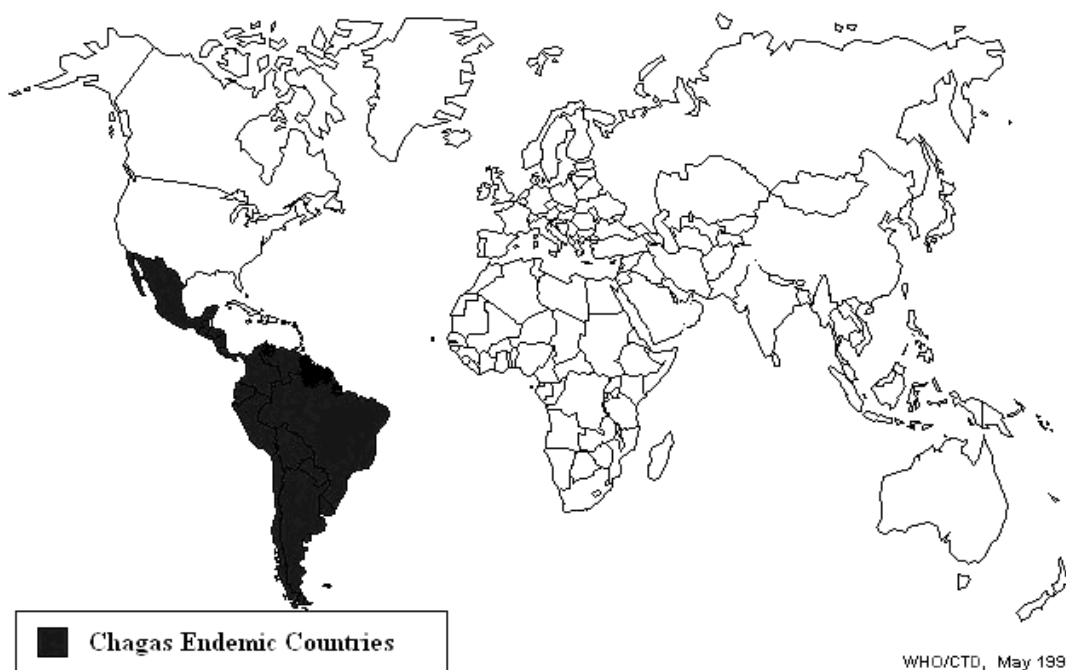
## 2.2. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas es el mayor problema de salud producido por un parásito en América Latina, recibe su nombre en honor al Dr. Carlos Chagas, médico brasileño que describió por primera vez la enfermedad en 1909, así como también al parásito protozoario que la produce, *T. cruzi*; su gravedad radica tanto en la fisiopatología que causa así como en el hecho de que no existe cura para tal

enfermedad cuando ha evolucionado a la fase crónica, ya que se ha visto que no hay buena respuesta al tratamiento en esta fase (WHO, 2002).

### 2.2.1. Epidemiología

La enfermedad de Chagas se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile (Dias, 2002), en la figura 6 se puede observar su distribución por lo que se le considera una zoonosis ampliamente distribuida. Se estima que existen de 16 a 18 millones de personas infectadas y que 100 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad (WHO, 2002).

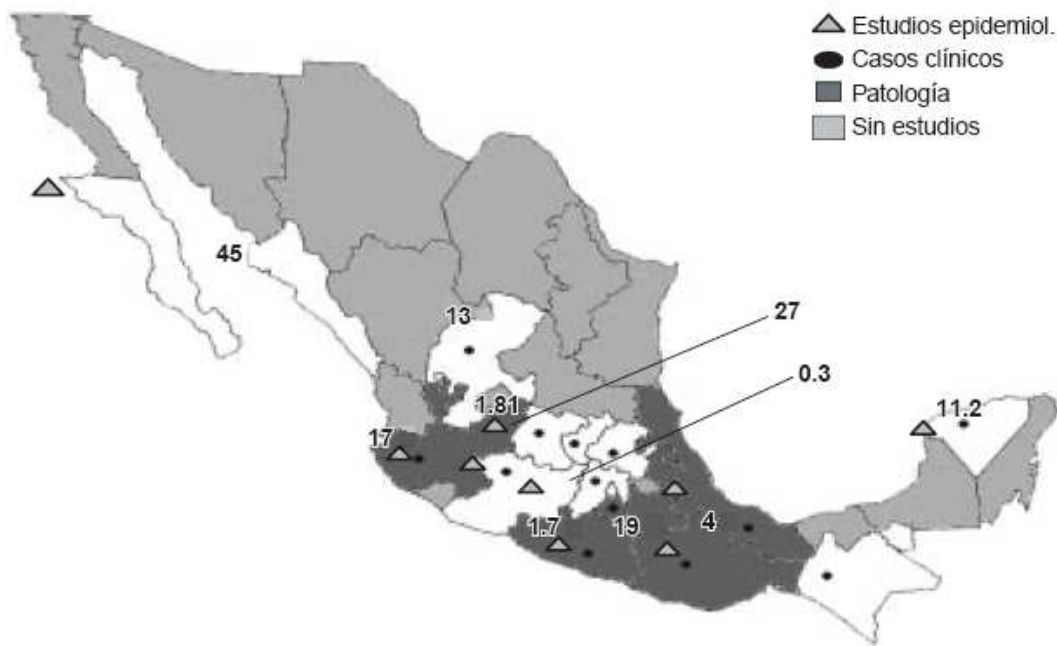


**Figura 6.** Distribución mundial de la enfermedad de Chagas. Modificado de <http://www.who.int/ctd/chagas/geo.htm>

En cuanto a México, se creyó durante mucho tiempo que la enfermedad estaba limitada a la zona sur del país, sin embargo estudios recientes han demostrado que existen casos de alteraciones cardiovasculares relacionadas con la exposición al vector en la zona central del país (Rangel-Flores, *et. al.* 2001).

En relación a la tasa de incidencia de la enfermedad se estima que hay 10, 854 casos nuevos por año, con una seroprevalencia de 540 mil individuos infectados (Schofield y Maudlin, 2000).





**Figura 7.** Prevalencia de la enfermedad de Chagas en México según estudios seroepidemiológicos y de patología. Tomado de Salazar-Schettino, 2003.

Durante mucho tiempo la enfermedad se atribuyó solo a zonas rurales y a individuos de bajos recursos, sin embargo, la migración de áreas endémicas hacia las ciudades, así como también la adaptación del vector a zonas urbanas, muchas veces debido a la búsqueda de alimento, ha permitido una mayor distribución de la enfermedad hacia las ciudades y por ende a personas de cualquier estrato social. En la figura 7 se puede observar como se encuentra distribuida la enfermedad en cuanto a seroepidemiología, patología y casos clínicos reportados a lo largo de la República Mexicana (Salazar-Schettino, 2003).

Existen iniciativas para el control de la enfermedad así como para el control del vector, éstas son llevadas a cabo por la OPS y la OMS en conjunto con los gobiernos de los distintos países implicados, sin embargo, en México no existe ninguna iniciativa por parte del gobierno ni por parte de algún organismo de salud para el control de la enfermedad (Dias, 2002).

### 2.2.2. Transmisión

La transmisión de la infección puede ocurrir de diversas formas, a continuación se mencionan cada una de ellas así como la manera en la cual ocurre la transmisión.

*-Transmisión natural o vectorial:* ocurre a través del vector (Triatmino), cuando la chinche infectada se alimenta de un mamífero sano y deposita sus heces infectadas, posteriormente mediante acción mecánica los parásitos penetran por escoriación de la piel o por mucosas.

*-Por transfusión sanguínea:* esto ocurre al recibir sangre proveniente de donadores infectados, generalmente debido a la falta de análisis en banco de sangre que conlleva a ignorar la infección.

*-Por trasplante de órganos infectados:* existen criterios para poder llevar a cabo un trasplante de órganos infectados por *T. cruzi*, esto depende del tipo de órgano, de si el donador o receptor están infectados, o bien si los dos lo están, de la urgencia con la que es requerido el órgano y de si proviene de un cadáver o de un donante vivo (WHO, 2002). Estas consideraciones están tomadas con la finalidad de evitar la transmisión o la exacerbación de la enfermedad, sin embargo, muchos trasplantes se hacen sin tomar en cuenta estas consideraciones, o aun más, en algunos casos ni siquiera se sabe que el órgano está infectado y es cuando ocurre la transmisión.

*-Por vía transplacentaria:* la infección prenatal por pasaje transplacentario de tripanosomas desde la circulación materna con infección aguda o crónica, es posible, pero no obligada (del 1 al 10%), ya que se ha verificado nacimiento de niños no infectados, aun en presencia de placenta con elevado parasitismo. Sin embargo, también se ha comprobado que madres con baja parasitemia y placenta sin parásitos han tenido neonatos con enfermedad de Chagas (distrofia, edemas, fiebres y parasitemia elevada) (WHO, 2002).

*-Por leche materna:* la posibilidad de infección del hijo a través de la leche materna es posible; sin embargo, su ocurrencia es excepcional y se considera un riesgo remoto. No obstante, se recomienda que el hijo de una mujer que sufre enfermedad de Chagas, no sea amamantado por la madre.

*-Por contaminación accidental en el Laboratorio:* son múltiples los casos conocidos de enfermedad de Chagas por infección accidental en laboratorios, por manipulación de Triatominos y animales infectados, cultivos de *T. cruzi* o material biológico proveniente de enfermos graves.

### 2.2.3. Fisiopatología

A la penetración de *T. cruzi* en el organismo sigue un periodo de incubación que suele durar entre 4 a 14 días, tiempo en el que los parásitos sufren las transformaciones que ya se mencionaron en el ciclo de vida y se introducen en las células, dando lugar a las siguientes fases:

1) La **fase aguda**, en donde en la mayoría de los casos no hay síntomas o signos de entrada del parásito, solo entre 5 y 10% de los pacientes desarrollan la etapa aguda sintomática que puede durar de 4 a 8 semanas a partir de la infección con heces del vector (Triatomino) y cuyo signo principal es el signo de Romaña además de otros síntomas inespecíficos como fiebre, irritabilidad, cefaleas, mialgias y/o adenopatías. Un 10% de los individuos llegan a morir en esta fase, principalmente niños o individuos inmunocomprometidos (WHO, 2002).

2) La fase **crónica**, que a su vez se divide en dos fases, **indeterminada o asintomática y sintomática**. La fase indeterminada se caracteriza por no tener síntomas, desaparecen las manifestaciones clínicas y disminuye la parasitemia en circulación, puede durar varios años y evolucionar a la fase sintomática, sin embargo, solo entre un 30 a 40% de las personas infectadas presenta la fase crónica sintomática en donde se evidencian clínicamente las patologías asociadas a la enfermedad como cardiomegalia, megaesófago y megacolon. Los síntomas de la fase crónica sintomática se pueden presentar de 10 a 20 años después de la infección inicial; cabe mencionar que la evolución de la fase indeterminada hacia la sintomática ocurre sin algún tipo de signo que prevea este cambio (WHO, 2002).

### 2.2.4. Diagnóstico

Hay varias técnicas que se utilizan para el diagnóstico de la enfermedad, estas son técnicas parasitológicas y seroinmunológicas, el uso de estas depende de la fase en la que se sospecha se encuentra la enfermedad. Para la fase aguda es recomendable utilizar técnicas parasitológicas como el hemocultivo, el análisis microscópico de sangre y el xenodiagnóstico, ya que detectan a los parásitos en circulación. En el caso de la fase crónica, para la determinación de seropositivos en bancos de sangre y el diagnóstico de rutina se recomienda utilizar técnicas

seroinmunológicas como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), hemoaglutinación, inmunofluorescencia (IFI) y Western-Blot, en donde generalmente se busca la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en el suero del individuo, sin embargo, estas técnicas pueden presentar resultados variables dependiendo de la cepa, así como también de los distintos estadios del propio parásito por lo que es necesaria una estandarización del método inmunológico que se vaya a utilizar (Sánchez, *et. al.* 2001).

La OMS recomienda 5 métodos para el diagnóstico de la enfermedad: ELISA, IFI, HAI, el uso de antígenos recombinantes y PCR, y reporta que para dar como positivo a un individuo sospechoso de presentar la enfermedad es necesario que de positivo en al menos 2 de las pruebas diagnósticas. Sin embargo, la técnica seroinmunológica de Western-blot se ha usado ampliamente para el diagnóstico ya que nos permite confirmar los resultados de pruebas como la de ELISA e identificar antígenos específicos que son reconocidos por los sueros de los individuos analizados.

Para el diagnóstico se utilizan generalmente extractos totales o semipurificados de epimastigotes de *T. cruzi* debido a que este estadio del parásito es fácil de cultivar y se obtiene gran cantidad de antígeno, sin embargo, hay mucha controversia acerca del óptimo estadio del parásito que debe usarse para el diagnóstico, así como de la cepa ideal, esto debido a que se ha visto que cada estadio expresa distintas moléculas inmunogénicas (De Lima Rivero, *et. al.* 2001), hasta la fecha no se considera a algún estadio como el ideal para usarlo en el diagnóstico, si bien, los epimastigotes son los más utilizados como antígeno en ensayos serológicos convencionales (84%), también se han utilizado tripomastigotes (9%) y amastigotes (7%) (Primavera, 1985).

También hay que considerar las diferencias genéticas entre las cepas infectantes de América Latina. Otro aspecto que siempre ha causado diversidad de opiniones es el método de obtención de los extractos antigénicos usados en el diagnóstico.

Para la obtención del extracto antigénico se pueden utilizar varios métodos y esto va en función del tratamiento que va a recibir el extracto; algunos se extraen mediante un proceso de lisis con detergentes e inhibidores de proteasas, y son utilizados ampliamente para el análisis de proteínas, sin embargo, se ha

observado que el método de extracción del antígeno influye en el reconocimiento antigénico. Los extractos obtenidos mediante el empleo de detergentes y agentes caotrópicos presentan un enriquecimiento en proteínas así como en los epitopes que pueden ser reconocidos por los anticuerpos, esto comparado con un extracto obtenido por sonicación.

### **2.2.5. Tratamiento**

Dos fármacos son los utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, el Nifurtimox y el Benznidazol, anteriormente se creía que solo se obtenían beneficios de estos en la fase aguda o en la infección congénita, pero no en la fase crónica debido a los daños causados por la autoinmunidad. Sin embargo, se ha demostrado que la administración de Benznidazol a escolares en la fase crónica negativiza hasta el 60% de las pruebas serológicas convencionales que antes habían resultado positivas (Sosa-Estani *et al.*, 1998).

Existe cierta controversia con el uso del Benznidazol ya que produce efectos colaterales en la mayoría de los pacientes adultos, pero no se ha puesto en desuso ya que estos efectos suelen desaparecer cuando se interrumpe el tratamiento, además de que se ha visto que los niños tienen una mayor tolerancia al tratamiento, por tal motivo se debe recomendar el tratamiento con Benznidazol a cualquier individuo que resulte con serología positiva ya sea de fase aguda o crónica (OPS, 1999).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Diferencias antigénicas en los estadios de *T. cruzi*

*T. cruzi* es altamente inmunogénico y representa una oferta antigénica amplia para el hospedero vertebrado, con proteínas periféricas localizadas en su membrana celular y cuya presencia e inmunogenicidad pueden variar en los diferentes estadios del ciclo vital del parásito (Andrews, *et. al.*, 1987). Se han identificado glicoproteínas (gp) específicas en estadios del vector como la gp72 en epimastigotes (Harth *et. al.*, 1992); la gp90 en tripomastigotes metacíclicos (Yoshida, *et. al.*, 1990); la gp85 en tripomastigotes sanguíneos (Katzin y Colli, 1983) la cual ha sido implicada en el proceso de interiorización a células de vertebrados y la Ssp-4 en amastigotes (Andrews, *et. al.*, 1987).

La composición glicoproteica de este parásito cambia durante su diferenciación de un estadio a otro (Barros, *et. al.*, 1997, De Andrade, *et. al.*, 1991, Ferguson, 1997). Se han caracterizado en la superficie de epimastigotes y de tripomastigotes metacíclicos glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) y una familia de glicoproteínas altamente O-glicosiladas tipo mucina, las cuales se anclan a la membrana mediante un enlace glicofosfatidilinositol (GPI) (Acosta-Serrano A., 1995). Se demostró que durante la diferenciación del epimastigote a tripomastigote metacíclico el tipo de anclaje de estas mucinas sufre cambios que pueden estar relacionados con el proceso de invasión del tripomastigote metacíclico (Acosta-Serrano, *et. al.* 1995).

Los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* también presentan abundantes mucinas estructuralmente diferentes de las presentes en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos, las cuales están ancladas a la membrana mediante enlaces GPI diferentes (Almeida, *et. al.*, 1994). Las mucinas de tripomastigotes sanguíneos, a diferencia de las presentes en epimastigotes y metacíclicos, son potentes inductores del fragmento  $\alpha$  del factor necrotizante tumoral de macrófagos (TNF- $\alpha$ ) y de IL-12 (Camargo, *et. al.*, 1997), esta diferencia pudiera tener significación inmunológica de utilidad en el diagnóstico de la enfermedad.

Se han realizado varios estudios con los diferentes estadios parasitarios identificando distintas proteínas antigénicas al evaluarlos con sueros chagásicos;

un estudio con epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Ninoa reporta que de 211 individuos en fase crónica indeterminada de los municipios de Jiutepec y Cuernavaca Morelos, 43 (20%) reconocieron al menos una proteína antigénica siendo inmunodominantes dos proteínas, una de 74 KDa y otra de 40 KDa reconocidas por el 86% y el 56% de los 43 individuos serologicamente positivos respectivamente (Rangel-Flores, *et. al.*, 2001).

Otro estudio realizado con epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Querétaro probó sueros de 22 individuos en fase crónica sintomática, en donde se identificaron 12 proteínas antigénicas que fueron reconocidas por la mayoría de los individuos chagásicos, encontrándose entre ellas 7 proteínas inmunodominantes (30, 32, 40, 42, 65, 70 y 83 KDa) (Sánchez, *et. al.*, 2001).

Utilizando un extracto preparado de epimastigotes de 4 diferentes aislados mexicanos de *T. cruzi* (tres aislados de casos humanos Agripina, Fidelfa y Ninoa y uno de triatomino, Cocula), se identificaron proteínas antigénicas con pesos mayores a 81 KDa, de 81, 54, 42 y 26 KDa (Monteón, *et. al.*, 1993), el extracto fue evaluado con sueros de individuos diagnosticados clínica y serologicamente como chagásicos crónicos.

Otra variedad ha sido emplear extractos de homogenado de los estadios parasitarios que incluyó epimastigotes, tripomastigotes y esferomastigotes de *T. cruzi* de las cepas Querétaro, Tequesquitengo y Yucatán, identificándose 5 antígenos inmunodominantes para las 3 cepas (74, 44, 31, 25 y 18 KDa), el extracto fue probado con sueros de México y Argentina con serología positiva para *T. cruzi* (Bucio, *et. al.*, 1999).

En una comparación entre 4 estadios de *T. cruzi* utilizando epimastigotes, tripomastigotes, metacíclicos y amastigotes de la cepa EP probados contra un pool de sueros chagásicos, se encontraron seis antígenos dominantes en los epimastigotes (66/64, 60/57, 53/51, 50/48, 47/45 y 28 kDa); cinco en los metacíclicos (66, 62/58, 53/51, 25 y 6,5 kDa); siete en los tripomastigotes (175, 160, 145, 120, 42/40, 38/36 y 34/32 kDa) y ocho en los amastigotes (95, 80, 75, 66, 60, 58, 53/51 y 47/45 KDa). Solo cuatro de estos antígenos fueron comunes a los cuatro estadios (66/64, 60/57, 50/48 y 47/45 KDa) (De Lima Rivero, *et. al.*, 2001).

Existen muy pocos estudios que se han realizado utilizando tripomastigotes de *T. cruzi*, en uno de ellos se ha reportado el reconocimiento de una banda de 150-160 KDa para individuos que se encuentran en la fase crónica de la enfermedad y una serie de bandas con pesos entre 130 KDa a 200 KDa reconocidas por individuos que se encuentran en la fase aguda de la enfermedad, cabe mencionar que en este estudio se utilizaron antígenos excretados-secretados de tripomastigotes de *T. cruzi* (TESA) de la cepa Y y no un extracto crudo (Umesawa, *et. al.*, 1996).

Utilizando también TESA de la cepas Tulahuen y Brazil, pero en este caso purificados por cromatografía de afinidad, se encontró reconocimiento de 5 proteínas antigénicas para las 2 cepas (220, 170, 120, 85 y 60 KDa) al probarlos contra un pool de sueros chagásicos (Berrizbeitia, *et. al.*, 2006).

Lo anterior prueba la variabilidad en el reconocimiento antigénico debido a las diferencias inmunogénicas entre los estadios de *T. cruzi*. Probablemente nunca se llegue a un consenso sobre el estadio óptimo para utilizar en evaluaciones seroinmunológicas, sin embargo, se ha visto que los tripomastigotes sanguíneos parecen ser más sensitivos y adecuados que los epimastigotes para el estudio de la respuesta inmune humoral en pacientes chagásicos (Cossio, *et. al.*, 1983, Krettli y Brener, 1982), esto debido probablemente a que en el estadio de tripomastigote (estadio infectivo) el parásito podría tener antígenos que aumentaran la sensibilidad y especificidad para pruebas clínicas.

Finalmente la decisión de cual estadio parasitario usar dependerá casi siempre de la finalidad del estudio.

### **3.2. Extractos antigénicos de *T. cruzi* utilizados para el diagnóstico**

El tipo de antígenos convencionalmente usados en pruebas seroinmunológicas para *T. cruzi* son los que provienen de extractos proteicos crudos, y por lo económico y simple de realizar, el método convencionalmente usado para su extracción es la sonicación. Este método consiste en lisar a los parásitos mediante ultrasonidos, lo que produce la destrucción de las membranas. Si bien, este método permite una buena extracción de proteínas del parásito, éstas provienen de una ruptura de la membrana por métodos mecánicos y esto no nos



garantiza que se encuentren completamente disgregadas debido a que varias proteínas se encuentran naturalmente formando complejos con las membranas, con ácidos nucleicos o incluso con otras proteínas.

Un método de extracción de proteínas que permite obtenerlas en completa solubilización y disgregación es el uso de detergentes, esto debido a que solubiliza incluso proteínas hidrofóbicas y previene tanto la agregación como la modificación química post-extracción. Regularmente se prepara un buffer de lisis que contiene un compuesto detergente, agentes caotrópicos, los cuales reducen la estabilidad de la proteínas rompiendo los puentes de hidrógeno, buffer e inhibidores de proteasas, todos ellos en concentraciones adecuadas en solución. Este buffer se agrega a los parásitos y mediante agitación fuerte se disuelven las membranas para obtener el extracto proteico (Rabilloud, 1998).

Al utilizar un extracto de tripomastigotes de *T. cruzi* obtenidos mediante detergentes y agentes caotrópicos se encontró el reconocimiento de una banda antigénica de entre 150-160 KDa con 4 isoformas de puntos isoeléctricos entre 6.2 y 6.7, esto al probar el antígeno contra sueros de individuos en fase crónica de la enfermedad de Chagas (Silva, *et. al.*, 2004).

En otro tipo de estudio en donde se obtuvo el extracto antigénico de *T. cruzi* combinando la sonicación y la lisis por detergente, se encontraron 5 proteínas antigénicas (74, 44, 31, 25 y 18 KDa) además de que se argumentaba haber eliminado la reacción cruzada con *Leishmania mexicana* gracias al método de extracción utilizado, el extracto fue probado con sueros de México y Argentina con serología positiva para *T. cruzi* (Bucio, *et. al.*, 1999).

Así, al utilizar detergentes como método para la extracción de proteínas, teóricamente, se propicia una mayor exposición antigénica, de tal forma que, lo que se espera al enfrentar los extractos con sueros de individuos infectados es que el reconocimiento antigénico sea mayor.

### **3.3 Respuesta inmune en cada fase de la enfermedad de Chagas**

El hecho de que existan diferencias inmunológicas en cada fase de la enfermedad es debido a que ocurren eventos específicos en cada una de ellas, estos tienen que ver con cambios morfológicos y bioquímicos del parásito y

establecimiento e invasión de éste hacia células de tejidos específicos como cardiaco y gástrico. Lo anterior influye en el tipo de respuesta inmune que el hospedero produce para tratar de contrarrestar la infección, y por consiguiente el tipo de moléculas y células del sistema inmune que podemos encontrar activadas en cada una de las fases.

En la fase aguda ocurre la activación de la respuesta inmune innata al momento en que el parásito entra en contacto con el hospedero, la cual desencadena la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y la activación de células NK y macrófagos, además de la activación de células T CD-4<sup>+</sup> y CD-8<sup>+</sup> (Ortiz-Ortiz, *et. al.*, 1976; Hatcher, *et. al.*, 1981), destacándose como los elementos más importantes en controlar la replicación del parásito durante la fase aguda el interferon-(INF) $\gamma$ , los linfocitos T CD-8<sup>+</sup> y los macrófagos.

Lo que ocurre a nivel celular es que los macrófagos junto con las células dendríticas promueven la endocitosis del parásito con la resultante expresión de IL-12 (Teixeira, *et. al.*, 2002). Algunos de los parásitos son eliminados, sin embargo muchos otros evaden la acción enzimática dentro de las vacuolas fagocíticas y se replican dentro de la célula para continuar su ciclo de vida y multiplicarse, de este modo se da la invasión hacia células de otros tejidos (Andrews, 2002).

Durante la fase crónica, *T. cruzi* puede permanecer en estado latente durante décadas como amastigote en células de músculo sin causar un daño significativo a los tejidos (Teixeira, *et. al.*, 2006); esta etapa corresponde a la fase crónica indeterminada en donde se ha visto que anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* que fijan complemento y lisan a tripomastigotes sanguíneos parecen ser las principales moléculas efectoras que aseguran la latencia de la infección (O' Garra y Murphy, 1993).

En cuanto a la fase crónica sintomática se ha visto que, en pacientes con Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CCC) hay una predominancia de linfocitos T CD-8<sup>+</sup> en comparación con los linfocitos T CD-4<sup>+</sup> (Reis *et al.*, 1993). En la forma gastrointestinal hay un detrimento significativo en el número absoluto de linfocitos CD-3<sup>+</sup> y en linfocitos B CD-19<sup>+</sup> (Lemos *et al.*, 1998).

No hay mucha información a cerca de si la respuesta inmune tiene que ver con el hecho de que después de muchos años la infección permanezca latente y

no se presente ningún tipo de sintomatología y que después evolucione hacia una etapa sintomática en donde el daño llega a ser mortal. En torno a este fenómeno se ha encontrado que al evolucionar hacia la fase crónica sintomática, el perfil de la respuesta inmune en la fase crónica indeterminada cambia, habiendo producción de citocinas tipo Th1 como IFN- $\gamma$  con supresión de citocinas tipo Th-2 como IL-4 (Abel, *et. al.*, 2001) y niveles elevados en plasma del factor- $\alpha$  de necrosis tumoral (Ferreira, *et. al.*, 2003).

Además las células mononucleares de sangre periférica tipo CD-4<sup>+</sup> de pacientes con CCC producen más IFN- $\gamma$  y menos IL-10 que los pacientes chágasicos en la fase indeterminada (Gomes, *et. al.*, 2003), lo cual apoya la teoría de que los pacientes con CCC desarrollan una exacerbada respuesta inmune de tipo Th1, si bien estas son diferencias importantes, no se ha comprobado que alguna de estas moléculas o células sea un factor crítico para que se presente la fase crónica sintomática.

Algunas investigaciones apoyan la teoría de que el daño presentado en la fase crónica sintomática viene a consecuencia de la autoinmunidad, esto debido a que se han encontrado depósitos de inmunoglobulinas y moléculas del complemento en tejido del miocardio, y se han aislado linfocitos T CD-8<sup>+</sup> específicos para *T. cruzi* en biopsias de miocardio (Cunha-Neto, *et. al.*, 2006).

En cuanto a la presencia específica de anticuerpos se ha reportado que en la fase aguda de la enfermedad hay producción de IgM y en la fase crónica disminuye la producción de esta, y aumenta la IgG e IgA (Primavera, *et. al.*, 1990), así mismo, se ha asociado la IgG a individuos chágasicos con daño cardíaco y la IgA a individuos chágasicos con daño digestivo.

En un estudio que se enfocó a la expresión de las subclases de la IgG, se encontró que en la enfermedad de Chagas hay presencia de las cuatro subclases de la IgG, lo que sugiere que se induce una respuesta mixta tipo Th1/Th2 en pacientes chágasicos crónicos, además se encontró IgG1 e IgG2 en niveles altos en comparación a la IgG3 e IgG4, siendo esta última la más baja de todas, y también se observó una tendencia de asociación de la IgG2 con el grado de cardiomegalia (Hernández-Becerril, *et. al.*, 2001).

Uno de los objetivos que se ha buscado en estudios como estos es obtener marcadores serológicos que permitan la identificación de la fase aguda, y a la vez

su diferenciación de la fase crónica, algunos de los que se han encontrado son la reactividad de la IgG hacia antígenos recombinantes de SAPA (Afranchino, *et. al.*, 1989) y hacia epitopes Gal  $\alpha$ 1-3 Gal, los cuales son marcadores para identificar la fase aguda (Gazzinelli, *et. al.*, 1988).

Este tipo de estudios se han enfocado en tratar de identificar marcadores para diferenciar la fase aguda de la fase crónica, pero no específicamente entre las dos fases en las cuáles se subdivide la fase crónica, aun más, son desconocidos los factores que hacen que de un 30 a 40% de los individuos que se encuentran en fase crónica indeterminada evolucionen a una fase crónica sintomática (Gazzinelli, *et. al.*, 1991).

### **3.4 Antígenos inmunogénicos de *T. cruzi* expresados en la fase crónica de la enfermedad de Chagas**

El buscar antígenos reconocidos por individuos que se sospecha han adquirido la infección por *T. cruzi* es, inicialmente, un estudio que nos sirve para llevar a cabo un diagnóstico, sin embargo, este tipo de evaluaciones se pueden adecuar a procedimientos experimentales en donde se busca una información más específica; de tal forma que, podemos identificar antígenos reconocidos por una población de estudio dada y manejar a nuestra conveniencia ciertas variables como la cepa del parásito que se va a utilizar y las metodologías experimentales que mejor se adecuen al estudio.

En este sentido, hay estudios que han evaluado muestras de individuos que ya se sabe desarrollan la enfermedad en su etapa crónica y se ha logrado la identificación de antígenos reconocidos por ellos.

En un estudio que se enfocó únicamente a individuos en fase crónica indeterminada evaluados con un extracto de epimastigotes de la cepa Ninoa se encontró el reconocimiento de 13 proteínas antigénicas (22, 31, 35, 40, 45, 53, 63, 70, 74, 84, 91 y 125-131 KDa) siendo 2 las inmunodominantes, la de 74 KDa y la de 40 KDa (Rangel-Flores, *et. al.*, 2001).

Para individuos que se encontraban en la fase crónica sintomática al ser evaluados con un extracto de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Querétaro se identificaron 12 proteínas antigénicas (25, 28, 30, 32, 40, 42, 65, 70, 83, 90, 100 y

>100 KDa) siendo 7 las inmunodominantes (30, 32, 40, 42, 65, 70 y 83 KDa) (Sánchez, *et. al.*, 2001).

Existen varios estudios de este tipo, en donde se evalúan a grupos de individuos de alguno de los dos estados clínicos de la fase crónica, y aunque en los resultados se puede ver que hay proteínas antigénicas reconocidas por los dos grupos de individuos, y otras que son reconocidas específicamente por cada grupo, no se puede hacer una comparación ya que son evaluaciones independientes, además de que se trabajó con cepas diferentes; de hecho hay pocos estudios que evalúan a los dos estados clínicos de la fase crónica conjuntamente y hacen alguna comparación.

Entre estos, hay una evaluación de sueros de individuos en fase crónica indeterminada y sintomática en donde se menciona que ambos grupos reconocen una proteína antigénica de entre 150-160 KDa en un extracto de TESA de la cepa Y, pero algunos reconocen varias proteínas antigénicas de entre 130-200 KDa (Umesawa, *et. al.*, 1996). Sin embargo, no especifica que estos últimos correspondan a individuos indeterminados solo hace referencia a un estudio que se realizó utilizando como antígeno al recombinante SAPA/TS y se encontró que el 37% de los individuos indeterminados reconocían a este antígeno presentando una reactividad de entre 130-200 KDa (Lorca, *et. al.*, 1992).

Otra investigación a cerca de las diferencias antigénicas entre individuos de la fase crónica utilizando antígenos recombinantes reportó que, si bien, esto resulta de gran utilidad para el diagnóstico, su aplicación también es relevante en la evaluación de muestras de fase aguda, ya que se obtiene una mayor sensibilidad que si se utilizan extractos antigénicos crudos; pero ocurre lo contrario con muestras de fase crónica ya que el utilizar extractos antigénicos crudos para la evaluación de estos sueros presenta una mayor sensibilidad que si se usan antígenos recombinantes (Matsumoto, *et. al.*, 1993; Schattschneider, *et. al.*, 1992). Por tal motivo lo mejor para un estudio en donde se busca la identificación de antígenos específicos de fase crónica es utilizar un extracto antigénico crudo.

En cuanto a antígenos que se expresan específicamente en individuos con CCC, se ha encontrado reconocimiento antigénico por IgG humana hacia una proteína de membrana de *T. cruzi*, la B13, y también hacia la principal proteína de corazón, la miosina, cabe señalar que este último reconocimiento es una

reactividad cruzada, una de los eventos por los que se presenta el daño por autoinmunidad (Cunha-Neto, *et. al.*, 1995).

Como se puede ver no hay datos que aborden profundamente los reconocimientos antigénicos que se pueden encontrar entre individuos de los estados clínicos de la fase crónica, y aún menos si se buscan específicamente los que son reconocidos en un extracto crudo del parásito.

### **3.5 Factores que propician la evolución de la enfermedad hacia la fase crónica sintomática**

Los factores que predisponen al hospedero a evolucionar hacia la fase crónica sintomática son aún desconocidos, se ha tratado de buscar alguna molécula o célula de la respuesta inmune que tenga que ver con esto, logrando solamente identificar algunas que son características para cada fase pero sin llegar a comprobar que tengan relación con tal acontecimiento.

Hasta ahora se ha visto que existen dos factores que pueden propiciar la evolución hacia la fase crónica sintomática, estos son, la cepa del parásito y si se presenta re-infección, ya que se argumenta que esto altera el equilibrio hospedero-parásito, cabe mencionar que estos hallazgos han sido encontrados en ratón, pero no se ha realizado el estudio en humanos (Bustamante, *et. al.*, 2003).

## **4. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que la enfermedad de Chagas pasa por una fase en la que los síntomas desaparecen (indeterminada), y después evoluciona a una fase sintomática en donde el daño es irreversible; ocurriendo esto sin algún tipo de signo que prevea este cambio, la identificación de antígenos específicos que puedan ser asociados a la evolución de la enfermedad de un estado asintomático a uno sintomático es una herramienta para poder clasificar a los individuos clínicamente, y posteriormente llevar a cabo estudios moleculares de los antígenos, por medio de los cuales podamos usarlos en beneficio de la prevención y/o control de la enfermedad.

## **5. HIPÓTESIS**

Tomando en cuenta que, cada cepa del parásito presenta diversidad de moléculas antigénicas, así como cada estado clínico de la fase crónica presenta una distinta respuesta inmune, se encontrarán diferentes antígenos reconocidos por individuos de cada uno de los estados clínicos, lo que nos permitirá diferenciarlos entre sí y posteriormente estudiarlos con más profundidad.



## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

Identificar en el estadio de tripomastigote antígenos inmunodominantes reconocidos por sueros de individuos mexicanos en fase crónica de la enfermedad de Chagas.

### **6.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Identificar antígenos de tripomastigote que nos permitan diferenciar claramente los dos estados clínicos de la fase crónica de la enfermedad de Chagas.
- Identificar antígenos característicos de cada cepa utilizada.
- Correlacionar los antígenos reconocidos con la sintomatología de los individuos.

## **7. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 Colección de sueros**

Los sueros utilizados en el estudio proceden del banco de sueros del laboratorio de tripanosomiasis del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IBB) de la UNAM, una parte de ellos fue proporcionada amablemente por el Dr. Pedro Reyes y por el Dr. Víctor Monteón del Instituto Nacional de Cardiología, y otra parte son muestras que se han tomado en el mismo laboratorio de tripanosomiasis a personas que son canalizadas a este sitio para un diagnóstico confirmatorio provenientes de diversas instituciones médicas. Estos sueros pasaron por un proceso de selección, el cual consistió en elegir a los sueros basándose en los datos del expediente médico y en los resultados de la evaluación previa por ELISA y Western-blot con un extracto antigénico de espimastigotes sónicos, de esta forma se seleccionaron solo los sueros que eran positivos para las dos pruebas; cabe señalar que las evaluaciones serológicas fueron realizadas previamente por personal del Laboratorio de Tripanosomiasis del IIB de la UNAM. La muestra total constó de 38 sueros de fase crónica indeterminada y 35 de fase crónica sintomática. Además, se utilizaron 13 sueros con serología negativa provenientes de individuos que no han tenido contacto con el vector y no viajan constantemente a zonas con presencia de la infección y para evaluar la reacción cruzada se utilizaron 30 sueros leishmaniasicos mexicanos.

### **7.2 Cultivo de parásitos**

Para obtener tripomastigotes se mantuvieron cultivos de células Vero (fibroblastos de riñón de mono verde), en medio D-MEM de Gibco (cat. 12100-038) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Estos cultivos se infectaron con tripomastigotes sanguíneos provenientes de sangre de ratones infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* de las cepas Ninoa, aislada de un caso humano agudo en el estado de Oaxaca (Monteón *et al.* 1996) y Querétaro (QRO), aislada a partir del contenido intestinal de un vector en el estado de Querétaro (Bosseno *et al.*, 2002). Los cultivos se mantuvieron resemebrando las

células cada tercer día, esto se realizó agregando medio fresco, para ello se retiró el sobrenadante de los cultivos y se añadió a la caja de cultivo, 4 ml de EDTA 5mM por 12 minutos y posteriormente 2 ml de tripsina 1 mg/ml por 6 minutos para despegar las células, de esta suspensión se resembraron 0.5 ml en una caja nueva a la que se añade 25 ml de medio fresco (López-Olmos, *et. al.*,1999).

Para obtener epimastigotes, estos fueron mantenidos en medio LIT al 10% de SFB (inactivado a 56°C por 30 minutos) y 25 µg/ml de hemina. Los cultivos fueron resembrados semanalmente a una densidad de  $1 \times 10^6$  parásitos/ml de medio. Para producir el extracto se sembraron de 20 a 30 ml de medio fresco con una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml.

### 7.3 Preparación de los extractos proteicos

*Extracto de tripomastigotes obtenido con detergentes y agentes caotrópicos (ETD).* Al cuarto día del cultivo se colectaron los sobrenadantes y se contaron los parásitos. Los sobrenadantes se centrifugaron 10 minutos a  $3,000 \times g$  y el pellet de parásitos se lavó 3 veces con PBS 1X centrifugándolo por 10 min. a  $3,000 \times g$ . Se preparó el amortiguador de lisis con urea 7M, tiourea 2M y CHAPS 4% y se le adicionaron los inhibidores de proteasas (EDTA 0.5 M, PMSF 200 mM, leupeptin 10 mM y pepstatin 1mM); se agregó el amortiguador de lisis en relación 3:1 (p/v) al pellet de parásitos y se agitó en el vortex por 10 minutos. Se mantuvo en hielo por 10 min. realizando agitaciones con el vortex de 3-4 veces, se centrifugó a  $16,000 \times g$  por 15 min a 4°C para eliminar el detritus celular y se obtuvo el sobrenadante (extracto). El extracto fue mantenido a -20°C hasta su uso (Martínez Velasco, 2004).

*Extracto de epimastigotes obtenido con detergentes y agentes caotrópicos (EED).* Los parásitos fueron colectados a las 72 horas de cultivo ( $25-40 \times 10^6$ /ml) y centrifugados a  $6000 \times g$ , la técnica que se siguió para la preparación del extracto fue la misma que para tripomastigotes.

*Extracto de epimastigotes sonicados (EES).* Los parásitos fueron colectados a las 72 horas de cultivo ( $25-40 \times 10^6$ /ml) y centrifugados a  $6000 \times g$ . El pellet celular fue lavado 3 veces con amortiguador de fosfatos estéril (PBS) y centrifugados cada vez en las condiciones descritas. El pellet celular lavado con

PBS fue resuspendido en amortiguador con inhibidores de proteasas (Tris-HCl 10mM pH 8.2; EDTA 12 mM; PMSF 1 mM; leupeptin 0.1 mM; pepstatin 0.001 mM). Los parásitos fueron rotos en un sonicador modelo vibracell (Sonic & Materials, USA) empleando 100 watts con intervalos de 1.5 segundos por 3 minutos, seguido de un minuto de agitación intensa en vortex. Este procedimiento se repitió dos veces más y al final se centrifugo a 8000 x g para eliminar el detritus celular. El extracto obtenido fue mantenido a -20°C hasta su uso (Sánchez, *et. al.*, 2001).

#### **7.4 Cuantificación de los extractos proteicos**

La cuantificación de proteína de los extractos obtenidos con detergentes y agentes caotrópicos se realizó utilizando el kit 2D-Quant de Amersham (cat. 80-6483-56) según indicaciones del proveedor, que permite realizar la determinación de proteínas en presencia de tiourea y detergentes. Se realizó la precipitación de las proteínas para posteriormente detectarlas mediante una reacción con cobre en medio alcalino midiendo el cobre libre que queda en la solución de manera colorimétrica, para lo cual se utilizaron 5 µl de extracto por duplicado. Se preparó una curva estándar con albúmina sérica bovina con concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 µg de proteína, con las lecturas generadas se construyó una curva patrón y se interpoló la lectura obtenida para las muestras.

La concentración de proteína total del extracto sonificado, fue determinada mediante una modificación del método de Lowry, empleando el sistema DC protein assay (BIO-RAD), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La curva patrón y las muestras fueron leídas a 655 nm.

#### **7.5 Electroforesis**

Se prepararon geles de acrilamida con gel separador al 12% y gel concentrador al 4% de 0.75 mm de grosor (Laemmli, 1970). Para observar el patrón de bandeo proteico de los extractos antigénicos se separaron electroforéticamente 10 µg de proteína de extracto de cada cepa, para lo cual el volumen que contenía esta concentración se llevó a un volumen total de 10 µl con

PBS 1X y se le agregó la tercera parte de amortiguador de Laemmli. Para obtener las proteínas utilizadas en el Western-blot comparativo entre EES y ETD y en el Western-blot de sueros dudosos positivos se separaron 100 µg de proteína de ETD por minigel constituida por una mezcla de las dos cepas, Ninoa y QRO, es decir se utilizaron 50 µg de cada cepa, y para el EES se separaron 100 µg de proteína de la cepa QRO, ambos extractos se llevaron a un volumen de 50 µl con PBS 1X y se le agregó la tercera parte de amortiguador de Laemmli. En el caso del Western-blot para evaluar los sueros de individuos chagasicos y leishmaniasicos se separaron electroforéticamente 100 µg de proteína de ETD de cada cepa por separado, para lo cual el volumen que contenía esta concentración se llevó a un volumen total de 50µl con PBS 1X y se le agregó la tercera parte de amortiguador de Laemmli. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se cargaron en el gel, también se cargaron 5µl de marcadores de peso molecular preteñidos de Invitrogen (cat. 10748-010) en el gel que se iba a transferir y 10µl en el gel que no se iba a transferir. Se llenó la cámara de electroforesis con amortiguador de corrida (tris base 0.12 M, glicina 1 M, SDS 0.01 M) y se corrió a 200 V hasta que el frente del corrimiento llegó al final del gel. El gel que no se iba a transferir se tiñó con colorante Azul de Coomasie durante 40 minutos y posteriormente se destiñó con desteñidor de Coomasie (metanol 20%, ácido acético 7%) hasta que se pudieran observar las proteínas.

## **7.6 Transferencia**

Los geles de proteína que se iban a transferir, se sacaron de la cámara de electroforesis y se colocaron en contacto con una membrana de nitrocelulosa marca Schleicher & Schuell de poro 0.2 µm (cat. AW0655-1) mediante un aditamento de la cámara de transferencia de BioRad (cat. 170-3930), este se introdujo en la cámara y se lleno con amortiguador de transferencia frío (tris base 0.025 M, glicina 0.2 M, metanol 20%). Se transfirió a 100 V por 1 hora 10 minutos en constante agitación.

## **7.7 Revelado por Western-blot**

Se cortaron tiras de las membranas de nitrocelulosa de 3 mm de grosor, las cuales contenían aproximadamente 3 µg de proteína cada una y se bloquearon toda una noche con leche descremada al 10% en PBS. Se incubaron las tiras con muestras de suero de pacientes de fase crónica tanto indeterminada como asintomática diluidas 1:500 en leche descremada al 10% en PBS 1X durante 2 horas. Se lavaron 3 veces por 10 minutos con 1 ml de PBS-Tween 20 al 0.1%. Se agregó el segundo anticuerpo IgG anti-humano acoplado a peroxidasa de Zymed (cat. 92886) a una dilución 1:10,000 en PBS-Tween 20 al 0.1%. Se incubaron 2 horas a temperatura ambiente en agitación suave. Se lavaron 3 veces por 10 minutos con PBS-Tween 20 al 0.1%. Se reveló agregando el sustrato 3,3-diaminobencidina de SIGMA-ALDRICH (cat. D5637-5G) en una concentración de 0.5 mg/ml en PBS y una concentración 0.02% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se paró con agua (Sánchez, *et. al.*, 2001).

## **7.8 Análisis de resultados**

Para determinar el peso molecular de las proteínas identificadas en el estudio se construyeron gráficas de PM vs. R<sub>f</sub> con los datos de los marcadores de peso molecular, posteriormente se extrapolaron los valores de R<sub>f</sub> de cada banda de proteína antigénica para obtener su peso molecular.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Patrón proteico de los extractos

Se obtuvieron extractos antigénicos de dos cepas de tripomastigotes de *T. cruzi* mediante detergentes y agentes caotrópicos; debido a que el cultivo de tripomastigotes no proporciona un gran número de parásitos fue necesario trabajar con 4 extractos obtenidos en días diferentes ya que la concentración de proteína de cada extracto no alcanzaba para realizar todos los experimentos. Por tal motivo se realizó un análisis del patrón proteico de cada extracto con la finalidad de compararlos y eliminar alguna posibilidad de que hubiera diferencias entre ellos que afectaran los experimentos posteriores (Tabla 1).

En la Tabla 1, se observa que no hubo diferencias entre los 4 ETD preparados en días diferentes, las proteínas de bajo peso molecular que no están presentes en dos de los cuatro extractos es porque el gel ya no corrió hasta esa distancia. También se puede apreciar que el número de parásitos que se obtiene de la cepa QRO es menor que el de Ninoa, aún utilizando el mismo volumen de cultivo, esto posiblemente se debe a características biológicas propias de la cepa. Al separarlos mediante electroforesis se observó un patrón idéntico en todos los extractos, identificándose 25 proteínas con pesos moleculares de entre 110 y 17 KDa, las cuales son compartidas entre las cepas, es decir, ninguna fue específica para alguna (Figura 8).

Debido a que durante el proyecto se utilizarían tripomastigotes por ser el estadio infeccioso, y además extraídos con detergentes, lo cual teóricamente proporciona una mejor calidad del extracto en cuanto a naturaleza proteica se refiere, fue necesario comparar entre ellos los extractos ETD, EES y EED.

En la Figura 8, se muestran los 3 extractos proteicos (ETD, EED y EES) separados mediante electroforesis, y para cada uno se muestran las dos cepas utilizadas en el estudio, Ninoa y QRO. La imagen que se muestra del ETD es representativa de los cuatro extractos que se prepararon en fechas diferentes ya que el patrón de bandeo proteico fue idéntico en los cuatro.

Se puede apreciar a simple vista que hay diferencias entre el EES y los extractos con detergentes (ETD y EED), las bandas presentes entre 180 y 64 KDa

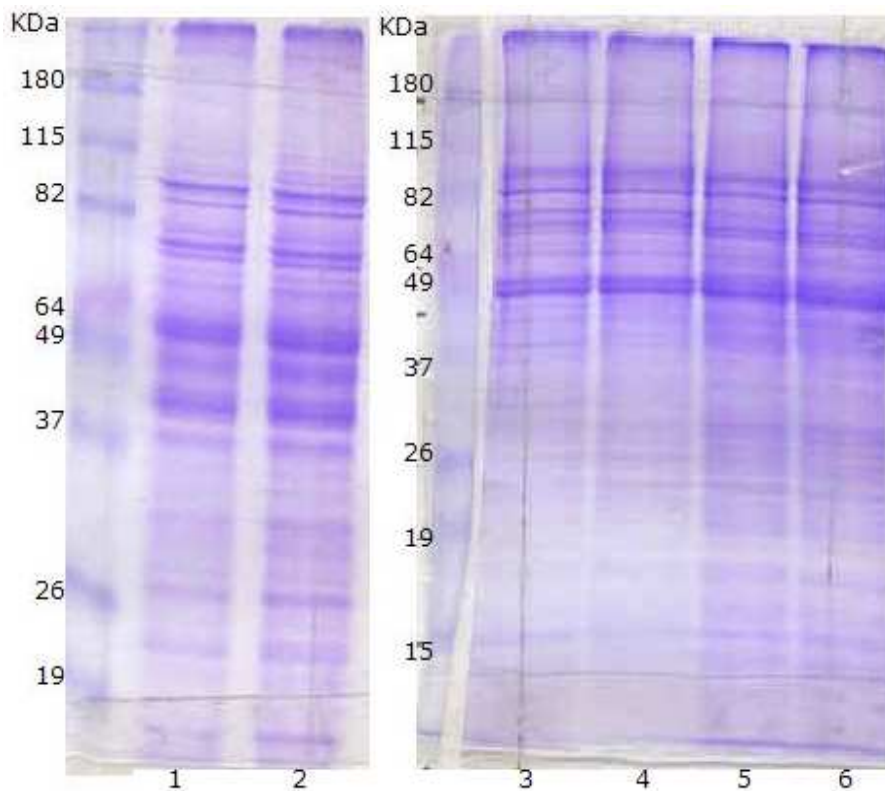
son parecidas, pero de 64 KDa hacia abajo el patrón de proteínas cambia observándose en el EES cinco bandas muy intensas (60, 48, 44, 40 y 37 KDa) de las cuales las de 60 y 37 KDa solo están presentes en el EES y las de 48, 44 y 40 KDa aunque se encuentran en los tres extractos, se observan menos intensas en el EED y el ETD.

**Tabla 1. Análisis de ETD de Ninoa y Querétaro**

Fecha	04-09-07		22-09-07		15-12-07		15-03-08	
Cepa	Ninoa	QRO	Ninoa	QRO	Ninoa	QRO	Ninoa	QRO
Volumen de cultivo (ml)	150	150	150	150	50	50	200	200
No. de parásitos (x 10 <sup>6</sup> )	169	66	332.5	88.5	54.52	44.16	352.5	92.5
Concentración (µg/µl)	3.55	5.34	11.2	6	7.32	5.23	9.1	8.39
Volumen (µl)	92	46	75	36.3	45	26	84	57
Proteína (µg)	326.6	245.64	840	217.8	329.4	135.98	764.4	478.23
No. de proteínas	24	24	27	27	28	28	23	23
Proteínas (KDa)								
110	√	√	√	√	√	√	√	√
95	√	√	√	√	√	√	√	√
90	√	√	√	√	√	√	√	√
85	√	√	√	√	√	√	√	√
74	√	√	√	√	√	√	√	√
72	√	√	√	√	√	√	√	√
70	√	√	√	√	√	√	√	√
66	√	√	√	√	√	√	√	√
62	√	√	√	√	√	√	√	√
59	√	√	√	√	√	√	√	√
50	√	√	√	√	√	√	√	√
49	√	√	√	√	√	√	√	√
48	√	√	√	√	√	√	√	√
46	√	√	√	√	√	√	√	√
44	√	√	√	√	√	√	√	√
40	√	√	√	√	√	√	√	√
35	√	√	√	√	√	√	√	√
34	√	√	√	√	√	√	√	√
30	√	√	√	√	√	√	√	√
28	√	√	√	√	√	√	√	√
26	√	√	√	√	√	√	√	√
24	√	√	√	√	√	√	√	√
22	√	√	√	√	√	√	--	--
17	--	--	√	√	√	√	--	--
16	--	--	√	√	√	√	--	--
15	--	--	√	√	√	√	--	--
<15	--	--	--	--	√	√	--	--

(√)-Presencia  
 (--) -Ausencia





**Figura 8. Patrón proteico de los extractos.** EES (1 y 2), EED (3 y 4) y ETD (5 y 6), en todos se muestran las 2 cepas, Ninoa (1,3 y 5) y QRO (2, 4 y 6). En todos los carriles se cargaron 10 µg de proteína en un gel de acrilamida al 12% en condiciones reductoras y teñidos con Azul de Coomassie.

En cuanto a los dos extractos con detergentes (EED y ETD) no se observan diferencias a simple vista en el patrón de bandeo proteico, solamente en el EED las proteínas de pesos bajos tienen menor intensidad comparadas a las de el ETD pero son las mismas en cantidad ya que se observan 13 bandas de pesos menores a 37 KDa en cada extracto (Figura 8).

Realizando un análisis de las proteínas presentes en los 3 extractos se puede observar en la Tabla 2 que las diferencias en cuanto a presencia y/o ausencia de proteínas se dan entre los extractos con detergentes y el EES. En el caso del EES las proteínas que no aparecen de pesos menores a 15 es porque el gel ya no corrió a esa distancia. No hubo diferencia entre cepas en ninguno de los 3 extractos.

**Tabla 2. Análisis de extractos de *T. cruzi* en diferentes estadios y condiciones**

Proteínas (KDa)	Epimastigotes sonicados		Epimastigotes con detergentes		Tripomastigotes con detergentes	
	Ninoa	QRO	Ninoa	QRO	Ninoa	QRO
110	√	√	√	√	√	√
95	√	√	√	√	√	√
90	√	√	√	√	√	√
85	√	√	√	√	√	√
74	√	√	√	√	√	√
72	√	√	√	√	√	√
70	√	√	√	√	√	√
66	√	√	√	√	√	√
64	--	--	√	√	√	√
62	√	√	√	√	√	√
61	--	--	√	√	√	√
60	√	√	--	--	--	--
59	√	√	√	√	√	√
50	√	√	√	√	√	√
49	√	√	√	√	√	√
48	√	√	√	√	√	√
46	√	√	√	√	√	√
44	√	√	√	√	√	√
40	√	√	√	√	√	√
37	√	√	--	--	--	--
35	√	√	√	√	√	√
34	√	√	√	√	√	√
30	√	√	√	√	√	√
28	√	√	√	√	√	√
26	√	√	√	√	√	√
24	√	√	√	√	√	√
22	--	--	√	√	√	√
17	√	√	√	√	√	√
16	--	--	√	√	√	√
15	--	--	√	√	√	√
<15	--	--	√	√	√	√
Total de Proteínas	25	25	29	29	29	29

(√)-Presencia

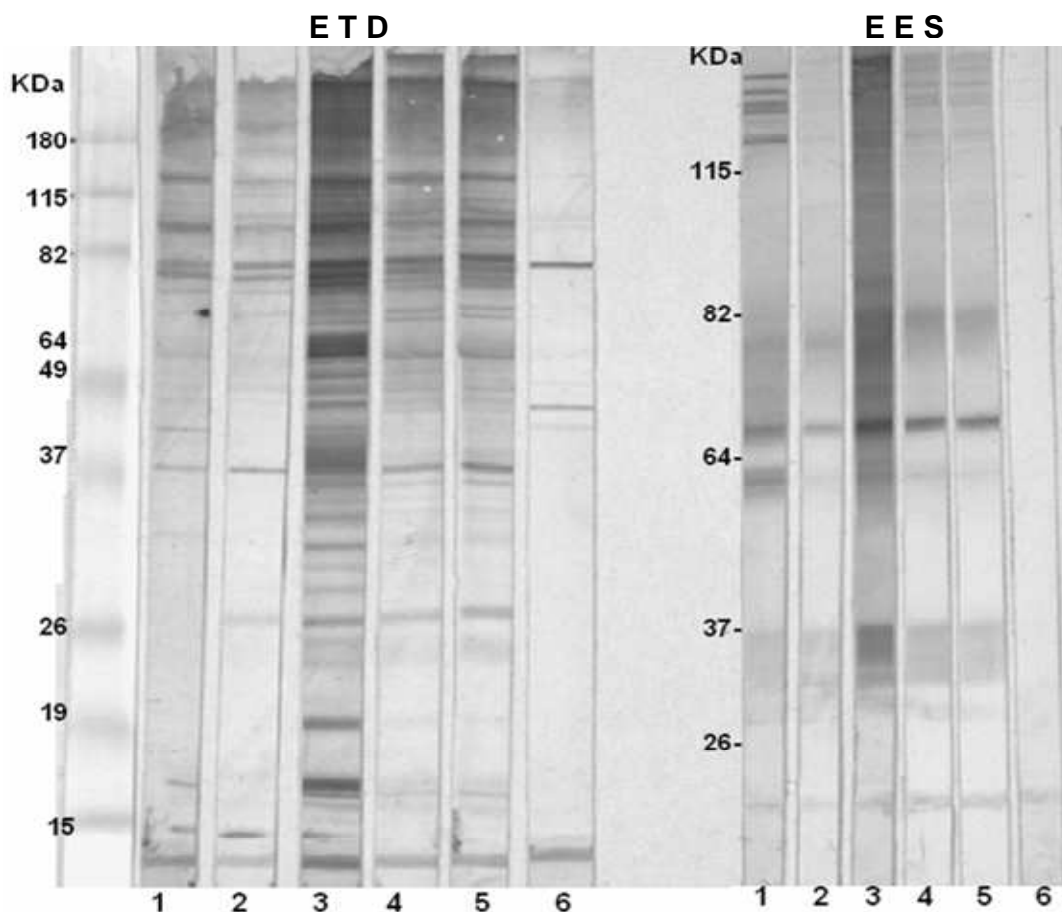
(--)-Ausencia

## 8.2 Comparación antigénica entre ETD y EES

Debido a que la mayoría de las investigaciones se han realizado con antígenos extraídos del estadio de epimastigote por medio de sonicación, y que en los extractos preparados solo se observaron diferencias entre el sonificado y los extraídos con detergentes, se realizó una comparación entre el extracto que se

utilizaría para este estudio (ETD) y el EES evaluando algunos sueros chagásicos mediante Western-blot (Figura 9).

Cabe mencionar que para el ETD se utilizó una mezcla de las cepas Ninoa y QRO ya que durante el proyecto se iba a trabajar con estas dos cepas, pero para el EES solo se utilizó la cepa QRO debido a que en estas condiciones se realiza el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en el Laboratorio de Tripanosomiasis del IIB de la UNAM.



**Figura 9. Western-blot utilizando antígenos de *T. cruzi* en diferentes estadios y extraídos por métodos diferentes.** Para el ETD se utilizó una mezcla de las dos cepas Ninoa-QRO, de los carriles 1-5 sueros chagásicos y en el carril 6 suero dudoso positivo\*; para el EES se utilizó la cepa QRO, de los carriles 1-5 sueros chagásicos y en el carril 6 suero dudoso positivo\*. Se utilizaron los mismos sueros para los dos extractos. Aproximadamente 3 µg de proteína por tira.

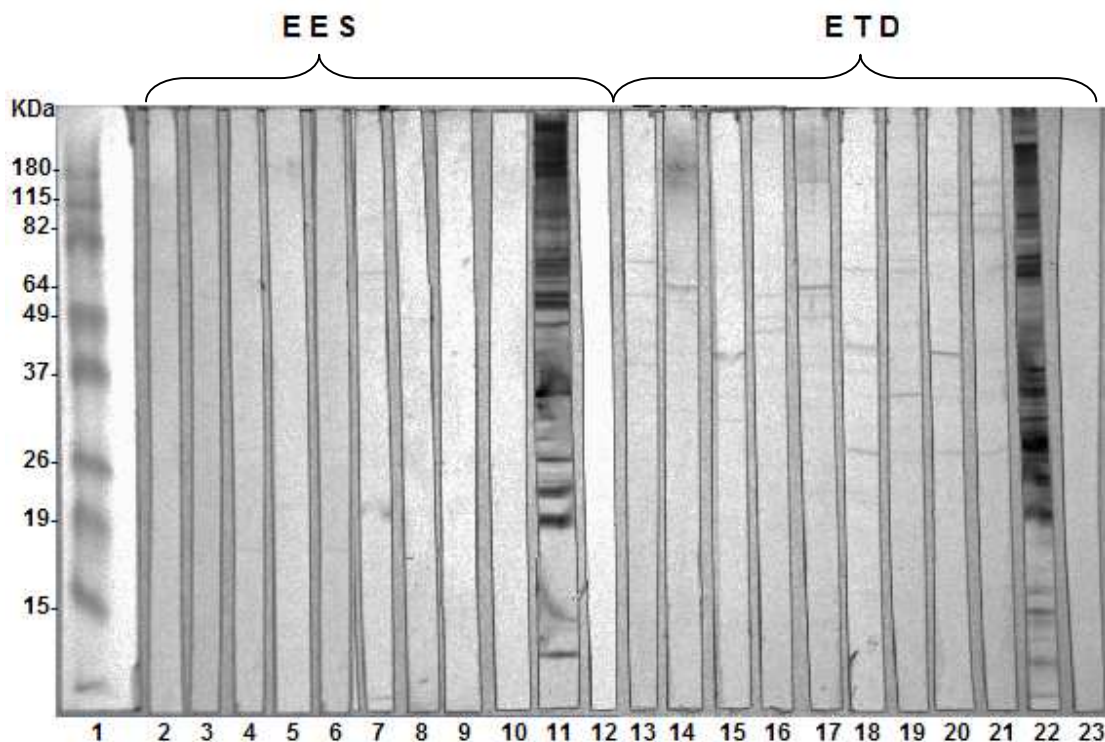
\*Este suero fue considerado como dudoso positivo ya que, en evaluaciones previas, dio positivo a ELISA pero negativo en Western-blot con antígeno de epimastigotes sonicados.

En la Figura 9, podemos ver que el reconocimiento antigénico es mayor al utilizar ETD que al usar EES ya que se observan hasta 30 antígenos reconocidos con ETD mientras que con EES solo se observan 12 antígenos. Además, el

reconocimiento antigénico con ETD es muy definido mientras que con EES se observa un barrido en una amplia zona de la tira de membrana pero no se definen bandas antigénicas.

En cuanto al suero dudoso positivo, que en evaluaciones previas presentó ELISA positivo pero Western-blot negativo con EES, al probarlo con ETD si presentó reactividad. Debido a este resultado se realizó un experimento en el cual se evaluaron otros sueros dudosos positivos tanto con EES como con ETD.

En la figura 10, se puede observar que los sueros con resultados dudosos son negativos al evaluarlos con EES y al probarlos con ETD si presentan reactividad, aún cuando las bandas antigénicas son tenues se aprecian diferencias entre los dos extractos ya que con el ETD hay reconocimiento a varias bandas antigénicas y con el EES no hay reconocimiento antigénico. Cabe mencionar que en este experimento no se evaluaron las cepas por separado sino que se hizo una mezcla de las cepas Ninoa-QRO para el ETD ya que solo se quería comparar el estadio y tipo de extracto contra EES de la cepa QRO que es como se utiliza para realizar el diagnóstico en el IIB de la UNAM.



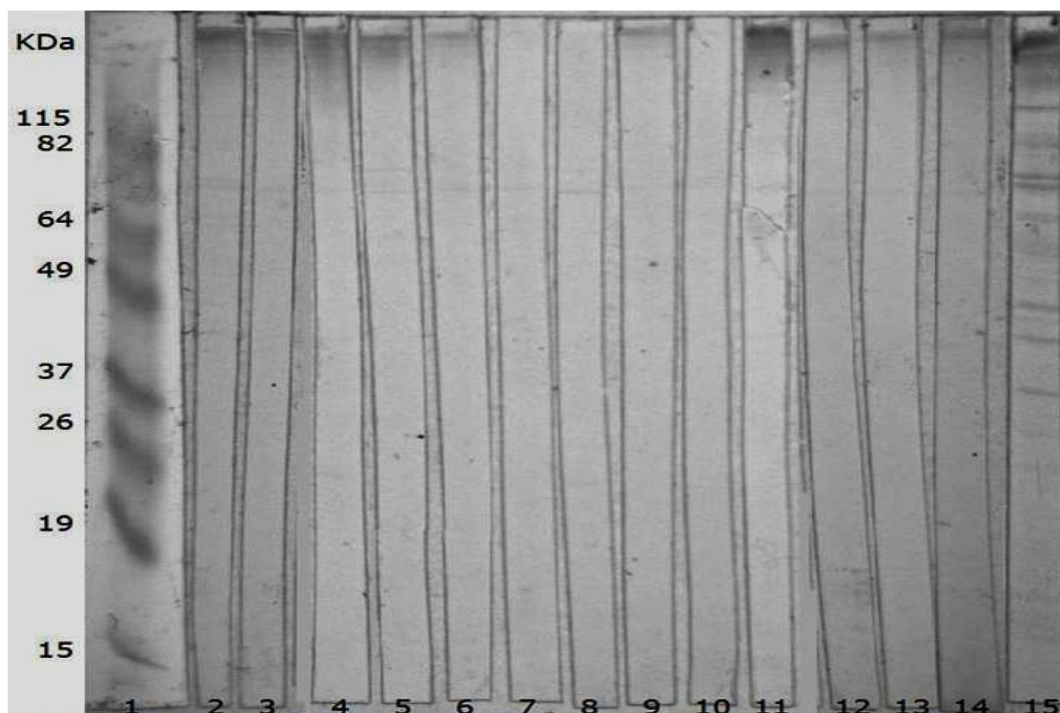
**Figura 10. Western-blot de sueros dudosos positivos con EES y ETD.** En el carril 1 MPM; del carril 2-12 EES de la cepa QRO; del carril 13-23 ETD de una mezcla de las cepas Ninoa-QRO. En los carriles 2-10 y 13-21 sueros dudosos positivos, en los carriles 11 y 22 un suero de individuo chagásico en fase sintomática usado como control positivo y en los carriles 12 y 23 un suero de individuo sano usado como control negativo.

### 8.3 Evaluación de sueros negativos

Ya que el ETD se utilizaría a lo largo del proyecto, se realizó una evaluación de sueros negativos para descartar algún reconocimiento inespecífico en este extracto. Se utilizaron 13 sueros humanos negativos a *T. cruzi*. Estos sueros provenían de individuos que reportan no haber tenido contacto con el vector, ni viajar frecuentemente a zonas endémicas, además de que fueron evaluados previamente por personal del laboratorio de Tripanosomiasis del IIB de la UNAM mediante ELISA y Western-blot con EES de *T. cruzi* y resultaron ser seronegativos.

Para esta evaluación se utilizó una mezcla de las dos cepas (Ninoa y QRO), ya que no había interés en identificar alguna proteína específica de cada cepa, sino, solamente se quería descartar algún reconocimiento inespecífico.

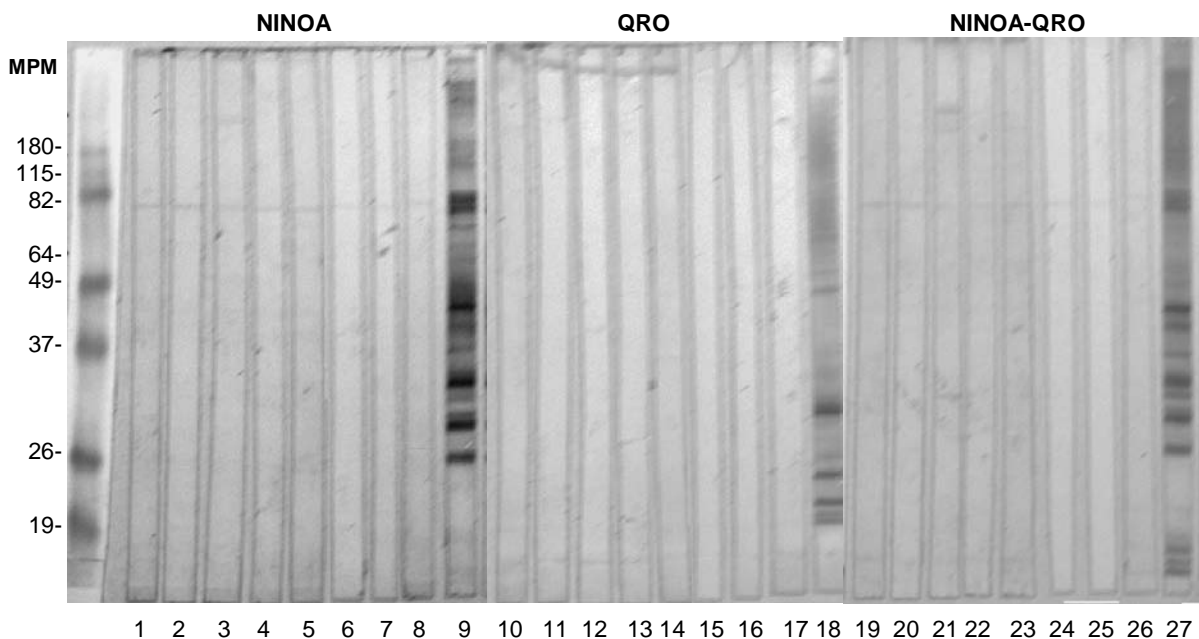
En la Figura 11, se observa que todos los sueros negativos reconocen una banda muy tenue casi imperceptible de 72 KDa y el suero chagásico de un individuo en fase indeterminada usado como control positivo reconoció 10 proteínas antigénicas de pesos entre 28 y 115 KDa.



**Figura 11. Western-blot de sueros negativos con ETD con mezcla de las cepas Ninoa-QRO.** El carril 1 corresponde a los marcadores de peso molecular, del carril 2-14 son sueros humanos negativos y el carril 15 al suero de un individuo en fase indeterminada usado como control positivo.

Debido al reconocimiento inespecífico se realizó un Western-blot con las 2 cepas de ETD, tanto mezcladas como individuales, para descartar que la banda tenue de 72 KDa fuera específica de la cepa Ninoa ya que estos mismos sueros evaluados con EES de la cepa QRO no reconocen ninguna proteína, así mismo se evaluó el extracto sin suero de pacientes solo con el conjugado anti-IgG humana acoplada a peroxidada de rábano (HRP) usado como 2° anticuerpo para descartar que el reconocimiento inespecífico fuera debido al 2° anticuerpo.

En la figura 12, se puede observar que la banda de 72 KDa es reconocida en la cepa Ninoa y en la mezcla de cepas Ninoa-QRO, pero no en la cepa QRO, además este reconocimiento es debido al 2° anticuerpo ya que cuando se evaluó el extracto sin suero, solo con el 2° anticuerpo hubo reconocimiento de esta proteína. Por lo tanto esta banda se excluyó al momento de realizar el análisis de los sueros chagásicos evaluados, solo para la cepa Ninoa y siempre y cuando la banda fuera de la misma intensidad, ya que si era más intensa si se consideraría como un antígeno reconocido y no como inespecífico.



**Figura 12. Western-blot de sueros negativos con ETD de cepas Ninoa y QRO por separado y mezcladas.** Cepa Ninoa (1-9), cepa QRO (10-18), mezcla cepas Ninoa-QRO (19-27). Sueros negativos en los carriles 1-6, 10-15 y 19-24. Sin suero, solo con el 2° anticuerpo en los carriles 7-8, 16-17 y 25-26. Sueros de individuos chagasicos en fase sintomática en los carriles 9, 18 y 27.

#### **8.4 Reconocimiento antigénico de sueros chagásicos crónicos indeterminados y sintomáticos**

La población de estudio constó de 38 sueros de individuos en fase crónica indeterminada (35 provenientes del Banco de Sangre del INC, 2 del Hospital de Infectología del CMN La Raza y 1 del HR "Gral. Ignacio Zaragoza") y 35 sueros de individuos en fase crónica sintomática (30 pacientes del INC, 3 del Hospital General de México y 2 del Hospital de Infectología del CMN La Raza) los cuáles previamente habían sido confirmados con serología positiva por 2 pruebas diagnósticas, ELISA y Western-blot con EES.

Todos los sueros evaluados de los dos estados clínicos presentaron reactividad al ETD de ambas cepas (Ninoa y QRO) de *T. cruzi* (Figuras 13 y 14). Se identificaron 30 proteínas antigénicas (Tabla 3). Siendo 8 las inmunodominantes de pesos de 110, 83, 74, 72, 70, 35, 32 y 26 KDa para el ETD de ambas cepas (Tabla 3). Particularmente en el caso del antígeno de 72 kDa sólo se consideró como un antígeno reconocido cuando la intensidad perceptible era mayor a la que se presentó al evaluar los sueros negativos, ya que como se menciono anteriormente, hubo un reconocimiento de una banda muy tenue por los sueros negativos que se consideró como inespecífica.

En cuanto a las diferencias entre los dos estados clínicos evaluados se identificó una proteína antigénica específica para sueros de individuos sintomáticos de 62 KDa reconocida en las dos cepas, la cual no reconocen los sueros de individuos indeterminados (Tabla 4). También se identificó un patrón de bandeo antigénico diferente entre los dos grupos de sueros evaluados, en donde el reconocimiento de antígenos de pesos entre 37 y 68 KDa disminuye tanto en cantidad como en intensidad en los sueros de individuos indeterminados, comparado con los sueros de individuos sintomáticos en los cuales se aprecia más enriquecido el reconocimiento antigénico en esta zona.

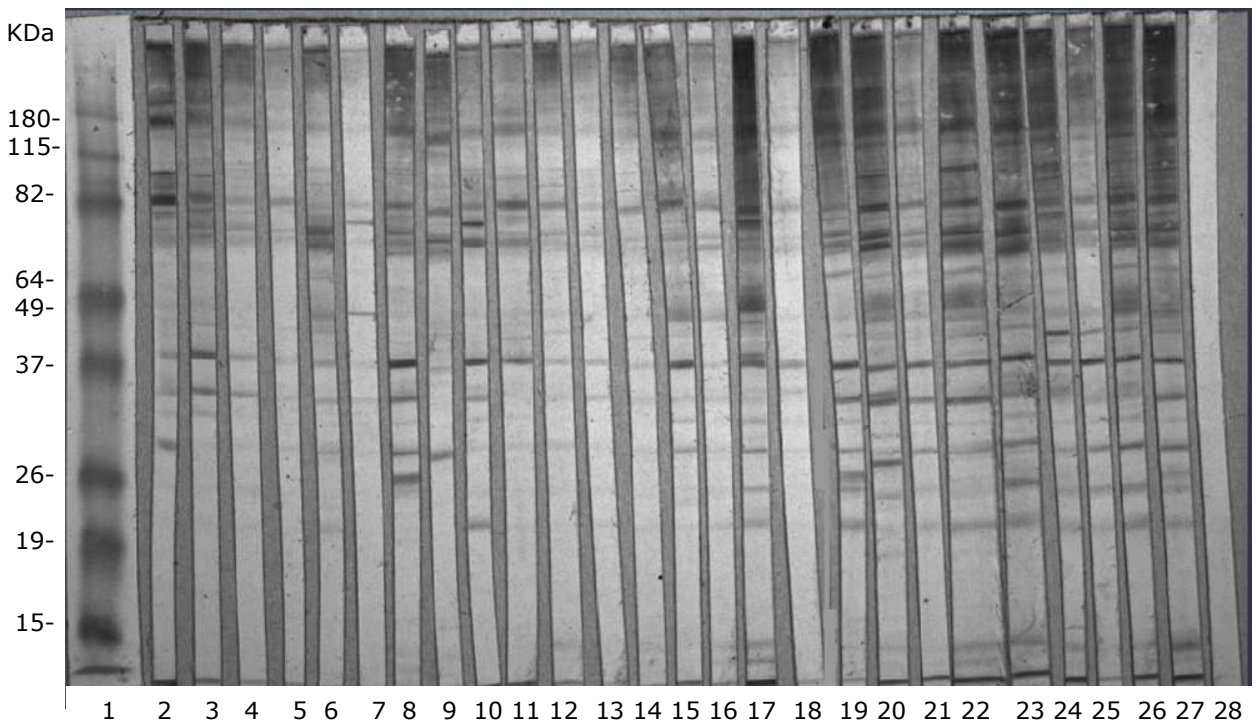
En cuanto a las diferencias entre las dos cepas, se identificaron dos proteínas antigénicas específicas para Ninoa de pesos de 95 y 80 KDa y una para QRO de 34 KDa, estas fueron reconocidas por sueros de los dos grupos en estudio (Tabla 4).

Al comparar los resultados que se obtuvieron con ETD contra evaluaciones previas usando EES realizadas por personal del Laboratorio de Tripanosomiasis del IIB con los mismos sueros, se observó que con ETD el reconocimiento antigénico es más definido principalmente en los sueros de individuos sintomáticos, ya que con EES se observa un reconocimiento en forma de barrido sobre todo en la zona de pesos moleculares altos. Incluso algunos sueros sintomáticos presentan mayor reconocimiento antigénico en lo que a número de antígenos reconocidos se refiere.

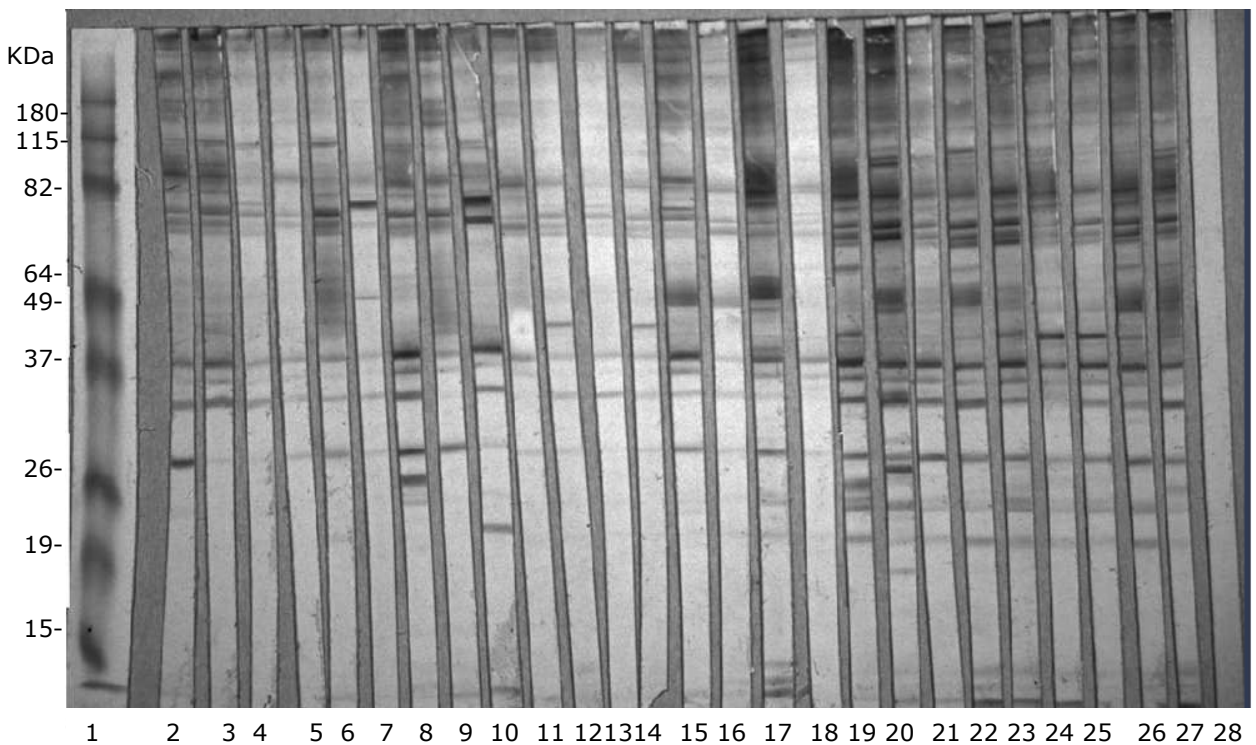
En el caso de los sueros de individuos indeterminados fue notable el hecho de que aumento en número el reconocimiento de antígenos al utilizar ETD, ya que en algunos casos con EES se observaron entre 3-4 bandas antigénicas mientras que con ETD se observaron alrededor de 11 bandas antigénicas.

En cuanto a los antígenos específicos para cada cepa solo se realizó la comparación de la cepa QRO ya que para las evaluaciones previas con EES solo se utilizó la cepa QRO encontrándose que el antígeno de 34 KDa identificado como específico para la cepa QRO con ETD también es reconocido en EES. En lo que se refiere al antígeno de 62 KDa, específico para individuos sintomáticos, este no fue identificado al usar EES.





**Figura 13. Western-blot de sueros chagásicos indeterminados y sintomáticos con ETD de la cepa Ninoa.** En el carril 1 MPM. En los carriles 2-18 sueros de individuos en fase indeterminada y en los carriles 19-27 sueros de individuos en fase sintomática. En el carril 28 se muestra un control negativo.



**Figura 14. Western-blot de sueros chagásicos indeterminados y sintomáticos con ETD de la cepa QRO.** En el carril 1 MPM. En los carriles 2-18 sueros de individuos en fase indeterminada y en los carriles 19-27 sueros de individuos en fase sintomática. En el carril 28 se muestra un control negativo.

**Tabla 3. Proteínas antigénicas reconocidas por sueros chagásicos con ETD**

BANDA	% DE RECONOCIMIENTO					
	En los dos estados clínicos (73 sueros)		En sintomáticos (35 sueros)		En indeterminados (38 sueros)	
	Ninoa	QRO	Ninoa	QRO	Ninoa	QRO
<b>110 KDa</b>	<b>87 %</b>	<b>75 %</b>	<b>100 %</b>	<b>71 %</b>	<b>82 %</b>	<b>76 %</b>
105 KDa	66 %	75 %	76 %	76 %	42 %	71 %
95 KDa	62 %	0 %	64 %	0 %	57 %	0 %
85 KDa	8 %	58 %	11 %	64 %	2 %	42 %
<b>83 KDa</b>	<b>95 %</b>	<b>91 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>94 %</b>	<b>82 %</b>
80 KDa	75 %	0 %	76 %	0 %	85 %	0 %
<b>74 KDa</b>	<b>87 %</b>	<b>91 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>82 %</b>	<b>88 %</b>
<b>72 KDa</b>	<b>100 %</b>	<b>95 %</b>	<b>100 %</b>	<b>98 %</b>	<b>100 %</b>	<b>94 %</b>
<b>70 KDa</b>	<b>95 %</b>	<b>95 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>94 %</b>	<b>94 %</b>
68 KDa	58 %	54 %	76 %	76 %	28 %	14 %
62 KDa	64 %	58 %	82 %	76 %	0 %	0 %
55 KDa	8 %	4 %	11 %	5 %	4 %	4 %
50 KDa	20 %	42 %	32 %	37 %	24 %	40 %
48 KDa	66 %	75 %	76 %	76 %	42 %	71 %
44 KDa	28 %	37 %	35 %	42 %	24 %	32 %
40 KDa	58 %	54 %	76 %	76 %	28 %	14 %
<b>35 KDa</b>	<b>95 %</b>	<b>95 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>94 %</b>	<b>94 %</b>
34 KDa	0 %	87 %	0 %	98 %	0 %	84 %
<b>32 KDa</b>	<b>95 %</b>	<b>91 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>94 %</b>	<b>82 %</b>
30 KDa	8 %	4 %	11 %	5 %	4 %	4 %
28 KDa	8 %	4 %	11 %	5 %	4 %	4 %
<b>26 KDa</b>	<b>95 %</b>	<b>91 %</b>	<b>95 %</b>	<b>98 %</b>	<b>94 %</b>	<b>94 %</b>
25 KDa	12 %	8 %	8 %	5 %	8 %	7 %
24 KDa	4 %	8 %	8 %	11 %	2 %	2 %
23 KDa	7 %	4 %	11 %	2 %	8 %	8 %
22 KDa	12 %	8 %	8 %	5 %	8 %	7 %
18 KDa	8 %	4 %	11 %	5 %	4 %	4 %
17 KDa	8 %	4 %	11 %	5 %	4 %	4 %
17.5 KDa	4 %	8 %	8 %	11 %	2 %	2 %
15 KDa	8 %	12 %	11 %	8 %	2 %	18 %

En negritas y cursiva se indican los antígenos inmunodominantes.

**Tabla 4. Proteínas antigénicas específicas para cada cepa y estado clínico con ETD**

PROTEINAS ANTIGÉNICAS ESPECIFICAS							
En sintomáticos				En indeterminados			
Ninoa	% Rec.	QRO	% Rec.	Ninoa	% Rec.	QRO	% Rec.
95 KDa	64 %	--	--	95 KDa	57 %	--	--
80 KDa	76 %	--	--	80 KDa	85 %	--	--
62 KDa	82 %	62 KDa	76 %	--	--	--	--
--	--	34 KDa	98 %	--	--	34 KDa	84 %

### 8.5 Evaluación de reacción cruzada

Para determinar si existía alguna reacción cruzada se evaluaron sueros de individuos leishmaniasicos, esto debido a que es la principal reacción cruzada que se presenta para antígenos de *T. cruzi* por ser una infección producida por el tripanosomatido *Leishmania sp.*

En las figuras 15 y 16 se observa que los sueros leishmaniasicos evaluados fueron reactivos al ETD de las dos cepas. El 56% de los sueros fueron reactivos, de los cuales el 35% reconoció más de 3 antígenos y el restante 65% solamente reconoció uno o dos antígenos (Tabla 5).

Se identificaron 11 proteínas antigénicas, de las cuales 3 fueron inmunodominantes (72, 65 y 48 KDa). En la tabla 6 se puede observar el porcentaje de reconocimiento de estos antígenos, así como también los antígenos más reconocidos.

De las 11 proteínas de reacción cruzada, 6 tuvieron los mismos pesos moleculares que las reconocidas por sueros chagásicos (110, 74, 72, 70, 48 y 40 KDa). En la tabla 7 se presenta el porcentaje de reconocimiento comparativo de cada antígeno compartido entre *T. cruzi* y *Leishmania sp.*

No hubo diferencia en el reconocimiento antigénico por los sueros leishmaniasicos entre las dos cepas utilizadas, por lo que para realizar el análisis de las proteínas antigénicas reconocidas por sueros chagásicos y leishmaniasicos se tomó el número total de sueros chagásicos independientemente de la cepa y de la fase clínica evaluada, es decir, el total fueron todos los sueros evaluados tanto para Ninoa como para QRO de ambos estados clínicos y a partir de este total se calculó el porcentaje.



**Figura 15.** Western-blot de sueros de individuos leishmaniasicos (carriles 2-31) evaluados con extracto de tripomastigotes de la cepa Ninoa. En el carril 32 se evaluó un control positivo con suero de individuo chagásico en fase indeterminada y en el carril 33 un control negativo.



**Figura 16.** Western-blot de sueros de individuos leishmaniasicos (carriles 2-31) evaluados con extracto de tripomastigotes de la cepa Querétaro. En el carril 32 se evaluó un control positivo con suero de individuo chagásico en fase indeterminada y en el carril 33 un control negativo.

**Tabla 5. Porcentaje de reconocimiento de antígenos de reacción cruzada**

<b>% de reconocimiento</b>	<b>Antígenos</b>
44 %	0
20 %	1
10 %	2
6 %	3
20 %	>3

**Tabla 6. Antígenos de reacción cruzada**

<b>BANDA (KDa)</b>	<b>% de Reconocimiento</b>
180	3.3 %
110	6.6 %
92	10 %
82	13.3 %
74	3.3 %
<b>72</b>	<b>40 %</b>
70	3.3 %
<b>65</b>	<b>16.6 %</b>
<b>48</b>	<b>16.6 %</b>
47	6.6 %
40	6.6 %

En negritas y cursiva se muestran los antígenos inmunodominantes. Las bandas fueron las mismas para las dos cepas (Ninoa y Querétaro) por lo que en este caso no se hizo un análisis por cepa.

**Tabla 7. Antígenos reconocidos por sueros de individuos chagasicos y leishmaniasicos**

<b>BANDA (KDa)</b>	<b>Sueros leishmaniasicos</b>	<b>Sueros Chagasicos</b>
110	6.6 %	80 %
74	3.3 %	88 %
<b>72</b>	<b>40 %</b>	<b>97 %</b>
70	3.3 %	94 %
48	16.6 %	70 %
40	6.6 %	55 %

En negritas y cursiva se muestra el antígeno que fue más reconocido tanto para sueros chagásicos como leishmaniasicos

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 Diferencias entre ETD y EES

El ETD permitió un mayor reconocimiento antigénico por sueros chagásicos ya que aumento el número de antígenos reconocidos, inclusive se puede observar que con el EES hay un reconocimiento en forma de barrido en una amplia zona de la tira de membrana lo cual puede deberse a que al no haber un método de extracción que disgregue completamente a las proteínas haya determinantes antigénicos que no se puedan definir completamente, sin embargo con el ETD todas las proteínas antigénicas se observan como bandas bien definidas. Esta diferencia se puede atribuir al método de extracción ya que algunas proteínas se observaron más intensas en el patrón proteico de EES, lo que pudiera indicar que aún conservan su estructura original y por ende algunas determinantes antigénicas no están expuestas para que puedan ser reconocidas por anticuerpos del suero de individuos chagásicos.

Además, el tripomastigote es el estadio infectivo y probablemente presente proteínas que sean mejores antígenos para el diagnóstico; ya que se ha visto que los tripomastigotes sanguíneos parecen ser más sensitivos y adecuados que los epimastigotes para el estudio de la respuesta inmune humoral en pacientes chagásicos (Cerisola, *et. al.*, 1971, Cossio, *et. al.*, 1983, Krettli, *et. al.* 1982), esto debido probablemente a que en el estadio de tripomastigote el parásito podría tener antígenos que aumentaran la sensibilidad y especificidad para pruebas clínicas. Particularmente en este estudio se pueden ver casos que fueron positivos en ELISA pero negativos para Western-blot con EES y que al ser evaluados con ETD presentan reactividad en Western-blot, esto podría deberse a que al utilizar el estadio de tripomastigote se aumentó la sensibilidad para que se pudieran reconocer antígenos que no lo fueron con epimastigotes.

Utilizar ETD podría ser una buena alternativa para el diagnóstico al momento de confirmar casos positivos dudosos, sin embargo las bandas antigénicas que se observaron fueron muy tenues por lo que para comprobar y validar esta propuesta se tendría que realizar la estandarización de un método de diagnóstico utilizando ETD probando una mayor cantidad de sueros así como

varias diluciones ya que probablemente con una dilución menor las bandas pudieran apreciarse más intensas. Esto debido a que al ser casos con valores de ELISA muy cercanos al punto de corte presenten títulos bajos de anticuerpos. También se podría utilizar una mayor concentración de antígeno con la finalidad de observar más intensidad en las bandas de antígenos reconocidos.

### **9.2 Reconocimiento inespecífico por sueros negativos.**

Al probar sueros negativos con el extracto utilizado para este estudio (ETD), se presentó un reconocimiento inespecífico débil de una proteína de ~72 KDa, lo cual no ocurrió cuando los sueros fueron probados en evaluaciones previas con EES de la cepa QRO. Después de evaluar las cepas Ninoa y QRO tanto por separado como mezcladas se vio que este reconocimiento es debido al 2° anticuerpo con el que se revela el Western-blot ( $\alpha$ -IgG humana-HRP) y solo ocurre con la cepa Ninoa. Ya que esto se observó en todos los sueros negativos sería muy difícil atribuir esto a una proteína compartida con algún otro protozooario o bacteria ya que es poco probable que todos los individuos serológicamente negativos tuvieran la misma infección.

Este reconocimiento inespecífico puede ser hacia alguna proteína inmunogénica propia del sistema inmune, o bien alguna proteína que es reconocida específicamente por el 2° anticuerpo. Sin embargo, en los sueros chagásicos, el reconocimiento de esta banda inespecífica fue en todos de mayor intensidad que la de los sueros negativos, por lo que sí se consideró para el análisis ya que posiblemente aparte del antígeno inespecífico hay otros de este mismo peso que si son antígenos propios del parásito reconocidos por anticuerpos del suero de individuos chagásicos.

### **9.3 Reconocimiento antigénico de sueros indeterminados y sintomáticos**

Se identificó un patrón de reconocimiento antigénico entre 37 y 68 KDa que permite diferenciar serológicamente a individuos de los dos estados clínicos de la fase crónica ya que las proteínas antigénicas reconocidas en esta zona fueron menores en número e intensidad para individuos indeterminados.

También se ha visto que individuos indeterminados reconocen pocas bandas (Rangel-Flores, *et. al.*, 2001) a diferencia de los que se estudiaron aquí en donde el reconocimiento es más claro contra varias proteínas, el poco reconocimiento fue observado en individuos de la zona de Morelos, por lo que probablemente la población de diferentes regiones geográficas pudiera reconocer diferentes antígenos y este fenómeno podría estar relacionado con la cepa infectante o con el vector transmisor; además el extracto utilizado en estos estudios fue EES mientras que aquí se utilizó ETD, por lo que también pudiera deberse al extracto usado.

Debido a esto el patrón identificado en este estudio es aplicable solo a individuos indeterminados que presenten un claro reconocimiento antigénico, sin embargo, esto es solo una teoría tomando en cuenta los resultados arrojados por la investigación realizada pero se necesitaría realizar más estudios por ejemplo de estandarización para poder comprobar este punto.

Se identificó la presencia de anticuerpos contra una proteína antigénica de 62 KDa en individuos con Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CCC) y no en individuos con Chagas en fase indeterminada, esto indica que esta proteína pudiera estar íntimamente ligada al desarrollo de la enfermedad hacia la fase sintomática; solo un reporte existe acerca de una proteína de este peso para *T. cruzi* (Augustine, *et. al.*, 2006). En este reporte se clonó y caracterizó una proteína de 62 KDa que se encuentra expresada solamente en tripomastigotes invasivos y esta involucrada en el proceso de infección celular, con esto se podría especular que la proteína identificada en este trabajo fuera una proteína específica para el estadio de tripomastigotes, y aun más después de haber observado que con EES no fue identificada, aunque para comprobar esto se le tendría que estudiar a detalle.

Por otro lado, en cuanto a la posibilidad de encontrar una actividad terapéutica en esta proteína de 62 KDa se menciona que puede ser buena candidata para una vacuna y que no hay homólogos de esta proteína en humanos, por lo cual tanto el gen como la proteína pueden ser excelentes blancos para desarrollar nuevas drogas para quimioterapia de la enfermedad de Chagas, sin embargo no fue probada con sueros de pacientes para argumentar más este



punto por lo que de igual modo habría que realizar más estudios para comprobar esta teoría.

Además de la proteína antigénica identificada de 62 kDa, se identificó otra con importancia, la de 35 kDa, la cual es reconocida por un 100% de los individuos sintomáticos y aunque los indeterminados también la reconocen en un alto porcentaje, entre 82 y 94%, la intensidad con la que se presenta su reconocimiento en los individuos sintomáticos es muy fuerte y este patrón de intensidad se repite en todos los individuos sintomáticos, sin embargo en los indeterminados no es así, ya que solo un 35% de los individuos indeterminados la reconocen con una intensidad fuerte, pero el restante 65% la reconocen con una intensidad débil, además de que los individuos indeterminados que reconocen este antígeno con una intensidad fuerte presentan un reconocimiento multibanda en la zona de 70 a >180 kDa, lo cual es observado también en los individuos sintomáticos, y los que lo reconocen débilmente presentan un reconocimiento pobre en la zona de 70 a >180 kDa. Por lo anterior este antígeno de 35 kDa pudiera estar relacionado con algún cambio próximo hacia la fase sintomática o bien alguno de los que se encuentran entre la zona de 70 a >180 kDa, pero sería más factible estudiar la proteína de 35 kDa para dilucidar este punto ya que en la zona multibanda no se alcanzan a definir todas las proteínas.

Al comparar los resultados obtenidos en esta investigación utilizando ETD con los de evaluaciones previas usando EES se observó que hay un mejor reconocimiento con ETD ya que aumenta el número de antígenos reconocidos, esto es atribuible a dos factores principalmente, al estadio del parásito y al método de extracción de los antígenos. También se pudo notar que con EES no se reconoció el antígeno de 62 kDa que con ETD se identificó como específico para individuos sintomáticos por lo que se puede proponer al ETD como una buena herramienta para poder clasificar serológicamente los dos estados clínicos de la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

#### **9.4 Diferencias antigénicas entre cepas**

En cuanto a las diferencias entre cepas llama la atención la proteína antigénica identificada específicamente solo para la cepa QRO de 34 kDa, ya que

en estudios previos se ha visto que la cepa QRO es más infectante que la cepa Ninoa (Marin, 2005) por lo que esta proteína podría estar relacionada con tal característica, adicional a esto se observó que es reconocida en mayor porcentaje (98%) por individuos en fase sintomática que por individuos indeterminados, esto se podría relacionar también con el hecho de que QRO sea más infectante ya que esta siendo reconocida mayormente por individuos que ya presentan un daño patológico irreversible.

También se identificaron 2 proteínas específicas para Ninoa (90 y 85 kDa) las cuales de igual forma se podrían relacionar con el hecho de que la cepa Ninoa no sea tan agresiva como QRO, sin embargo para dilucidar este punto se tendrían que realizar más estudios, ya que en la presente investigación no se observó ninguna diferencia en el reconocimiento de estas proteínas entre los dos estados clínicos estudiados.

Se han encontrado diferencias de virulencia entre las cepas utilizadas en este estudio; siendo QRO más virulenta que Ninoa (Marín, 2005), en este mismo sentido, se ha reportado que si una cepa es más virulenta podría deberse a que infecta más eficientemente, lo que nos habla de la capacidad de la cepa por evadir la respuesta inmune, o bien, provocar una respuesta inmune distinta en el hospedero.

Si se toma en cuenta este punto para discutir el porque de las diferencias encontradas en el reconocimiento antigénico de cada cepa como lo son el antígeno de 34 KDa encontrado específicamente para QRO y los antígenos de 95 y 80 KDa para Ninoa esto se puede atribuir a que in vivo hay procesos directamente relacionados con la cepa que infecta, como ya se ha visto en estudios en los que inclusive se ha determinado que cepas sudamericanas infectan de forma diferente que cepas mexicanas, por tal motivo es importante enfocar la atención en antígenos como los que se han identificado aquí ya que podrían ser de ayuda en el diagnóstico para identificar que cepa esta infectando, o bien como blancos terapéuticos, ya que probablemente estos antígenos específicos son precisamente los que puedan hacer a la cepa más o menos virulenta.

## 9.5 Reacción cruzada

En cuanto a la evaluación de la reacción cruzada, si hubo tal, esto no es raro ya que la principal reacción cruzada que presentan los antígenos de *T. cruzi* es con el tripanosomatido *Leishmania sp.*

Si bien, esto es un problema al momento de realizar un diagnóstico ya que se pueden dar resultados falsos positivos, en este estudio no influye de manera determinante ya que la proteína que se identificó como específica para individuos de fase crónica sintomática (62 KDa) no fue reconocida por sueros leishmaniasicos. Por otro lado, los sueros leishmaniasicos solo reconocen 2 antígenos de entre 37-68 KDa, zona que fue propuesta como un patrón para diferenciar a los individuos estudiados y de estos 2 antígenos solo uno de ellos es inmunodominante (65 KDa), por lo cual la reacción cruzada que se presenta con leishmaniasicos no afecta las conclusiones a las que se llegan en este estudio.

También se observó que el antígeno de 72 KDa fue inmunodominante tanto para sueros chagasicos como leishmaniasicos, esto sugiere que es un antígeno de importancia para ambos microorganismos y pudiera estar asociado específicamente con los tripanosomatidos.

## 10. CONCLUSIONES

- Hay mayor reconocimiento antigénico al utilizar extracto de tripomastigotes extraído con detergentes.
- Existen diferencias en el reconocimiento antigénico en un extracto de tripomastigotes de *T. cruzi* entre individuos de los dos estados clínicos de la fase crónica de la enfermedad de Chagas.
- Utilizar ETD puede ser una alternativa en el diagnóstico al momento de confirmar casos dudosos positivos.
- Es posible diferenciar serologicamente a individuos de fase crónica asintomática y sintomática.
- Hay proteínas antigénicas reconocidas por individuos de fase crónica que son cepa-específicas.
- Una proteína antigénica de 62 KDa es específica para la mayoría de los individuos de fase crónica sintomática.

## 11. BIBLIOGRAFIA

- **Abel LC**, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, Bocchi EA, Teixeira HC, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. 2001. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- $\gamma$  response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Autoimmun.*; 17:99 –107.
- **Acosta-Serrano A**, Schenkman S, Yoshida N, Mehlert A, Richardson JL, Ferguson MAJ. 1995. The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. *J. Biol. Chem.* 270: 27244-27253.
- **Affranchino JL**, Ibañez CF, Luquetti O, Rassi A, Reyes MB, Macina RA, Aslund L, Petterson U, Frasch ACC. 1989. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34:221-228.
- **Almeida IC**, Ferguson MAJ, Schenkman S, Travassos LR. 1994. Lytic anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 304:793-802.
- **Andrews NW**, Hong K, Robbins ES, Nussenzweig V. 1987. Stage-Specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 64: 474-484.
- **Andrews NW**. 2002. Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. *J. Cell. Biol.* 158: 389-394.
- **Augustine SA**, Kleshchenko YY, Nde PN, Pratap S, Ager EA, Burns JM Jr, Lima MF, Villalta F. 2006. Molecular Cloning of a *Trypanosoma cruzi* Cell Surface Casein Kinase II Substrate, Tc-1, Involved in Cellular Infection. *Infection and Immunity.* 74: 3922–3929.
- **Barros HC**, Verbisck NV, Da Silva S, Araguth MF, Mortara RA. 1997. Distribution of epitopes of *Trypanosoma cruzi* amastigotes during the intracellular life cycle within mammalian cells. *J. Euk. Microbiol.* 44: 332-344.

- **Berrizbeitia M**, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Aché A, Lacouture S, Medina M, Ward BJ. 2006. Purified Excreted-Secreted Antigens from *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes as Tools for Diagnosis of Chagas' Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:291–296
- **Bosseno MF**, Barnabé C, Magallón E, Lozano F, Ramsey J, Espinoza B, Breniere F. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in México. *J. Clin. Microbiol.* 40:627-632.
- **Brener Z**. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.*; 27:347-382.
- **Brenière SF**, Bosseno MF, Espinoza B. 1999. Genética de las poblaciones de *Trypanosoma cruzi*: conocimientos actuales. *En: Alfred Cassab JR, Noireau F, Guillén G. Chagas. La enfermedad en Bolivia.* p. 201-208.
- **Bucio MI**, Cabrera M, Segura EL, Zenteno E, Salazar-Scettino PM. 1999. Identification of Immunodominant antigens in Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunological Investigations*, 28: 257-268.
- **Bustamante JM**, Rivarola HW, Fernandez AR, Enders JE, Fretes R, Palma JA, Paglini-Oliva PA. 2003. Indeterminate Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* strain and re-infection are factors involved in the progression of cardiopathy. *Clinical Science*. 104: 415–420.
- **Camargo MM**, Almeida IC, Pereira MES, Ferguson MAJ, Travassos LR, Gazzinelli RT. 1997. GPI-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *T. cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of pro-inflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol.* 158:5890-5901.
- **Cerisola JA**, Alvarez M, Bock M, Wegner D. 1971. A comparison of a new antigen from amastigotes from *T. cruzi* and an antigen from epimastigotes for the diagnosis of Chagas' disease by the indirect immunofluorescence test. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 13:162-166.
- **Cevallos AM**, Hernández R. 2001. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana). *En: Martínez Romero E. y J. Martínez (Ed.), Microbios en línea* (<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap15>).

- **Cossio PM**, Casanova MB, Gonzales-Cappa S, Fernández L, Arana RM. 1983. El posible uso de amastigotes tisulares de *T. cruzi* para pruebas sexológicas de inmunofluorescencia. *Medicina (B. aires)*, 43:737-738.
- **Cunha-Neto E**, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, Bellotti G, Patarroyo ME, Pilleggi F and Kalil J. 1995. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 92:3541-3545.
- **Cunha-Neto E**, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. 2006. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*. 39: 41–54.
- **De Andrade AF**, Esteves MJ, Angluster J, Gonzales-Perdomo M, Goldenberg S. 1991. Changes in cell-surface carbohydrates of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis under chemically defined conditions. *J. Gen. Microbiol.*137: 2845-2849.
- **De Lima Rivero AR**, Farías MN, Tortolero E, Navarro MC, Contreras VT. 2001. Purificación parcial y empleo de fracciones glicosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Acta Científica Venezolana*. 52: 235–247.
- **De Souza W**. 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.* 8:269-85.
- **Dias JC**. 1992. Epidemiology of Chagas disease. *En: Wendel S., Z. Brener, M. E. Camargo, A. Rassi (Ed.), Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISTB Brazil'92. Sao Paulo.*
- **Dias JC**, Silveira AC, Schofield CJ. 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 97:603-12.
- **El-Sayed NM, et al.** 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309:409-15.
- **Ferguson MA**. 1997. The surface glycoconjugates of tripanosomatid parasites. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 352:1295-1302.

- **Fernández M**, Silva R, Rössle SC, Bisch PM, Rondinelli E, Urményi TP. 2005. Gene characterization and predicted protein structure of the mitochondrial chaperonin HSP10 of *Trypanosoma cruzi*. *Gene*. 349:135-42.
- **Ferreira R**, Ianni B, Abel LCJ, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. 2003. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/“indeterminate” and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 98:407– 411.
- **Gazzinelli G**, Brener Z. 1991. Immunological aspects of the morbidity of human Chagas’ disease. *Research in Immunology*. 142:167-169.
- **Gazzinelli RT**, Galvao LMC, Dias JCP, Gazzinelli G, Brener Z. 1988. Antilaminin and specific antibodies in acute Chagas’ disease. *Trans. Roy. Soc. Med. Hyg.* 82:574-576.
- **Gomes JA**, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. 2003. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas’ disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect. Immun.* 71:1185–1193.
- **Guzmán-Marín ES**, Zavala-Castro JE, Acosta-Viana KY, Rosado-Barrera ME. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Biomed.* 10:177-184.
- **Harth G**, Mills AA, Souto-Padrón T, de Souza W. 1992. *Trypanosoma cruzi* glycoprotein 72: immunological analysis and cellular localization. *Mol. Cell. Biochem.* 109:25-36.
- **Hatcher FM**, Kuhn RE, Cerrone MC, Burton RC. 1981. Increased natural killer cell activity in experimental American trypanosomiasis. *J. Immunol.* 127:1126–1130.
- **Hernández-Becerril N**, Nava A, Reyes PA, Monteón VM. 2001. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *Archivos de Cardiología de México*. 71:199-205.
- **Katzin AM**, Colli W. 1983. Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi*: an N-acetyl-D glucosamine containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. *Biochim. Biophys. Acta*. 68:208-215.



- **Krettli AU**, Brenner Z. 1982. Resistance against *T. cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.*, 128:2009-2012.
- **Laemmli UK**. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- **Lemos EM**, Reis D, Adad SJ, Silva GC, Crema E, Correa-Oliveira R. 1998. Decreased CD4(+) circulating T lymphocytes in patients with gastrointestinal Chagas disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88:150-155.
- **López-Olmos V**, Pérez-Nasser N, Piñero D, Ortega E, Hernández R, Espinoza B. 1998. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 69:239-254.
- **Lorca M**, Gonzalez A, Veloso C, Reyes V, Vergara U. 1992. Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic Chilean Chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46:44–49.
- **Marín A**. 2005. Análisis de la respuesta de macrófagos ante la infección de dos cepas de *Trypanosoma cruzi* con distinta virulencia. Tesis para obtener el título de Bióloga. Facultad de Ciencias UNAM.
- **Martínez Velasco ML**. 2004. Estudio del Proteoma de *Trypanosoma cruzi*. Estudios de moléculas con importancia biológica. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM.
- **Matsumoto TK**, Hoshino-Shimizu S, Nakamura PM, Andrade Jr. HF, Umezawa ES. 1993. High resolution of *Trypanosoma cruzi* amastigote antigen in serodiagnosis of different clinical forms of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 31:1486–1492.
- **Miles MA**, Toyé PJ, Oswald SC, Godfrey DG. 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71:217-25.
- **Miles MA**, Marsden PD, Pettitt LE, Draper CC, Watson S, Seah SK, Hutt MS, Fowler JM. 1980. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rhesus

monkeys 111. Electrocardiographic and histopathological findings. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73:528-532.

- **Monteón VM**, Ramos A, Reyes PA. 1993. Reactivity of sera from Chagas patients to extracts of mexican *Trypanosoma cruzi* isolates. *Rev. Biol. Trop.* 41:861-865.
- **Monteón VM**, Furuzawa-Carballeda R, Alejandre-Aguilar A, Aranda-Frausto J, Rosales-Encina J, Reyes P. 1996. American trypanosomosis: in situ and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Exp. Parasitol.* 83:267-274.
- **Monteón VM**, Guzmán L, Negrete C, Rosales JL, Lopez PA. 1997. Serodiagnosis of American Trypanosomosis by Using Nonpathogenic Trypanosomatid Antigen. *Journal of Clinical Microbiology.* 35:3316–3319.
- **O' Garra A** and Murphy K. 1993. T-cell subsets in autoimmunity. *Cur. Op. Immunol.* 5: 880-886.
- **OPS.** 1999. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. *Conclusiones de una Consulta Técnica.* Washington, DC, Organización Panamericana de la Salud. (documento OPS/HCP/HCT/140/99).
- **Ortiz-Ortiz L**, Ortega T, Capin R, Martinez T. 1976. Enhanced mononuclear phagocytic activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 50:232–242.
- **Primavera K.** 1985. Eficiencia de antígenos de formas evolutivas de *T. cruzi* para detección de anticuerpos de clase A, M y G en diferentes formas clínicas de la infección chagásica por reacción de inmunofluorescencia indirecta. Sao Paulo, Brasil (Tesis de Doctorado, Instituto de Ciencias Biomédicas de la universidad de Sao Paulo, Brasil).
- **Primavera K**, Umesawa ES, Peres BA, Camargo ME, Hoshino-Shimizu S. 1990. Chagas' Disease: IgA, IgM and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 32: 172-180.
- **Rabilloud T.** 1998. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19: 758-760.

- **Rangel-Flores H**, Sánchez B, Mendoza-Duarte J, Barnabé C, Breniere FS, Ramos C, Espinoza B. 2001. Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central México: correlation with electrocardiographic alterations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65:887-895.
- **Reis DD**, Jones EM, Tostes S Jr, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL. 1993. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* 48: 637-644.
- **Salazar-Schettino PM**. 2003. Enfermedad de Chagas situación en México. Simposio de enfermedad de Chagas. *Gaceta Médica de México.* 139: S78-S80.
- **Sánchez B**, Monteón V, Reyes PA, Espinoza B. 2001. Standardization of Micro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western-Blot for Detection of *Trypanosoma cruzi* Antibodies Using Extracts from Mexican Strains as Antigens. Elsevier. *Archives of Medical Research* 32:382-388.
- **Schattschneider W**, Lopes ER, Alencar JE, Bienzle U, Feldmeier H. 1992. A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas' disease in Brazilian patients. *Trop. Geogr. Med.* 44:210–218.
- **Schofield CJ** and Maudlin I. 2000. Trypanosomiasis control. *Int. J. Parasitol.* 31:614-619.
- **Silva AG**, Silveira-Lacerda EP, Cunha-Júnior JP, de Souza MA, Favoreto Junior S. 2004. Immunoblotting analyses using two-dimensional gel electrophoresis of *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37:454-459.
- **Sosa-Estani S**, et al. 1998. Chemotherapy of chronic Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 59:526-529.
- **Souto RP**, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83: 141-152.

- **Teixeira AR**, Nascimento RJ, Sturm NR. 2006. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 101: 463-491
- **Teixeira MM**, Gazzinelli RT, Silva JS. 2002. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. Trends Parasitol. 18:262–265.
- **Tibayrenc M**. 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Adv. Parasitol. 36: 47-115.
- **Umesawa ES**, Nascimento MS, Kesper N Jr, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, Camargo ME. 1996. Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital, Acute and Chronic Chagas' Disease. J. Clin. Microbiol. 34:2143-2147.
- **WHO**. 2002. Technical Report Series. Second report of the WHO Expert Committee. CONTROL OF CHAGAS DISEASE.
- **Yoshida N**, Blanco SA, Araguth MF, Russo M, González J. 1990. The stage specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 39:39-46.

## 12. ANEXO I: Soluciones

- **Amortiguador de corrida 5X**

Tris base SIGMA T-1503 PM=121.1 g.....	15.1 g
Glicina BIO-RAD 161-0718 PM=75.07 g.....	72 g
SDS BIO-RAD 161-0301 PM=288.38.....	5 g

Llevar a 1 L con agua desionizada.

- **Amortiguador de Laemmli 4X**

Agua destilada.....	40 ml
Tris base SIGMA T-1503 PM=121.1 g.....	3.04 g
Glicerol.....	40 ml
SDS BIO-RAD 161-0301 PM=288.38.....	4 g
2-mercaptoetanol.....	4 ml
Azul de bromofenol.....	2 mg

Aforar a 100 ml. Poner en frasco ambar o forrar con papel aluminio a 4°C.

- **Amortiguador de fosfatos (PBS) 20X**

Fosfato de sodio dibásico BAKER 3828-20.....	7.2 g
Fosfato de sodio monobásico BAKER 3818.....	22 g
Cloruro de sodio SIGMA 5-9888.....	180 g

Disolver en 500 ml de agua y aforar a 1 L.

- **Amortiguador de transferencia**

Tris base SIGMA T-1503 PM=121.1 g.....	3.03 g
Glicina BIO-RAD 161-0718 PM=75.07 g.....	14.4 g
Metanol.....	200 ml

Llevar a 1 L con agua desionizada. Mantener en refrigeración.

- **Persulfato de Amonio**

Persulfato de Amonio de BIO-RAD 161-0700.....	0.15 g
---	--------

Aforar a 1 ml con agua milli Q. Mantener en refrigeración, máximo 7 días.

- **Medio LIT**

Cloruro de Sodio SIGMA S-9888.....	4 g
Cloruro de potasio BAKER 3040.....	0.4 g
Fosfato de sodio dibásico BAKER 3828-20.....	8 g
Glucosa Merck 8342.....	2 g
Triptosa Disco 0124-01.....	5 g
Infusión de caldo de hígado Disco 0269-17-7.....	5 g

Se disuelven en agua bidestilada todos los reactivos, midiendo el pH a 7.2 para posteriormente aforar a 1L. Esterilizar a 120°C y 15 libras de presión por 10 minutos. Dejar mínimo 3 días en oscuridad como prueba de esterilidad.

Se complementa con hemina (25µg/ml) y suero fetal bovino inactivado (56°C por 30 minutos) al 10%. Filtrar con filtro de 0.22 µ en esterilidad.

Se almacena a temperatura ambiente en oscuridad.

- **Amortiguador de Lisis (7M Urea, 2M Tiourea, 4% CHAPS, 10 mM Tris)**

Urea de Organic Research 4110U.....	0.42 g
Tiourea de SIGMA T-7875.....	0.152 g
CHAPS de SIGMA C-5070.....	0.04 g
Tris base de SIGMA T-1503.....	0.0008 g

Se disuelven para tener un volumen final de 1 ml con agua milli Q. El amortiguador se debe preparar justo antes de usarse.

- **Inhibidores de proteasas**

	Concentración stock	Estabilidad	µl agregados/ 5 µl de amortiguador	Concentración final
EDTA	0.5 M	Meses a 4°C	125	0.012 M
PMSF	200 mM	9 meses 4°C	25	1 mM
Leupeptin	10 mM	1 mes -20°C	50	0.1 mM
Pepstatin	1 mM	Meses -20°C	5	1 x 10 <sup>-3</sup> mM

PMSF de SIGMA P-7626, se disuelven 34.84 mg en 1 ml de metanol.

Leupeptin de SIGMA L-2884, se disuelve 1 mg en 235 µl de agua milli Q.

Pepstatin de SIGMA P-5318, se disuelve 1 mg en 1.47 ml de metanol.

El EDTA se emplea la solución 0.5 M de SIGMA E-7898.

- **Solución de Acrilamida 30%/Bisacrilamida 0.8%**

Acrilamida de BIO-RAD 161-0101.....30 g

N,N-metilen-bisacrilamida de BIO-RAD 161-0201.....0.8 g

Aforar a 100 ml con agua milli Q. Filtrar por 0.22  $\mu$  y mantener a 4°C en frasco ambar.

- **4X TRIS-Cl/SDS (0.5 M TRIS-Cl con 0.4% SDS) pH 6.8**

Tris base de SIGMA T-1503.....6.05 g

SDS de BIO-RAD 161-0301.....0.4 g

Disolver en 40 ml de agua milli Q, ajustar el pH a 6.8 con ácido clorhídrico. Aforar a 100 ml y filtrar por 0.2  $\mu$ . Guardar en oscuridad a 4°C.

- **4X TRIS-Cl/SDS (1.5 M TRIS-Cl con 0.4% SDS) pH 8.8**

Tris base de SIGMA T-1503.....91 g

SDS de BIO-RAD 161-0301.....2 g

Disolver en 300 ml de agua milli Q, ajustar el pH a 8.8 con ácido clorhídrico. Aforar a 500 ml y filtrar por 0.2  $\mu$ . Guardar en oscuridad a 4°C.

- **Azul de Coomasie**

Azul de Coomasie R-250 de BIO-RAD 161-0400.....0.25 g

Metanol de BAKER 9070-03.....250 ml

Acido acético de BAKER 9507-05.....50 ml

Disolver el colorante perfectamente, y aforar a 500 ml con agua bidestilada. Filtrar con papel filtro de poro mediano.

- **Desteñidor de Coomasie**

Metanol de BAKER 9070-03.....200 ml

Acido acético de BAKER 9507-05.....70 ml

Aforar a 1L con agua bidestilada.

## **ABREVIATURAS**

**CCC**-Cardiomiopatía Chagásica Crónica  
**CHAPS-3**-[(3-colamidopropildimetilamonio)-1-propanosulfonato  
**DMEM**-Medio mínimo esencial Dulbecco  
**ECG**-Electrocardiograma  
**EDTA**-Ácido etilendiaminotetraacético  
**EED**-Extracto de epimastigotes con detergentes  
**EES**-Extracto de epimastigotes sonicados  
**ELISA**-Ensayo de inmunoabsorción con enzimas  
**ETD**-Extracto de tripomastigotes con detergentes  
**GIPLs**-Glicoinositolfosfolípidos  
**Gp**-Glicoproteínas  
**GPI**-Glicofosfatidilinositol  
**HRP**-Peroxidasa de rábano  
**IFI**-Inmunofluorescencia indirecta  
**IHA**-Hemoaglutinación indirecta  
**IIB**-Instituto de Investigaciones Biomédicas  
**INC**-Instituto Nacional de Cardiología  
**kDa**-Kilodaltones  
**OMS**-Organización Mundial de Salud  
**OPS**-Organización Panamericana de Salud  
**PBS**-Buffer de Fosfatos  
**PCR**-Reacción en cadena de la polimerasa  
**PMSF**-Fenilmetilsulfonilfluoruro  
**Rx**-Rayos "x"  
**SAPA**-Antígeno secretado de fase aguda  
**SAPA/TS**-Antígeno secretado de fase aguda/transialidasa  
**SFB**-Suero Fetal Bovino  
**TESA**-Antígenos excretados-secretados de tripomastigotes