



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Aislamiento de antígenos de relevancia para
el diagnóstico diferencial entre las fases
Indeterminada y Crónica de la enfermedad
de Chagas

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. ELIA TORRES GUTIÉRREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: M. en C. MARTHA IRENE BUCIO TORRES

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dr. EDGAR ZENTENO GALINDO
Dr. ROBERTO ARREGUIN ESPINOSA DE LOS MONTERO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de abril de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) de la alumna TORRES GUTIÉRREZ ELIA con número de cuenta 98078396 con la tesis titulada: "AISLAMIENTO DE ANTÍGENOS DE RELEVANCIA PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE LAS FASES INDETERMINADA Y CRÓNICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS" realizada bajo la dirección de: DRA. MARTHA IRENE BUCIO TORRES

Presidente: DRA. PAZ MARÍA SALAZAR SCHETTINO
Vocal: DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ
Secretario: DR. ROBERTO ARRIGUIN ESPINOSA DE LOS MONTERO
Suplente: DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS
Suplente: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 03 de junio de 2011

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al proyecto IN212307 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, por el apoyo parcial para el desarrollo de este trabajo.

A la Facultad de Medicina por el apoyo otorgado por medio de las asignaciones presupuestales de la Dra. Paz María Salazar Schettino, M. en C. Margarita Cabrera Bravo y M. en C. Martha Irene Bucio Torres.

A la Dra. Clara Vázquez Antona y Dr. Carlos Zamora del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" por el diagnóstico clínico cardiológico de los pacientes.

A la M. en C. Lorena González López por su apoyo en la realización de diversas técnicas como la electroforesis en doble dimensión y por sus valiosas contribuciones.

A la Dra. Patricia Gorocica Rosete y la M. en C. Blanca Espinosa Mancilla del INER, por sus valiosas enseñanzas y apoyo en la realización de la electroinmunotransferencia en doble dimensión.

A la M. en C. Yolanda Guevara por el mantenimiento de los aislados.

A la M. en C. Martha Irene Bucio Torres por su dirección e invaluable apoyo para el desarrollo proyecto.

Dr. Edgar Zenteno Galindo por su apoyo para la realización de gran parte del proyecto y sus valiosas aportaciones a la tesis.

Dr. Roberto Arreguin Espinosa de los Montero por formar parte del comité tutorial y sus valiosas contribuciones para la realización de la tesis.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A mi mamá y mi papá por toda su paciencia y dedicación. Porque siempre me han impulsado a salir adelante, me dan todo el apoyo y cariño que necesito y me han enseñado que lo que realmente importa en la vida es ser feliz.

A mi hermano favorito Fer, porque sé que siempre cuento con su apoyo, por los buenos tiempos que hemos compartido y por inducirme a ser mejor cada día.

A Ivan, por estar conmigo, apoyarme y por todas las sueños y alegrías compartidas.

A la Dra. Paz María Salazar, la Dra. Margarita Cabrera y a la Dra. Martha Bucio por todo su apoyo, por creer en mí y por ser un gran ejemplo como investigadoras y mujeres exitosas.

A todos mis compañer@s y amig@s del Laboratorio de Biología de Parásitos, Ade, Glori, Yolis, Mauro, Evita por su apoyo, por ser un gran grupo de trabajo y porque siempre tienen aportaciones enriquecedoras en lo académico y en lo personal.

A mis amiguitas y compañeras también del lab. Laura, Marianita (Marry Jane) y Dalia, por su gran apoyo en el trabajo del laboratorio y por los valiosísimos y felices momentos compartidos.

A los amiguitos parasitados y amibas de la vida libre, Lao, Neliurk, Chio, Jose Luis (fascio), Lore, Perla y Aaron por su amistad y por las enriquecedoras discusiones y reuniones que realizan.

A las Biolocas Nid, Sonia y Mari por su valiosa amistad.

A Caty porque siempre estás ahí para apoyarme y echarme porras y por ser mi amiga desde..... hace mucho.

A los peques del 2204 de medicina por obligarme a mantenerme actualizada y a tratar de ser mejor profesora.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	
- Ubicación taxonómica	3
- Ciclo de vida	5
ENFERMEDAD DE CHAGAS	
- Cuadro clínico	7
- Diagnóstico	8
ANTECEDENTES	
- Proteoma de <i>T. cruzi</i>	9
- Glicobiología de <i>T. cruzi</i>	10
- Respuesta Inmune contra <i>T. cruzi</i>	11
- Patogenia	12
- Diferencias entre las fases Crónica Asintomática y Crónica Sintomática	14
- Componentes antigénicos	16
- Diagnóstico serológico en las diferentes fases clínicas	18
JUSTIFICACIÓN	20
HIPOTESIS	21
OBJETIVOS	22
METODOLOGÍA	
- Preparación del extracto proteico	23
- Cuantificación de Proteínas Totales	24
- Determinación de Carbohidratos Totales	24
- Determinación del patrón electroforético del extracto	25
- Tinción con pro Q Emerald (glicoproteínas)	26
- Tinción con Sypro Ruby (proteínas)	26
- Composición de Carbohidratos	27
- Electrotransferencia revelada con lectinas	27
- Electroforesis en dos dimensiones	29
- Obtención de sueros humanos	30
- Determinación de Componentes inmunodominantes y evaluación de Western-blot para diagnóstico	31
- Electroinmunotransferencia a partir de geles en dos dimensiones	33
- Determinación de componentes proteicos inmunodominantes compartidos y específicos de fase indeterminada o crónica	34
- Caracterización por MALDI-TOF	34

RESULTADOS

- Concentración de proteínas y carbohidratos totales del extracto	36
- SDS-PAGE del extracto proteico	36
- Tinción con Pro Q Emmerald y Sypro Ruby, en geles de poliacrilamida	38
- Composición de Carbohidratos	39
- Ensayos con Lectinas	40
- Electroforesis 2D	41
- Obtención y selección de sueros	42
- Western-blot	43
- MALDI-TOF	50
- DISCUSIÓN	51
- CONCLUSIONES	60
- PERSPECTIVAS	61
- BIBLIOGRAFIA	62

RESUMEN

La enfermedad de Chagas se presenta en diferentes formas clínicas que van desde crónica asintomática en la que los estudios clínicos convencionales no detectan alteraciones, hasta la forma cardiaca severa que puede llevar incluso a la muerte. Sin embargo, los factores que influyen en el inicio y la evolución del cuadro clínico aun son desconocidos. El agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, presenta una oferta antigénica amplia para el huésped vertebrado, a la fecha se han descrito diversos componentes antigénicos, entre los que destacan gran cantidad de glicoproteínas de superficie. En este trabajo se identificaron componentes glicoproteicos entre 250 y 13 kDa de un extracto soluble de *T. cruzi*, positivos a las tinciones Sypro Rubi y ProQ Emerald. Por cromatografía de gases se identificó a N-acetil glucosamina como principal monosacárido (63%) y por Western-blot se identificaron diversas fracciones con reacción positiva a lectinas. En electroforesis de doble dimensión se encontraron cerca de 300 puntos con pesos moleculares entre 250 y 13 kDa y pl de 4.5 a 7. Por electroinmunotransferencia se identificó que los componentes glicoproteicos de 38, 34 y 27 kDa son reconocidos por anticuerpos de individuos infectados con el parásito y que cursan la fase crónica asintomática y sintomática de la enfermedad, por lo que el de 38 kDa se analizó por espectrometría de masas. Se concluye que los componentes del extracto están constituidos principalmente por glicoproteínas, de las cuales 3 son candidatos para su uso en técnicas de diagnóstico. Con la metodología empleada no fue posible determinar componentes específicos de fase clínica, aunque se encontró una asociación entre la presencia de alteraciones electrocardiográficas con reconocimiento de mas antígenos, especialmente de 27 a 34kDa, por lo que se sugiere ampliar los estudios al respecto.

ABSTRACT

Chagas disease shows a variety of clinical forms ranging from asymptomatic to severe heart failure and death. Although many efforts have been devoted to deciphering the mechanism that triggers injury are still unknown. The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, exposes several antigens to the mammalian host. Trying a soluble parasite extract, in the present work we found glycoproteins with molecular weights in the range 250 to 13 kDa wich react with Sypro Rubi and Pro Q Emmerald inks. We identify N-acetyl glucosamine as the main monosaccharide (63%) by mass spectrometry and affinity to lectins by Western-blot. 2-D Electrophoresis showed nearly 300 spots in the range 250 to 13 kDa and 4.5 to 7 pI. Western-blot were used to detect three main *T. cruzi* antigens of approximately 38, 34 and 27 kDa recognized by antibodies in sera from confirmed individuals in the chronic asymptomatic and symptomatic phase of Chagas disease. The study indicates that *T. cruzi* antigens from the soluble extract were mainly glycoproteins. Three of them could be used in diagnosis tests. We couldn't found clinical phase specific antigens but an association between electrocardiographic alterations and a richer pattern of antigens recognized.

INTRODUCCIÓN:

Trypanosoma cruzi es agente etiológico de la enfermedad de Chagas, padecimiento de gran importancia en Latinoamérica. La Organización Panamericana de la Salud estima que existen cerca de 7.7 millones de individuos infectados, el 20 % de la población de América Latina se encuentra en riesgo de adquirirla y en México podría haber 1 100 000 infectados y 28% de los habitantes están en riesgo de infección (1). La enfermedad está asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda y se encuentra ampliamente difundida en las áreas rurales de Latinoamérica y en los cinturones de pobreza alrededor de las grandes ciudades. Actualmente, se ha notificado con creciente frecuencia la transmisión por transfusión sanguínea, aun en países no endémicos, debido a los fenómenos masivos de migración (2).

Trypanosoma cruzi

Ubicación Taxonómica

T. cruzi (3) es un protozooario hemoflagelado perteneciente al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae que se caracteriza por presentar un solo flagelo, un núcleo y un kinetoplasto. Su reproducción es asexual, por fisión binaria. La clasificación taxonómica se detalla en la Figura 1.

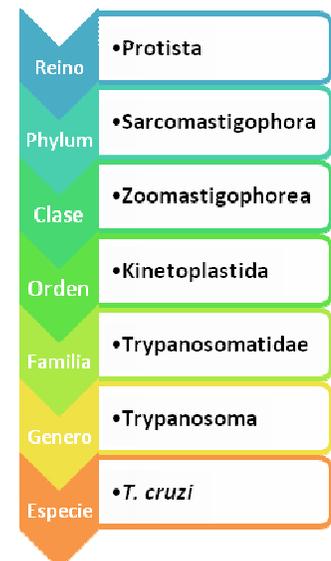


Figura 1
Clasificación taxonómica de
T. cruzi. Según Levine 1980

Durante su ciclo de vida se distinguen tres estadios morfológicos principales:

Amastigotes (del griego, a=sin, mastis=latigo/ flagelo), son redondeados, miden de 2 a 4 μm de diámetro, su flagelo es corto. Es la forma de reproducción dentro de las células del mamífero.

Epimastigotes (epi= anterior): son de forma oval alargada de 20 μm de largo; con el cinetoplasto en posición anterior al núcleo, de donde emerge el flagelo. Es la forma de reproducción en el insecto.

Tripomastigotes (tripo= perforar), es la forma infectiva, flagelada, móvil de 18 μm de largo y sin capacidad reproductiva; se encuentra en el huésped vertebrado (sanguíneo) y en el invertebrado (metacíclico) (4, 5).

Actualmente se ha llegado a un consenso sobre la nomenclatura intraespecífica de los subgrupos genéticos de *T. cruzi* en el cual se pueden dividir en seis unidades discretas de clasificación (DTU's por sus siglas en inglés) Tc I a Tc VI, y que pueden ser identificadas por un triple ensayo rDNA PCR y PCR-RFLP de los loci HSP60 y GPI, sin embargo no se descarta que posteriormente se revelen mas grupos (6).

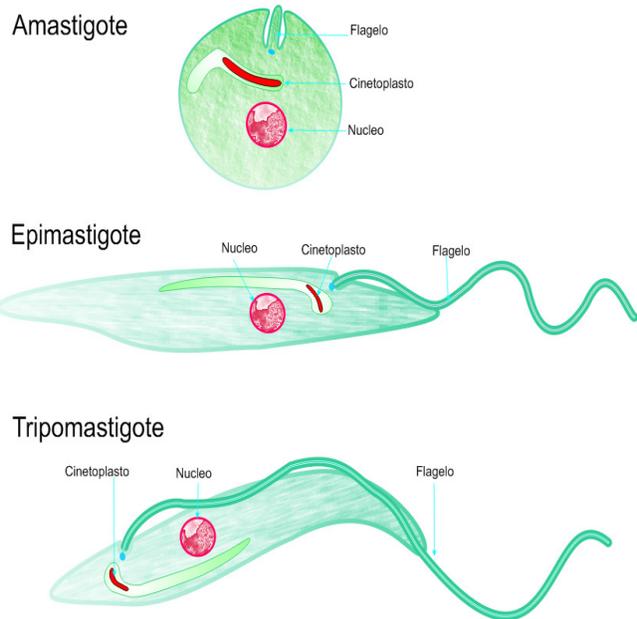


Figura 2. Principales estadios morfológicos de *T. cruzi*: a) amastigote b) epimastigote c) tripomastigote.

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo ya que alterna entre dos huéspedes, un mamífero y un invertebrado (Figura 3). El insecto vector es un reduvido hematófago de la familia Triatominae que se caracteriza por presentar 5 estadios ninfales y la forma adulta, en cualquiera de estas etapas puede infectarse y transmitir el parásito, aunque hasta la fecha no se ha reportado que se vea afectado por esta infección (7).

El huésped invertebrado (triatomino) ingiere sangre con tripomastigotes de un vertebrado infectado y una vez en su estómago se transforman en epimastigotes, se dividen por fisión binaria y se adhieren a las células intestinales; en la ampolla rectal, una proporción de epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos que son eliminados en las heces. Estos pueden penetrar a través de piel o mucosas del vertebrado y se adhieren a la superficie de las células.

T. cruzi ha desarrollado una estrategia de invasión celular muy particular, después de la unión con los receptores en la superficie de la célula huésped, el parásito induce una elevación local de la concentración de calcio en el citosol de la célula huésped, promoviendo la fusión de lisosomas, estos procesos permiten al parásito un rápido acceso al compartimento lisosomal y su internalización. Una vez dentro, el parásito secreta una enzima que remueve ácido siálico de las proteínas lisosomales y las transfiere a sus moléculas de superficie, cubriéndose con carbohidratos del huésped. Una ruta alternativa de entrada consiste en la invaginación independiente de actina, en la cual la fusión de lisosomas se da en un estadio tardío. Regularmente los patógenos intracelulares procuran evadir la exposición al ambiente proteolítico hostil de los lisosomas, sin embargo *T. cruzi* lo utiliza como su medio de entrada y de hecho se considera necesario para la secreción de la

molécula TcTox con actividad de hemolisina, que ayuda a la destrucción de la vacuola e incluso podría ser de importancia para la diferenciación a la forma de amastigote, en la cual realiza el proceso de división (8). Después de nueve rondas de replicación, se transforman en tripomastigotes, se incrementa el movimiento de los parásitos, contribuyendo a la ruptura de la célula huésped y la liberación de los tripomastigotes sanguíneos, que tienen la capacidad de invadir cualquier célula nucleada del mamífero (9, 10).

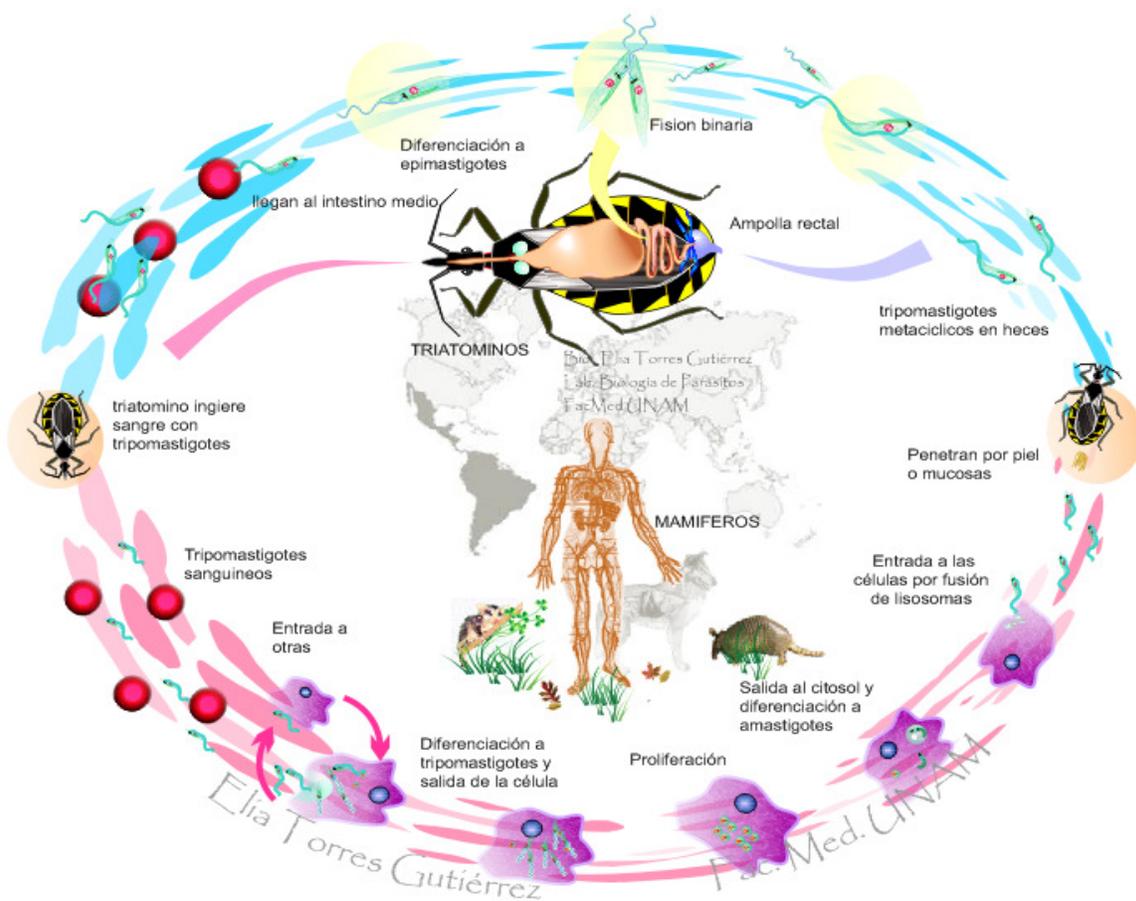


Figura 3.

Ciclo de vida de *T. cruzi*. Cuando el Triatomino transmisor ingiere sangre de un mamífero infectado, esta puede contener tripomastigotes, los cuales se transforman en epimastigotes en el intestino medio del insecto y se multiplican por fisión binaria longitudinal; algunos pasan a la ampolla rectal y se convierten en tripomastigotes metacíclicos que son expulsados con las heces y al entrar en contacto con la piel o mucosas de otro mamífero pueden penetrar hacia el torrente sanguíneo y son capaces de infectar las células nucleadas, donde se transforman en amastigotes y se dividen por fisión binaria; después de varios ciclos de replicación, terminan por lisar la célula y salen al torrente sanguíneo, en forma de tripomastigotes capaces de infectar nuevas células. Durante el tiempo que permanecen en circulación pueden ser ingeridos por un nuevo Triatomino.

ENFERMEDAD DE CHAGAS

Cuadro clínico

En la historia natural de la enfermedad de Chagas se han descrito las fases: aguda, crónica asintomática (anteriormente denominada indeterminada) y crónica sintomática.

La mayoría de los individuos, sin importar el mecanismo de transmisión, cursan asintomáticos o presentan manifestaciones inespecíficas durante la fase aguda. En la transmisión natural, se pueden encontrar signos del sitio de entrada del parásito, como son el chagoma de inoculación en la piel o el signo de Romagna cuando la entrada es por la mucosa ocular. La duración de esta etapa es de 8 semanas posteriores a la infección y se caracteriza por que los tripomastigotes se encuentran en sangre periférica y es mortal en aproximadamente 1% de los pacientes, afectando principalmente a ancianos y niños menores de 1 año (11).

Durante la fase crónica, las formas clínicas van desde la ausencia de signos y síntomas (asintomática o indeterminada) hasta formas leves o severas (crónica sintomática) que pueden ser de afectación cardíaca, digestiva o cardiodigestiva. En este periodo la parasitemia es escasa debido a la lenta multiplicación intracelular (12).

La forma cardíaca es la más grave y frecuente, la desarrolla aproximadamente el 30% de los individuos infectados y típicamente conlleva anormalidades en el sistema de conducción, bradi y taquiarritmias, aneurisma apical, tromboembolia, falla cardíaca y muerte súbita (7).

Diagnóstico

La presencia de formas parasitarias y la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* constituyen los elementos más relevantes para el diagnóstico de laboratorio.

Métodos Directos

Tienen como objetivo, detectar la presencia del parásito o alguno de sus componentes (antígenos o ácidos nucleicos). Los que sirven para demostrar la presencia del parásito en sangre, son de gran utilidad en la fase aguda de la enfermedad, cuando la parasitemia es elevada y constante (11). De los métodos moleculares el más empleado es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con la ventaja de que puede amplificar el ADN del parásito aun cuando se encuentre en pequeñas cantidades (13); sin embargo, a la fecha su uso aun no es recomendado para el diagnóstico masivo.

Métodos inmunológicos

Estos son útiles para demostrar la presencia de anticuerpos específicos generados por la infección, son de elección en la fase crónica. La OMS define para la confirmación del diagnóstico de la infección, demostrar reactividad en dos pruebas serológicas y recomienda el inmunoensayo enzimático (ELISA indirecta) por su alta sensibilidad, así como la inmunofluorescencia (IFI) y hemaglutinación indirectas (HAI) de reactividad intermedia (11). Existen otros métodos inmunológicos denominados no convencionales como es el Western-blot (electroinmunotransferencia), cuyo uso es limitado pero que actualmente se estudia su utilidad en la discriminación de casos dudosos (14-16).

ANTECEDENTES

Proteoma de *T. cruzi*

Las moléculas que más frecuentemente utilizan los organismos para responder al medio ambiente son las proteínas, dada su diversidad, sus funciones enzimáticas y la velocidad con que se puede modificar el proteoma que expresa en un momento dado. Hace poco tiempo se determinó la secuencia del genoma de los tres Tripanosomatidos de importancia médica; sin embargo, debido a la escasa homología que presentan con otros organismos secuenciados, cerca de la mitad del proteoma predictivo no tiene una función conocida y por lo tanto las proteínas resultantes son clasificadas como hipotéticas (17-19). En este contexto, se han realizado diversos acercamientos proteómicos que ofrecen evidencia experimental de la expresión genética de estos organismos a nivel de proteínas (20).

En 2003 Paba y colaboradores identifican 41 proteínas por ICAT (afinidad codificada por isótopos) de las cuales: 7 corresponden a organización celular, 7 a metabolismo y 12 a destino proteico; 29 mostraron una expresión conservada, 9 presentaron mayor expresión en tripomastigotes y 3 en amastigotes (21). En 2004 el mismo grupo realiza un análisis comparativo de los tres estadios del parásito por electroforesis 2-D, revelando que la mayoría de las proteínas presentan una expresión conservada entre los estadios, lo cual sugiere que las diferencias entre estos corresponden a la expresión diferencial de un número limitado de proteínas. Por espectrometría de masas (MALDI-TOF) se obtuvieron 26 fracciones que corresponden a 19 proteínas, la mayor parte de las cuales son estructurales y factores de elongación.

el huésped. *T. cruzi* es incapaz de sintetizar ácido siálico de novo. Se han encontrado otras proteínas de superficie tipo mucinas como el antígeno pequeño de superficie (TSSA) que presenta dos variantes alélicas sin cruce inmunológico que permiten diferenciar los dos linajes principales de *T. cruzi* por métodos serológicos. En el parásito, también se presentan proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASP) que se encuentran principalmente en tripomastigotes y se caracterizan por presentar una región central variable y dominios terminales (N- y C-) conservados unidos a un péptido señal y GPI respectivamente. Los GIPLs y LPPG presentan la estructura básica de GPI, excepto porque están altamente sustituidos con galactosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico; estos compuestos tienen la función de anclar proteínas a la superficie membranal (Figura 4) (23).

Respuesta Inmune contra *T. cruzi*

Durante las fases iniciales de la infección la inmunidad innata es crucial, ya que constituye la primera barrera contra el parásito. Las células del sistema inmune innato (macrófagos, células NK y dendríticas) son activadas por medio de los receptores tipo Toll (TLRs) que detectan patrones moleculares (PAMPs) como GIPLs, mucinas de superficie y DNA metilado rico en CyG desencadenando la producción de citocinas proinflamatorias (IL-12, TNF- α e INF- γ) y moléculas efectoras (intermediarios de nitrógeno reactivo o RNIs, GTPasas inducibles por INF) que controlan la replicación del parásito (24, 25). Al mismo tiempo, las células dendríticas funcionan como puente entre la inmunidad innata y adaptativa al producir IL-12 necesario para la diferenciación y expansión clonal de las células B plasmáticas, los linfocitos T CD4+ y CD8+ que a su vez producen INF- γ , activando mecanismos efectoras en macrófagos que permiten destruir amastigotes y tripomastigotes fagocitados; las células T

citotóxicas pueden destruir células infectadas, mientras que los anticuerpos producidos por las células B pueden lisar a los tripomatigotes extracelulares u opsonizarlos facilitando su fagocitosis (26).

Los mecanismos por los cuales el parásito es capaz de evadir la respuesta inmune son muy complejos y no completamente entendidos; existen varias teorías con el fin de explicar estos fenómenos que incluyen la complejidad y diversidad de los receptores requeridos por el parásito, mimetismo antigénico, supresión de la liberación de INF- γ por linfocitos Th1, activación policlonal de células T y B y producción excesiva de TNF (27).

Patogenia

La fase aguda de la infección, puede ser asintomática o sintomática y se asocia a una elevada parasitemia, parásitos en tejidos y activación de una intensa respuesta inmune caracterizada por citocinemia, activación policlonal de células T y B, esplenomegalia y una intensa reacción inflamatoria. Durante la fase crónica, la parasitemia y cantidad de parásitos en tejido son escasas y la mayor parte de los pacientes se encuentran asintomáticos; sin embargo, algunos de ellos (20-30%) evolucionarán a la forma sintomática, la cual se asocia a intensa inflamación local y escasos parásitos en los tejidos afectados(12).

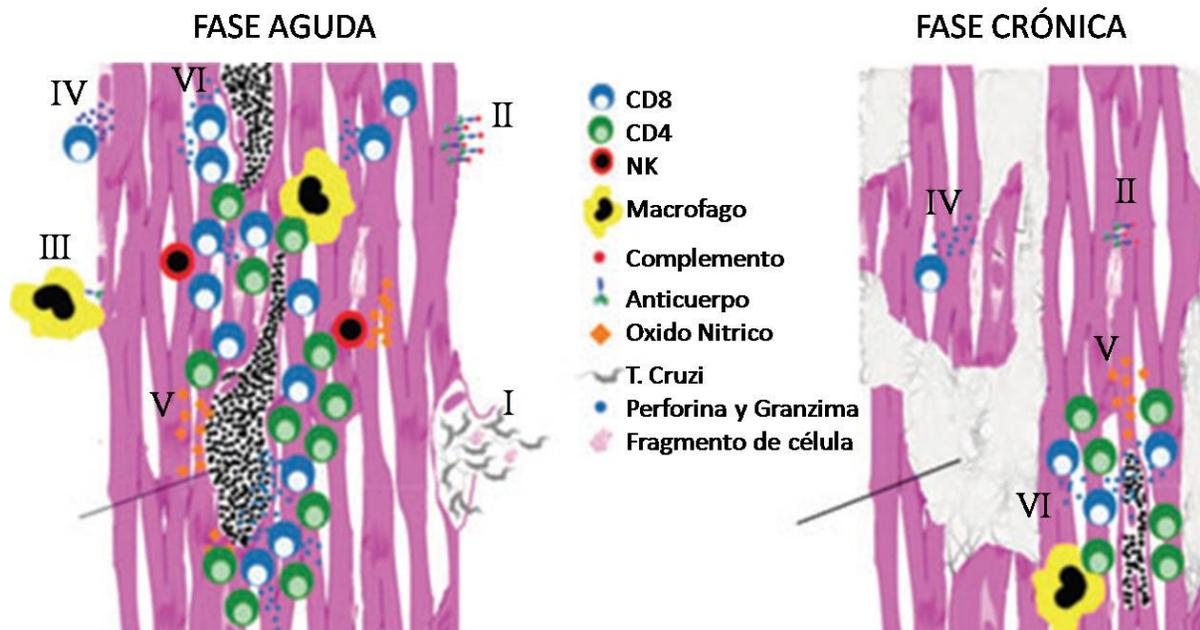


Figura 5. Inmunopatogénesis de la Enfermedad de Chagas.

I .Destrucción de cardiomiocitos, II . Generación de autoanticuerpos y activación del complemento, III . opsonización y activación de macrófagos, IV . Células T autorreactivas y destrucción del tejido cardíaco, V . Producción de NO, VI .Destrucción de células adyacentes. Tomado de Gutiérrez, 2009.

El daño tisular cardíaco en la enfermedad de Chagas inicia con la multiplicación de *T.cruzi* (Figura 5), lo cual lleva a la destrucción de cardiomiocitos (F5.I). Esto inicia una respuesta inmune específica contra el parásito e involucra la liberación de componentes celulares, llevando a una activación indirecta, a través de la cual se genera respuesta inmune contra los componentes celulares del huésped. Esta activación indirecta y mimetismo molecular entre los antígenos del huésped y del parásito generan autoanticuerpos (F5.II y III) y células T autorreactivas (F5.IV). Los autoanticuerpos pueden generar lesiones mediando la actividad del complemento (F5.II) y opsonizando tejidos para la activación de macrófagos (F5.III). Las células T CD8 autorreactivas reconocen antígenos propios y destruye tejido cardíaco (F5.IV). Los linfocitos T citotóxicos no solo destruyen células infectadas sino que contribuyen a la destrucción de células adyacentes (F5.VI). El daño de tejidos lleva a la producción de TNF- α , resultando en producción de óxido nítrico. La infección por *T. cruzi* también es capaz de

inducir la producción de óxido nítrico directamente, lo que ocasiona un extenso daño cardíaco (F5.V). El proceso patológico continúa durante la fase crónica de la infección. A pesar de la baja parasitemia se desarrollan focos progresivos de inflamación intrafascicular, que después de varios años terminan en fibrosis y desarrollo de miocardiopatía dilatada. En estadios avanzados de la enfermedad aparecen otros cambios patológicos incluyendo el desarrollo de trastornos de conducción, disautonomía, cardiomegalia, fibrosis, adelgazamiento de la pared ventricular y daño microvascular (12).

Diferencias entre las fases Crónica Asintomática y Crónica Sintomática

La enfermedad de Chagas evoluciona de una fase aguda relativamente corta y difícil de detectar a una fase crónica que puede durar el resto de la vida del individuo. De acuerdo a los criterios de la OMS, los individuos que cursan la fase crónica sintomática, se caracterizan por presentar serología positiva en al menos 2 pruebas, síntomas cardiovasculares y alteraciones cardíacas que se detectan por electrocardiograma y placas radiográficas de tórax. En la fase crónica cardíaca se pueden presentar diversas alteraciones que van desde leves, detectables solo por métodos muy sensibles, hasta los muy severos asociados a una elevada mortalidad (12).

Respecto a la respuesta inmune, se han detectado diferencias entre las fases crónica asintomática y sintomática, como la mayor concentración de citocinas proinflamatorias en la fase sintomática y expresión diferencial de cadenas del TcR y receptores de quimiocinas (Figura 6) (28).

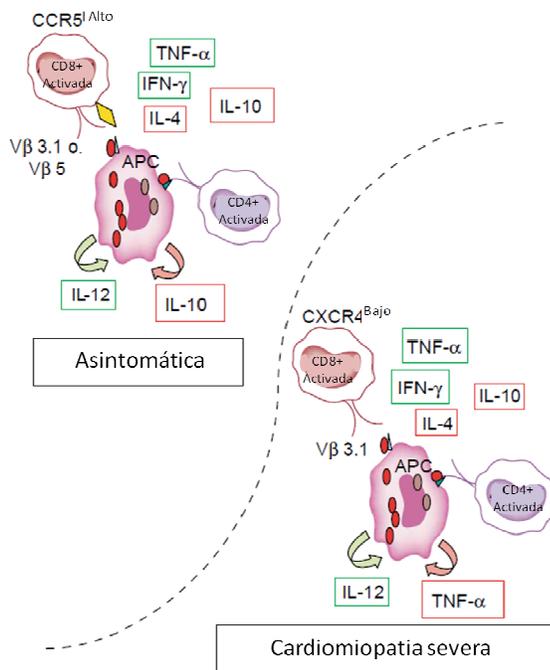


Figura 6. Principales diferencias inmunológicas entre las fases crónica asintomática y sintomática de la enfermedad de Chagas. El tamaño de los cuadros corresponde a la proporción en que se presentan las moléculas. Tomado de Dutra 2005.

La presencia de mayor concentración de IL-10 en asintomáticos revela una respuesta inflamatoria regulada, mientras que en individuos con cardiomiopatía chagásica se observa una respuesta inflamatoria intensa evidenciada por una mayor concentración de citocinas pro-inflamatorias como son IFN- γ (interferon gama) y TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). En el TcR de células T CD8+ se ha encontrado expresión preferencial de cadenas V β 3.1 o 5 en asintomáticos, mientras que en los enfermos solamente de V β 3.1; de igual forma se ha encontrado una relación inversa entre

función cardíaca y niveles de expresión de los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4. A pesar de conocer este perfil inmunológico diferencial, se desconoce si es causa o consecuencia de la evolución de la enfermedad (28).

Se han planteado diversas teorías sobre el desarrollo de la enfermedad cardíaca, destacando la presencia de fenómenos autoinmunes y la persistencia del parásito, sin ser mutuamente exclusivas (12).

Componentes antigénicos

T. cruzi presenta una amplia oferta antigénica para el huésped vertebrado, constituida principalmente por proteínas y glicoproteínas de superficie como las asociadas a mucinas (MASP) glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) y transialidasas; la presencia e inmunogenicidad de estas puede variar en los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito (29).

En el diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi* se han empleado, con relativo éxito, diversos antígenos que incluyen parásitos completos, extractos crudos, semipurificados o componentes puros. Se ha asociado el uso de extractos crudos con una alta sensibilidad; sin embargo, algunos presentan reacciones cruzadas, especialmente en casos de Leishmaniasis (30).

En un estudio donde se emplearon antígenos crudos obtenidos de las diferentes fases del parásito contra diferentes inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) de individuos infectados se encontró que los anticuerpos IgG reconocen al parásito en sus tres fases con mayor sensibilidad que IgM y se observó que la IgA permite reconocer los casos de enfermedad gastrointestinal (31).

En México se han reportado diversos trabajos en los que se realiza Western-blot con extractos de aislados nacionales y sueros de pacientes mexicanos, entre estos destacan: Bucio y colaboradores en 1999 empleando un extracto semipurificado, reportaron 5 componentes específicos para *T. cruzi* de 74, 44, 31, 25 y 18 kDa sin cruce inmunológico con *Leishmania mexicana* (32). Sanchez y colaboradores en 2001 empleando un extracto total, encuentran diversos patrones de reactividad, 12 proteínas fueron reconocidas por los sueros la mayoría de los pacientes infectados entre las que destacan por su inmunodominancia las de 30, 32, 40, 42, 65, 70 y 83 kDa (16). Ese mismo año, en un trabajo realizado con

pacientes del estado de Morelos, Rangel-Flores y colaboradores encuentran reconocimiento de entre 1 y 6 proteínas, destacando las de 74 y 40 kDa con reconocimiento por 86 % y 56 % de los sueros respectivamente (33).

También se ha propuesto el empleo de antígenos de excreción-secreción de tripomastigotes (TESA) con componentes entre 130 y 200 kDa y que presentaron buenos resultados en sueros de pacientes crónicos y con infección congénita (34). Diversos autores han optado por emplear antígenos recombinantes para el tamizaje serológico (35); sin embargo, la variación en la sensibilidad, especificidad, reactivos y procedimientos de estandarización reportados por algunos autores, indican un porcentaje de resultados no satisfactorios y se requiere confirmación por otros métodos (30, 36). Da Silveira y colaboradores en 2001 hicieron una revisión de los antígenos recombinantes disponibles y llegaron a la conclusión de que tienen una alta especificidad, pero se recomienda que se utilicen en paralelo con pruebas que empleen antígenos crudos para evitar perder sensibilidad (35). Recientemente se realizó un estudio multicéntrico en laboratorios de Brasil, Honduras y México; en el cual se evalúan sueros de pacientes mexicanos con diferentes pruebas, las cuales muestran resultados aceptables sin importar el origen del antígeno, incluso en las pruebas con antígenos recombinantes (37).

En la literatura se encuentran descritos diferentes componentes inmunogénicos de *T. cruzi* algunos de los cuales se mencionan en la tabla 1.

Tabla 1. Algunos componentes empleados en el diagnóstico de *T. cruzi*

Peso Molecular	Estadio del ciclo de vida	Características	
150-160 kDa	T, TESA	Proteínas de excreción secreción, con buena sensibilidad en el diagnóstico.	(34)
90kDa pl 5.0	E, Ts	Glicoproteína de superficie, inmunogénica, propiedades antifagocíticas	(38)
90 kDa	Tm	Se une a células de mamífero en un mecanismo mediado por receptores, no desencadena señales de Calcio	(39, 40)
75kDa pl 7.2	E, Ts	Glicoproteína de superficie, inmunogénica	(38)
67 kDa	E, T	Glicoproteína de superficie con actividad de unión a galactosa, involucrada en invasión celular Buena sensibilidad y especificidad en el diagnóstico	(41, 42)
60 kDa	T	Glicoproteína de superficie, inmunogénica, activa linfocitos.	(43)
60 kDa (57/51)		Cruzipaina, cistein proteasa más abundante en <i>T. cruzi</i> . inmunogénica	(44)
57kDa	E, Ts	Glicoproteína, producto primario de GP25	(45)
25kDa	E,T, A	Glicoproteína de superficie, inmunogénica,	(45)

T= tripomastigote, Tm= tripomastigote metacíclico, Ts= tripomastigote sanguíneo, E= epimastigote, A= amastigote

Diagnóstico serológico en las diferentes fases clínicas

Se ha estudiado también la posibilidad de emplear métodos serológicos, no solo para el diagnóstico de la infección, sino para diferenciar tempranamente la fase clínica que cursa el individuo. Gusmao y colaboradores determinaron niveles de anticuerpos contra *T. cruzi* en pacientes con Enfermedad de Chagas en fase crónica sintomática y asintomática, sin encontrar diferencias significativas (46). Primavera y colaboradores, trataron de determinar marcadores inmunológicos en pacientes en fase aguda y crónica mediante reactividad de las inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) con antígenos extraídos de amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes y relaciona la presencia de IgA con la enfermedad digestiva para lo cual proponen el empleo de antígenos extraídos de amastigotes, con lo que no detectan diferencias entre pacientes cursando las fases crónica asintomática y sintomática (31). En

otro estudio, comparan los patrones de reconocimiento de pacientes chagásicos contra extractos totales de *T. cruzi* y *T. rangeli* (tripanosomatido no patogénico en humanos) sin encontrar correlación entre algún patrón de reactividad o nivel de anticuerpos con la severidad de la enfermedad (47). Con el empleo de antígenos de excreción secreción de *T. cruzi* (TESA) en inmunoblot, se determinó que permiten detectar casos de Chagas congénito en fase aguda y que una banda muy ancha entre 150 y 160 kDa, es reconocida por sueros de pacientes crónicos (sintomáticos y asintomáticos), sin diferenciar entre estos últimos (34). Realizaron inmunoblot en 2 dimensiones empleando proteínas de excreción secreción como antígenos y encontraron que la isoforma de (pI) 6.4 se hace inmunodominante con la progresión de la enfermedad; sin embargo no diferencian entre fase crónica sintomática y asintomática (36). Por inmunotransferencia se identificaron los componentes de 46 y 58 kDa, reconocidos por pacientes chagásicos con alta sensibilidad y especificidad, sin apreciar un patrón antigénico característico de la fase clínica (15).

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas constituye un problema de salud pública, por la alta prevalencia, incidencia y población en riesgo en los países latinoamericanos; a la fecha, es también de importancia en países no endémicos, debido a los movimientos migratorios de individuos de regiones endémicas, lo cual señala la necesidad de promover el desarrollo y utilización de procedimientos diagnósticos adecuados.

El diagnóstico de la enfermedad en todas sus fases es de suma importancia; para la detección, evaluación terapéutica y el monitoreo en programas sanitarios de vigilancia y control del padecimiento.

En el diagnóstico serológico se han empleado diversos antígenos que incluyen parásitos completos, extractos crudos, semipurificados o componentes purificados. Se ha asociado el uso de extractos crudos con una alta sensibilidad, aunque es frecuente la existencia de reacciones cruzadas, especialmente en casos de Leishmaniasis. También se han descrito diversos componentes de origen glucoproteico empleados con fines diagnósticos que presentan un porcentaje de resultados no satisfactorios, por lo que se requieren otros métodos confiables de confirmación.

Por otra parte, se han caracterizado algunas diferencias en la respuesta inmune de las fases crónica asintomática y sintomática, pero a la fecha no existen métodos serológicos que permitan diferenciar estas fases clínicas de la enfermedad. Esto es importante debido a que el manejo clínico y pronóstico son diferentes (2).

HIPÓTESIS

Es posible detectar antígenos específicos para las diferentes fases clínicas de la enfermedad de Chagas mediante sueros de pacientes caracterizados clínica y serológicamente

OBJETIVOS

Identificar y caracterizar componentes proteicos detectados por sueros de individuos infectados con el parásito que cursan las fases indeterminada o crónica de la enfermedad
Determinar si existen componentes que permitan diferenciar entre estas dos fases clínicas

Objetivos específicos

Identificar individuos seropositivos a *Trypanosoma cruzi* que cursen la fases indeterminada o crónica sintomática de la enfermedad

Identificar por Western-blot los componentes proteicos inmunodominantes

Determinar los componentes compartidos y específicos de fase

Caracterización de los componentes seleccionados

METODOLOGÍA

Preparación del extracto proteico

El extracto proteico se obtuvo de la fase de epimastigote a partir del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi* proveniente del vector *Meccus pallidipennis* (Tequesquitengo, Morelos). El parásito fue cultivado y expandido en medio LIT enriquecido con suero fetal bovino al 10%, la cosecha se realizó a los 10 días, al final de la fase de crecimiento exponencial. La metodología de extracción se realizó acorde con lo descrito por Bucio en 1999 con algunas modificaciones, según se describe a continuación (32).

Después de la cosecha parasitaria, se realizaron cinco lavados con amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.2 a 3500 RPM (2500 *g*) a 4° C durante 20 min en centrífuga refrigerada (Sorvall ® modelo RT 6000 D); se cuantificó la masa parasitaria, se resuspendió en una solución de Tris HCL 50 mM pH 7.4 en dilución 1:4 y se agregaron los inhibidores de proteasas (Complete mini Roche ®) una pastilla por cada 10 ml de muestra.

La lisis y fraccionamiento parasitario se realizó por sonicación con un procesador ultrasónico (Vibra Cell VC50); se aplicaron 7 pulsos de 60 segundos a 40 watts en baño frío (hielo/etanol). Se centrifugó a 20 000 RPM (43 000 *g*) por 60 min a 4°C en centrifuga refrigerada (Sorvall RC 26 Plus); finalmente, se separó el sobrenadante y se conservó en tubos de 1.5 ml a -40°C hasta su empleo posterior.

Cuantificación de Proteínas Totales

La cuantificación de proteínas totales se realizó por el método del ácido bicinconínico con un reactivo comercial (Pierce ® BCA Protein Assay Kit, Termo Cientific). Las reacciones se realizaron en placas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano (Costar). Para las determinaciones, se construyó una curva patrón con albúmina sérica bovina con rango entre 25 y 2000 µg/ml; las muestras fueron diluidas con PBS pH 7.2 para obtener concentraciones dentro del rango de concentración proteica de los estándares. Se colocaron 25µl por pozo de los estándares y diluciones de la muestra por triplicado, posteriormente se agregaron 200µl de la solución de trabajo (mezcla de la solución A y B en proporción 50:1), se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min y se determinó la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro para microplacas con filtro de 580 nm (Microplate reader Bio Rad * modelo 550). Se graficaron los resultados (DO) de la curva patrón, se obtuvo la regresión lineal y se calculó la concentración de la muestra con la ecuación de la ordenada al origen ($y=mx+b$).

Determinación de Carbohidratos Totales

La concentración de carbohidratos totales se determinó por el método de Dubois (fenol-sulfúrico) (48). Se preparó una curva patrón con glucosa con concentraciones entre 20 y 100mg/ml; las muestras fueron diluidas con agua destilada para obtener una dilución dentro del rango de concentración de los estándares en un volumen de 1ml, posteriormente a cada estándar y muestra se les agregó 1ml de Fenol al 5% y se agitó durante 1 min; posteriormente se adicionaron 4 ml de H₂SO₄ concentrado en frío, se agitó durante 1 min y se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB Ultrospec Plus) a

una longitud de onda de 490nm. Se graficaron los resultados de la curva patrón y se obtuvo la regresión lineal. Se calculó la concentración de la muestra por medio de la ecuación de la ordenada al origen ($y=mx+b$).

Determinación del patrón electroforético del extracto

El patrón electroforético y el peso molecular de los componentes de los extractos se realizó en condiciones reductoras por electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida, en presencia de dodecil-sulfato de sodio (SDS-10%) (49). Se prepararon los geles separadores mezclando acrilamida/ bisacrilamida (30%/0.8%) en diferentes concentraciones (7.5, 10, 12.5 y 15%), amortiguador Tris 1.5 M (Tris [hidroximetil] aminometano) (Bio-Rad) pH 8.8, H₂O destilada, SDS (Sigma) al 10%, persulfato de amonio (Bio-Rad) al 10% y como catalizador Tetrametilendiamina TEMED (Bio-Rad). Los geles concentradores se prepararon con acrilamida/ bisacrilamida (30%/0.8%) al 5% y amortiguador Tris 0.5 M (Bio-Rad) pH 6.8.

Para la preparación de la muestra se utilizó el amortiguador de muestra de Laemmli (Bio-Rad) V/V sometándose a ebullición en baño maría durante 5 min. El marcador de peso molecular empleado, consistió de 10 proteínas de 10 a 250 kDa (Precision Plus Protein, Bio-Rad). Se colocaron las muestras en cada pozo y se utilizó un amortiguador de corrimiento constituido por Trizima base 0.025 M (Bio-Rad), Glicina 0.192 M (Sigma) y SDS al 0.1%, pH 8.3. La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial un constante de 150V/≈1.5 h en un equipo Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Al finaliza, los geles fueron fijados en una solución de metanol, agua, ácido acético en proporción de 5:4:1, y se tiñeron con azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad).

Tinción con pro Q Emerald (glicoproteínas)

La tinción para las proteínas glicosiladas previamente separadas por SDS-PAGE, se realizó con proQ Emerald 300 (50). Inicialmente, el gel fue fijado con una solución metanol 50%/ácido acético 5% en agua destilada durante 45 min en agitación ligera; se lavó con ácido acético glacial al 3% en agua destilada (2/20 min), se incubó en 500 ml de solución oxidante (ácido acético al 3%- ácido periódico) durante 30 min y se lavó con ácido acético glacial al 3% durante (3/20 min). Los geles se incubaron en la solución de tinción pro-Q Emerald 300 (Multiplex Proteomics) durante 2 h en agitación y se lavaron con ácido acético glacial al 3% (2/20 min). Las glicoproteínas fueron visualizadas con una excitación máxima a 280nm y una emisión máxima de 530nm.

Tinción con Sypro Ruby (proteínas)

Después de la detección de las glicoproteínas con Pro Q Emerald, los geles fueron teñidos con Sypro Ruby (Multiplex Proteomics) (50, 51); este colorante compuesto de rutenio y un complejo orgánico, interactúa con las proteínas por mecanismos electrostáticos, es ultrasensible y luminiscente. El gel se fijó en metanol 50%- ácido acético 7% en agua destilada durante 30 min en agitación ligera; posteriormente fue lavado con agua ultrapura (3/10 min) y se incubó en la solución de tinción Sypro Ruby durante toda la noche en oscuridad y agitación constante; se lavó en una solución 10% metanol -7% ácido acético (2/30 min). Las proteínas fueron detectadas a una excitación máxima de 280/ 450nm y a una emisión máxima cercana a los 610 nm.

Composición de carbohidratos

La composición de carbohidratos del extracto de *T. cruzi* fue determinada por cromatografía de gases (52). El extracto del parásito fue dializado con agua destilada durante 48 h a 4°C y liofilizado. Posteriormente, 100µg de muestra (peso seco) fue sometida a hidrólisis con metanol/HCl 5N durante 24h a 100°C, se dejó enfriar y se neutralizó con AgNO₃, pH 6.0. Posteriormente las moléculas fueron reacetiladas con anhídrido acético en oscuridad absoluta durante toda la noche y se extrajeron los ácidos grasos con heptano. La muestra se secó con una corriente de N₂, se resuspendió en piridina y los alditoles liberados se derivaron con trifluoroacético. El análisis de los derivados trifluoro-acetil alditoles se realizó en un cromatógrafo de gases mod. Varian 2100 (Université Paris-Sud 11, Orsay, France) equipado con un detector de ionización de flama.

Electrotransferencia revelada con lectinas

Después de transferir el gel a una membrana de nitrocelulosa, esta fue bloqueada con albúmina sérica bovina (ASB) al 5% (SIGMA), TBS pH 7.4 / Tween 20 (2%) durante 1 hora a temperatura ambiente (53). Después de bloquear la membrana se realizaron tres lavados rápidos con TBS pH 7.4 / Tween 20 (2%) y se incubaron con las lectinas que se muestran en la tabla 2.

Las lectinas fueron proporcionadas por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de medicina de la UNAM y se utilizaron en dilución 1:25 000 en TBS / Tween20 (2%) en agitación constante durante 3 h. a temperatura ambiente y 9 h. a 4°C. Se realizaron cinco lavados de 10 min a temperatura ambiente con TBS – Tween 20 al 2% en agitación ligera. En el caso de Con A y WGA, las lectinas estaban conjugadas a peroxidasa por lo que se revelaron inmediatamente. En el caso de las lectinas biotiniladas MAA, SNA, ALL, MRL y MEA las membranas fueron incubadas con estreptovidina conjugada a peroxidasa (Pierce) a una dilución 1:10 000 durante 2 h. Se lavaron 5 veces durante 10 min con TBS – Tween 20 al 2% en agitación ligera. Todas las membranas se revelaron con la solución de detección (ECL Western blotting detection reagents; Amersham Biosciences) durante 2 min a temperatura ambiente; después de lo cual las membranas de nitrocelulosa fueron expuestas a placas de autoradiografía (Kodak) y se revelaron.

Tabla 2. Lectinas empleadas y sus principales características (54).

lectina	PM (kDa)	Afinidad
<i>Canavalia ensiformis</i> Con A	26	α -D-Man, α -D-Glc
<i>Triticum vulgare</i> WGA	36	N-acetil β -D-glucosamina
<i>Maackia amurensis</i> MAA	35 – 40	Neu5Ac α -2,3-Gal/GalNAc
<i>Sambucus nigra</i> SNA	36 – 38	Neu5Ac α -2,6-Gal/GalNAc
<i>Amaranthus leucocarpus</i> ALL	35	Gal β -1,3GalNAc α -1,0-Ser/Thr
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> MRL	19	Neu5,7,9Ac2

Electroforesis en dos dimensiones

Para realizar la electroforesis en dos dimensiones, el extracto fue preparado mediante precipitación con TCA/Acetona. Se mezcló el extracto proteico con acetona fría al 100% y ácido tricloroacético (TCA) 100% en proporción 1:8:1 y se incubó 1 h a -20°C . Posteriormente se centrifugó a 11500 RPM durante 15 min a 4°C , se lavo 2 veces con acetona fría, se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en amortiguador de muestra 2-D (Urea 7M, Thiourea 2M, CHAPS 4%, amortiguador IPG 4-7 2%, DTT 40 mM y agua bidestilada). Se dejó estabilizar la solución por 1 h a temperatura ambiente, agitando cada 10 min y finalmente se transfirió a un tubo de 2 ml para ser conservado a -40°C hasta su uso.

La separación proteica por punto isoelectrico (pI) y peso molecular se realizó con base en el sistema de O'Farrell (5). La primera dimensión se realizó en tiras IPG de 13 cm con un rango de separación por punto isoelectrico (pI) de 4 a 7. Las tiras fueron hidratadas durante toda la noche con solución de rehidratación (Destreak rehydration solution) con IPG Buffer 4-7 al 2% y 200 μg del extracto proteico previamente preparado. Se corrió en un equipo Multiphor II de GE en tres pasos, acumulando un total de 16 a 21 KVh.

Una vez enfocada la tira, se procedió a equilibrarla para realizar la segunda dimensión, para lo cual, se colocó en agitación suave por 15 min con amortiguador de equilibrio SDS (Urea 6M, Glicerol 29.3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002% en 200ml de agua bidestilada) con 1% de DTT y en un segundo paso por 15 min con amortiguador de equilibrio SDS con 2.5 % de Iodacetamida. La segunda dimensión se corrió en un gel comercial pre-hecho con acrilamida al 12.5% (ExcelGel SDS homogeneous 12.5 GE 80126101), con un marcador de peso molecular de amplio rango (Precision Plus Protein Standards, BIO-RAD 161-0374). Se corrió en un equipo Multiphor II en dos pasos con las siguientes condiciones: 120 V, 20 mA, 30 W por 40 min y 600 V, 50 mA, 30 W por 70 min. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad). Los componentes se analizaron con el software PDQuest (Bio-Rad). Estos procedimientos se realizaron en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.

Obtención de sueros humanos

Los individuos positivos a la infección por *T. cruzi*, mexicanos menores de 18 años, fueron identificados mediante serología convencional, el criterio de seropositividad se determinó con reactividad en 2 técnicas realizadas en el Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM (ELISA indirecta e Inmunofluorescencia indirecta), según marcan los lineamientos de la OPS/OMS. La fase clínica de la enfermedad, se determinó con base en los hallazgos obtenidos en el estudio clínico-cardiológico que consistió en historia clínica diseñada *ad-hoc* y estudio electrocardiográfico realizado a cada individuo; la interpretación electrocardiográfica, se realizó en el Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chavez”. Adicionalmente, se obtuvieron sueros de individuos no infectados con este parásito (controles de la misma edad y procedencia) y de individuos con diagnóstico de

leishmaniasis cutánea localizada y leishmaniasis cutánea diseminada, causadas por el parásito filogenéticamente cercano *Leishmania spp.* y que comparte zonas de distribución geográfica. Estos últimos sueros, fueron proporcionados por la Dra. Ingerborg Becker del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. Se realizó el análisis estadístico para determinar sensibilidad y especificidad de los procedimientos.

Determinación de componentes inmunodominantes y evaluación del Western-blot para diagnóstico

Los ensayos de Western-blot se realizaron siguiendo en términos generales el procedimiento descrito por Towbin (53). Después del corrimiento electroforético, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa con poro de 0.45 µm en un aparato Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer (Bio-Rad®) a una diferencia de potencial constante de 15 volts durante 30 min. Una vez concluida la transferencia, la nitrocelulosa fue bloqueada con PBS/Tween 20 0.3%/leche 5% durante 2 h a temperatura ambiente en agitación ligera. Se realizaron 3 lavados y se incubaron los sueros reactivos y no reactivos a *T. cruzi* (primer anticuerpo) en dilución 1:200 con PBS/Tween 20 0.3%/leche 5% a 4°C en agitación ligera durante la noche. Se realizaron tres lavados y posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo, anti IgG humana conjugado a peroxidasa (Zymed) en dilución 1: 20 mil con PBS/Tween 20 0.3% durante 2 h a temperatura ambiente en agitación ligera. Se realizaron 5 lavados y se reveló con el sustrato DAB (3,3' Diaminobenzidina) (Bio-Rad) en oscuridad durante 15 min. La reacción se detuvo con agua destilada.

Para determinar las concentraciones óptimas para realizar este procedimiento con fines diagnósticos, se emplearon diferentes concentraciones del primer y segundo anticuerpo. La

interpretación se basó en los criterios establecidos por Teixeira (14, 55) donde se considera un suero positivo cuando existe reconocimiento de 5 o más componentes proteicos, no concluyente cuando se presentan de 1 a 4 y negativo cuando no reconoce ninguno. Una vez estandarizado el procedimiento, se determinó el peso molecular de los componentes detectados por sueros de individuos seropositivos; se realizó el procedimiento con los sueros de los individuos cursando clínicamente las fases crónica asintomática y sintomática de la enfermedad, así como en los negativos para *T. cruzi* y reactivos a *L. mexicana*. Se obtuvieron los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba con los sueros empleados, para lo cual se realizó una tabla de contingencia y se utilizaron las fórmulas que se describen a continuación (56).

Tabla de contingencia:

		ESTÁNDAR DE ORO (Positividad a dos pruebas convencionales)	
		+	-
PRUEBA A EVALUAR (Western-blot)	+	VP	FP
	-	FN	VN

Donde:

VP: Verdaderos positivos (Reactivo con ambas pruebas)

FP: Falsos positivos (No reactivo con el estándar de oro y Reactivo con la prueba a evaluar)

FN: Falsos negativos (Reactivo con el estándar de oro y No Reactivo con la prueba a evaluar)

VN: verdaderos negativos (No reactivo en ambas pruebas)

Sensibilidad = $\frac{VP}{VP + FN} \times 100$

Especificidad = $\frac{VN}{FP + VN} \times 100$

Electroinmunotransferencia a partir de geles en dos dimensiones

Después de realizar la electroforesis en dos dimensiones, por el procedimiento previamente descrito, los geles fueron separados de la base plástica en que se encontraban y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con poro de 0.45 μm en un aparato Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer (Bio-Rad®) a una diferencia de potencial constante de 15 volts durante 90 min. Una vez concluida la transferencia, la nitrocelulosa fue bloqueada con PBS/Tween 20 0.3%/leche 5% durante 2 h a temperatura ambiente en agitación ligera. Se realizaron 3 lavados y se incubaron los sueros seleccionados de pacientes en fase crónica sintomática y asintomática de la enfermedad de Chagas (primer anticuerpo) en dilución 1:400 con PBS/Tween 20 0.3%/leche 5% a 4°C en agitación ligera durante la noche. Se realizaron tres lavados y posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo, anti IgG humana conjugado a peroxidasa (Zymed) en dilución 1:20 mil, durante 2 h a temperatura ambiente en agitación ligera. Se realizaron 5 lavados y se reveló por quimioluminiscencia, empleando los reactivos SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo scientific).

Determinación de componentes proteicos inmunodominantes compartidos y específicos de fase indeterminada o crónica

Se determinó el peso molecular de los componentes reconocidos por los sueros de pacientes seropositivos y se calcularon estadísticamente la media y mediana del número de componentes detectados en cada una de las fases; también se obtuvo el porcentaje de presencia de cada uno de los componentes y se comparó entre ambas fases clínicas.

Caracterización por MALDI-TOF

Después de la electroforesis en una dimensión, la banda seleccionada fue escindida del gel con una hoja de bisturí y sometidas a digestión con 0.05 mg de tripsina en 500 µl de bicarbonato de amonio, pH 8.0 por 24 h, 37° C y después a 2° C durante 4 h para inhibir la actividad enzimática. La mezcla fue secada por evaporación usando un evaporador de centrifuga "Gyrovap" (Howe, Londres) y preparada mezclando directamente en la matriz 1 ml del producto de reacción (50 pM) y 1 ml de ácido 2,5-dihidroxibenzoico, la mezcla se dejó cristalizar a temperatura ambiente. Los iones positivos de los péptidos fueron detectados por su tiempo de vuelo, en un espectrómetro de masas Visión 2000 (MALDI-TOF, Finnigan MAT Bremen, Germany) equipado con un lector UV a 337 nm. Los espectros de masa fueron determinados en modo reflectrón bajo 8 keV de voltaje de aceleración y detección positiva. Como controles se utilizaron muestras de Tripsina para identificar sus péptidos que forman el fondo del experimento y Angiotensina como estándar (Mr 296.7). Las masas de los iones fueron comparadas con las bases de datos UniProtKB/Swiss-Prot y UniProtKB/TrEMBL (Expasy <http://www.expasy.org/cgi-bin/aldente/form.cg>).

RESULTADOS

Concentración de proteínas y carbohidratos totales del extracto

La determinación de proteínas y carbohidratos totales se realizó por los métodos del ácido bicinconínico y fenol sulfúrico de Dubois respectivamente. Los resultados obtenidos (Tabla 3) muestran una concentración cerca de 10 veces mayor de proteínas que de carbohidratos.

Tabla 3. Concentración de proteínas y carbohidratos totales del extracto de *T. cruzi*

Proteínas	6.65 mg/ml
Carbohidratos	0.70 mg/ml

SDS-PAGE del extracto proteico

El análisis del patrón electroforético, mostró componentes entre 10 y 250 kDa. Se destacan aquellos con pesos moleculares de 90, 80, 65, 46, 44, 38, 35, 32, 27 y 24 kDa. Como se observa en la figura 7, la mayoría de los componentes puede observarse en el gel con acrilamida al 12.5%.

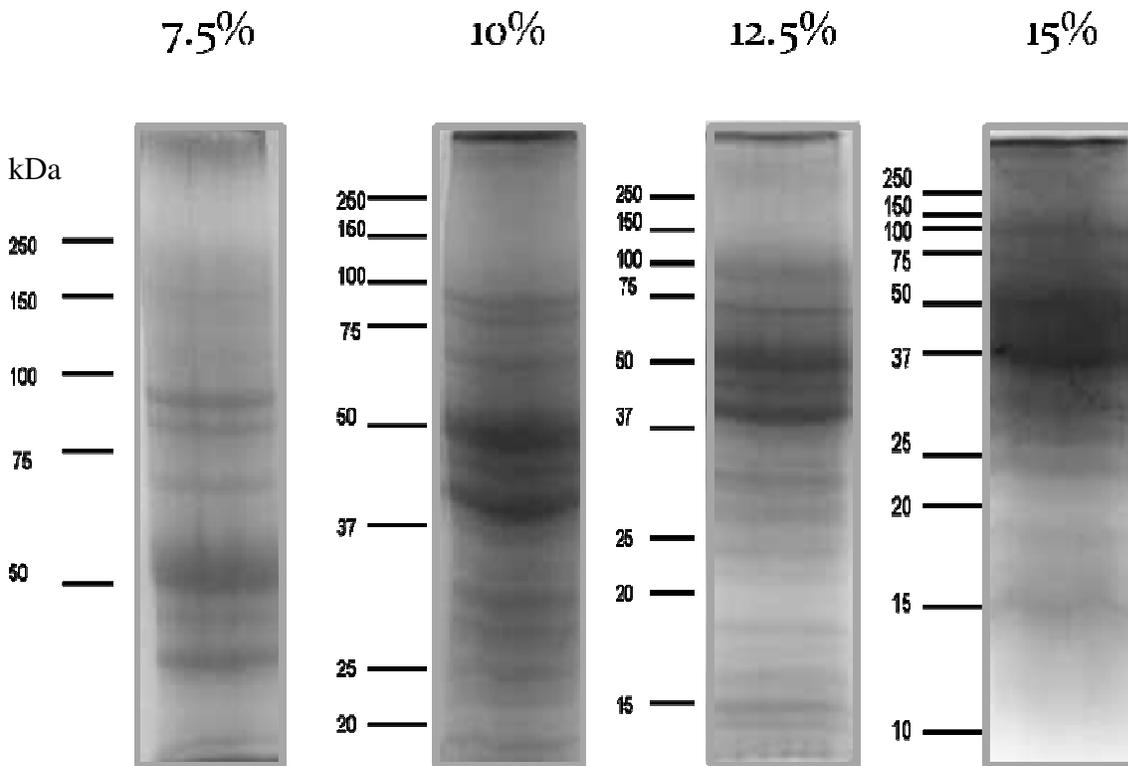


Figura 7 Patrón electroforético del extracto de el aislado TQ de *T. cruzi* con 100µg de proteína por carril en SDS-PAGE con acrilamida en diferentes concentraciones: 7.5%, 10%, 12.5% y 15%. .Marcador de pesos moleculares Bio-rad

Tinción con pro Q Emerald (glicoproteínas) y Sypro Ruby (proteínas), en geles de poliacrilamida

El patrón de proteínas obtenido con la tinción con Sypro Ruby, figura 8 (derecha), permitió la identificación de un total de 13 proteínas entre 79 y 11 kDa, con pesos moleculares de 75,

71, 64, 53, 40, 38, 30, 27, 22, 20, 18, 14 y 13 kDa. La región entre 50 y 37 kDa presentó mayor abundancia proteica, a diferencia de las proteínas de alto peso molecular. Para determinar proteínas glicosiladas, se realizó tinción con el reactivo proQ Emerald para ser comparado con el perfil obtenido en la tinción con Sypro Ruby. En el patrón de glicoproteínas, figura 8 (izquierda) se identificaron un total de 15 componentes ubicados entre 250 y 13 kDa, con pesos moleculares de 250, 75, 71, 64, 53, 40, 38, 34, 30, 27, 22, 20, 18, 14 y 13 kDa. La región donde se observó la mayor abundancia de glicoproteínas fue entre 55 y 25 kDa (Figura 8). Todas las proteínas reveladas con Sypro Ruby fueron también identificadas con la tinción con el proQ Emerald.

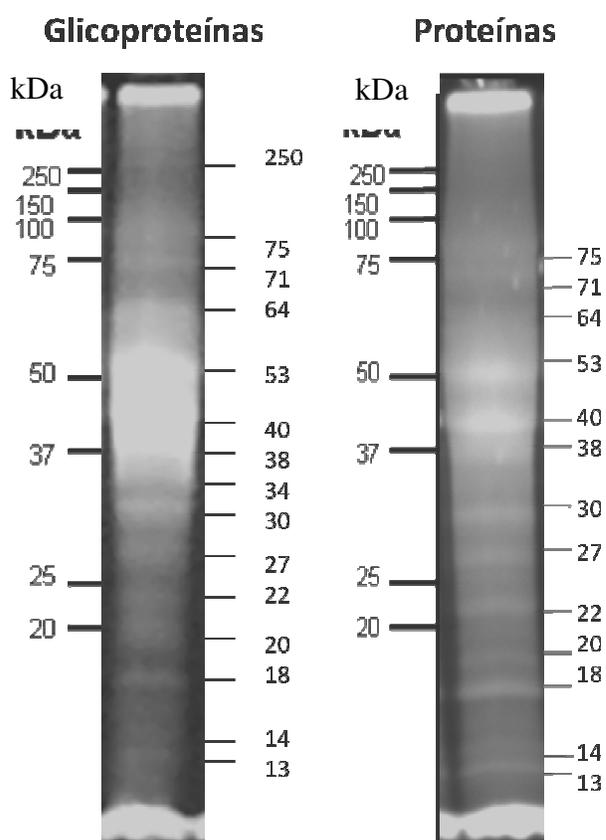


Figura 8. Tinción de glicoproteínas con proQ Emerald y proteínas con Sypro Rubi. Extracto del aislado TQ en SDS-PAGE al 12.5% de acrilamida, 200 µg de proteína por carril.

Composición de Carbohidratos

La composición de carbohidratos presentes en el extracto proteico total, se determinó por cromatografía de gas. Los resultados muestran la presencia de varios monosacáridos tales como Galactosa (Gal), Manosa (Man), Glucosa (Glc), N-acetil glucosamina (GlcNAc), Xilosa (Xyl) y Ribosa (Rib). Por otra parte, no se identificó la presencia de Fucosa (Fuc), N-acetil galactosamina (GalNAc), Ac Neuraminico (NeuAc), Ramnosa (Rham), Arabinosa (Ara), ácido glucu y galactourónico (GlucUA y GalUA). Los porcentajes totales calculados, muestran que el carbohidrato más abundante es GlcNAc con un 63.62%, según se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de monosacáridos obtenidos por cromatografía de gas a partir del extracto proteico total.

<u>Fuc</u>	0%
<u>Gal</u>	11.90%
<u>Man</u>	9.53%
<u>Glc</u>	9%
<u>GalNAc</u>	0%
<u>GlcNAc</u>	63.62%
<u>NeuAc</u>	0%
<u>Xyl</u>	0.73%
<u>Rham</u>	0%
<u>Ara</u>	0%
<u>Rib</u>	5.18%
<u>GlucUA</u>	0%
<u>GalUA</u>	0%

Ensayos con Lectinas

Para identificar a que glicoproteínas presentes en los extractos corresponden los diversos carbohidratos identificados, se realizó un ensayo de electrotransferencia revelado con

diferentes lectinas. Se identificaron para *Canavalia ensiformis* (Con A) 12 glicoproteínas entre 79 y 11 kDa siendo más aparentes las de 27, 24 y 18 kDa; para *Triticum vulgaris* (WGA) se identificaron 14 glicoproteínas de los siguientes pesos moleculares de entre 90 y 11 kDa siendo más aparentes las de 79, 72, 70, 63, 41 y 27 kDa; para *Maackia amurensis* (MAA), *Sambucus nigra* (SNA), *Amaranthus leucocarpus* (ALL) y *Macrobrachium rosenbergii* (MRL), se presentó reconocimiento principalmente para 4 glicoproteínas de 250, 150, 100 y 67 kDa y en el caso de SNA, una más de 81 kDa. En la figura 9 se muestran los componentes reconocidos por las diferentes lectinas.

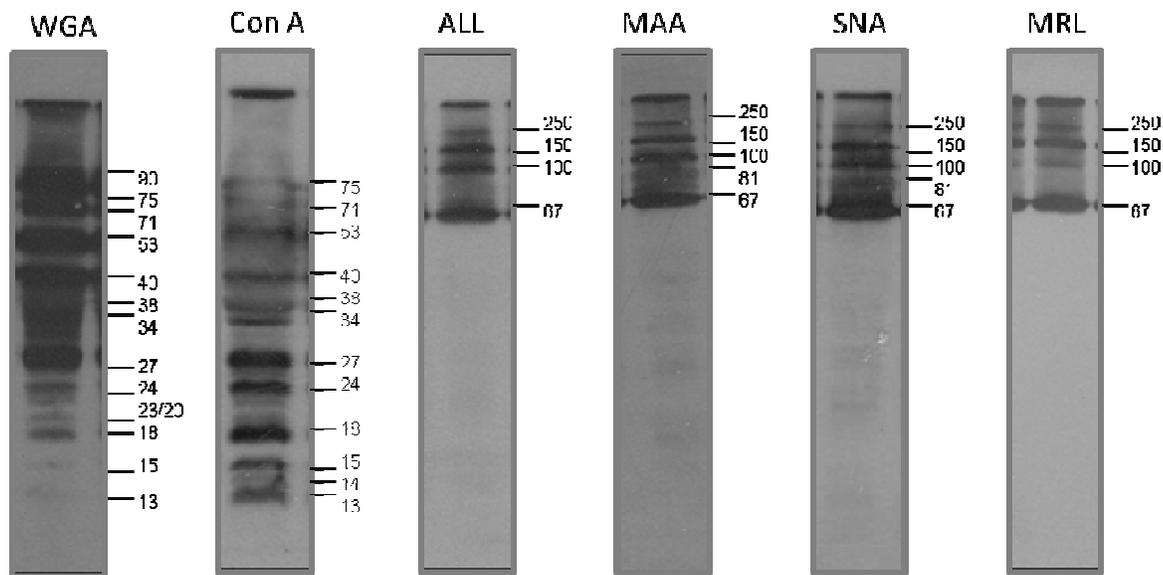


Figura 9. Reconocimiento de las lectinas: Con A, WGA, MAA, SNA, ALL y MRL por los componentes del extracto proteico del aislado TQ de *T. cruzi* en SDS-PAGE 12.5%, 100µg de proteína por carril.

Electroforesis 2D

El análisis del gel, mostró aproximadamente 300 puntos, los cuales como se observa en la figura 10, se encuentran principalmente entre los 25 y 100 kDa con pI entre 4.5 y 7.

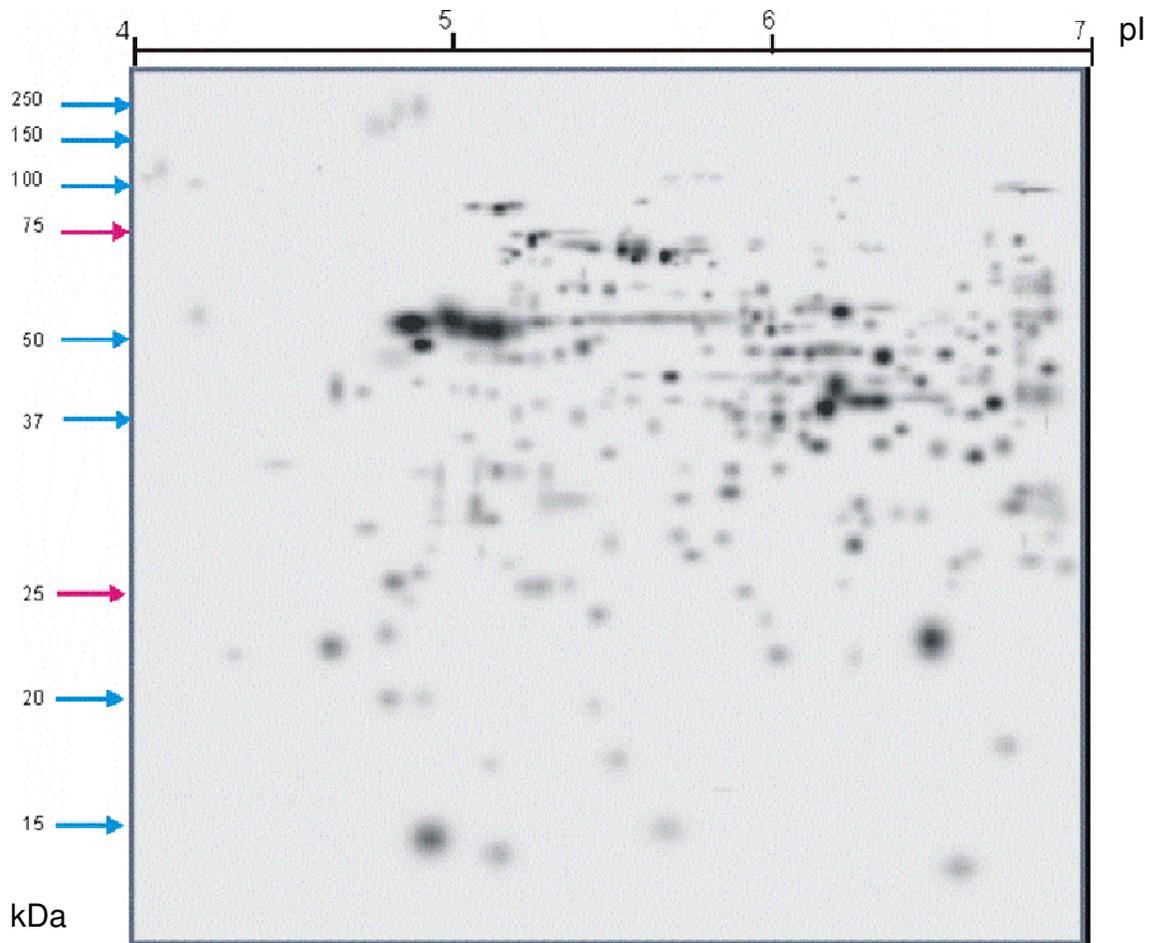


Figura 10. Electroforesis 2D con 500 μ g de proteína del extracto proteico del aislado TQ de *T. cruzi*. Rango de pI 4-7, gel de acrilamida al 12.5% Teñido con azul de Coomasie.

Obtención y selección de sueros

Se seleccionaron 17 sueros reactivos a *T. cruzi*, todos de mexicanos menores de 18 años. Siete de los cuales, fueron obtenidos de pacientes diagnosticados en fase crónica asintomática y diez de pacientes en fase crónica sintomática, acorde con los criterios establecidos por la OMS (28, 57). Adicionalmente se obtuvieron 4 sueros de pacientes negativos a la infección y 1 suero positivo de un individuo con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y otro de Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) para descartar cruce inmunológico con la infección por *Leishmania spp.* En la tabla 5 se muestran los datos empleados para la clasificación de las muestras.

Tabla 5- Datos empleados para la clasificación por fase clínica de los pacientes

Folio	Seropositividad a <i>T. cruzi</i>	Presencia de síntomas	Alteraciones electrocardiográficas	Fase Clínica
1	Si a 2 pruebas	Si	Si	Crónica Sintomática
2	Si a 2 pruebas	Si	Si	Crónica Sintomática
3	Si a 2 pruebas	Si	Si	Crónica Sintomática
4	Si a 2 pruebas	Si	Si	Crónica Sintomática
5	Si a 2 pruebas	Si	Si	Crónica Sintomática
6	Si a 2 pruebas	No	Si	Crónica Sintomática
7	Si a 2 pruebas	Si	Si	Crónica Sintomática
8	Si a 2 pruebas	Si	Si	Crónica Sintomática
9	Si a 2 pruebas	Si	Si	Crónica Sintomática
10	Si a 2 pruebas	Si	Si	Crónica Sintomática
11	Si a 2 pruebas	No	Normal	Crónica asintomática
12	Si a 2 pruebas	No	Normal	Crónica asintomática
13	Si a 2 pruebas	No	Normal	Crónica asintomática
14	Si a 2 pruebas	No	Normal	Crónica asintomática
15	Si a 2 pruebas	No	Normal	Crónica asintomática
16	Si a 2 pruebas	No	Normal	Crónica asintomática
17	Si a 2 pruebas	No	Normal	Crónica asintomática
18	No	No	Normal	No infectado
19	No	No	Normal	No infectado
20	No	No	Normal	No infectado
21	No	No	Normal	No infectado
22	Seropositivo Leishmania			Leishmaniosis cutánea localizada
23	Seropositivo Leishmania			Leishmaniosis cutánea diseminada

Western-blot

Se determinó que la cantidad adecuada de proteínas por pozo es de 20 μ g, la membrana se incubó con el suero en dilución 1:300 y el anticuerpo anti IgG conjugado a peroxidasa, en dilución 1:20 mil. El procedimiento se realizó con los 23 sueros (17 reactivos, 4 no reactivos y 2 reactivos a *L. mexicana*).

Todos los sueros positivos mostraron concordancia reactiva con el Western-blot, cuyos patrones de reconocimiento se muestran en la Figura 11a; los sueros no reactivos y de individuos infectados con *Leishmania* que se muestran en la Figura 11b no mostraron reconocimiento a ningún componente por lo que el análisis mostró sensibilidad y especificidad de 100% .

Se cuantificó el número de fracciones identificadas por cada uno de los sueros reactivos y como se muestra en la tabla 6, ninguno de los cuales presento un resultado de interpretación no concluyente (de 1 a 4 componentes reconocidos). Se determinó que el 50% de los sueros de individuos crónicos sintomáticos reconocen más de 15 fracciones de diferentes pesos moleculares, mientras que el 71.4% de los asintomáticos reconocen entre 10 y 14 fracciones.

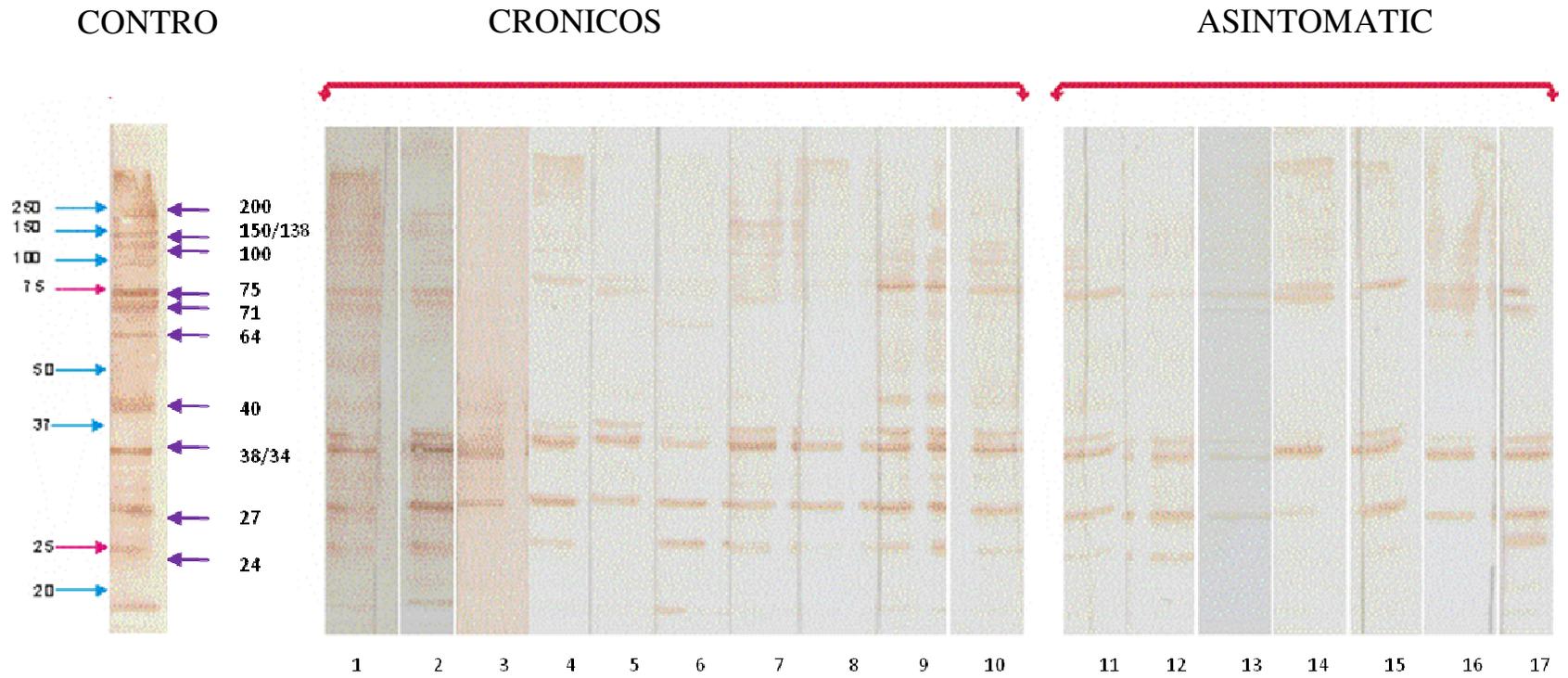


Figura 11a. Componentes proteicos reconocidos por los sueros reactivos a *T. cruzi*; 10 de individuos en fase crónica sintomática y 7 en fase asintomática. Al extremo izquierdo, como control, se muestra el reconocimiento con un pool de sueros reactivos. SDS-PAGE 12.5 % de acrilamida del extracto proteico del aislado TQ de *T. cruzi* con 20 µg de proteína por carril, Segundo anticuerpo Anti IgG conjugada a peroxidasa revelado con 3,3 DAB.

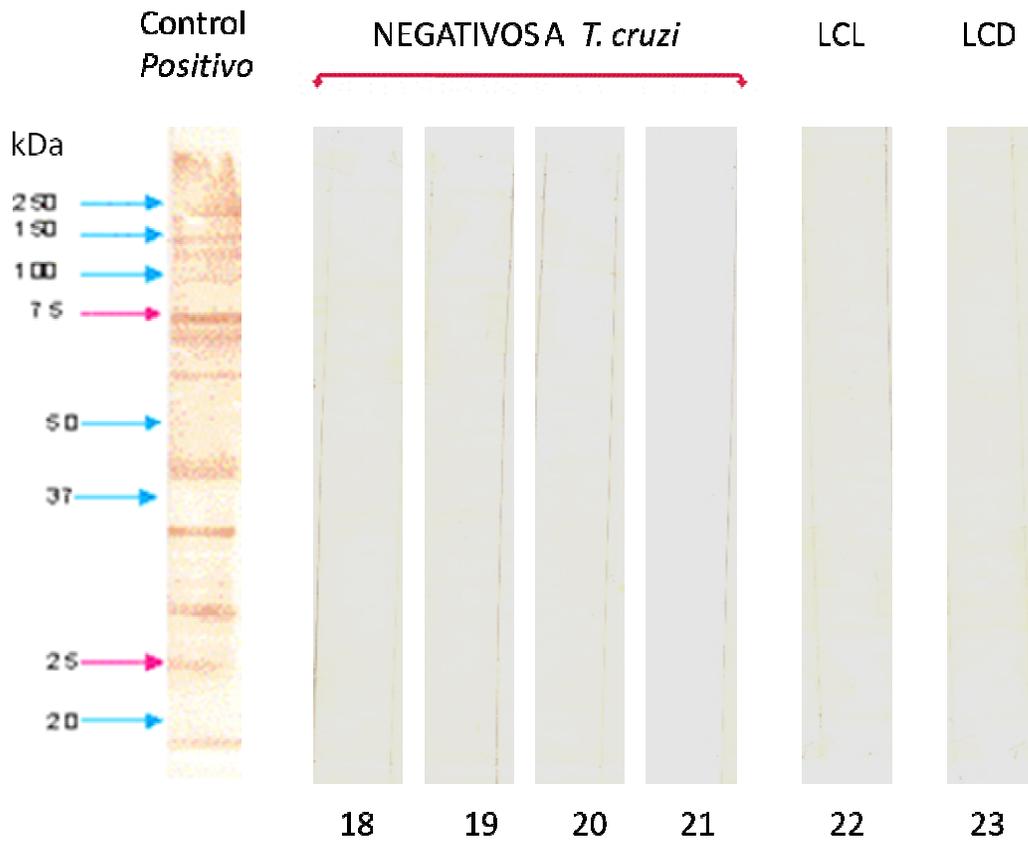


Figura 11b. Componentes proteicos reconocidos por los sueros no reactivos a *T. cruzi*; 4 de individuos sanos, 1 con Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y 1 con Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD). Al extremo izquierdo, como control, se muestra el reconocimiento con un pool de sueros reactivos a *T. cruzi*. SDS-PAGE 12.5 % de acrilamida del extracto proteico del aislado TQ de *T. cruzi* con 20 μ g de proteína por carril, Segundo anticuerpo Anti IgG conjugada a peroxidasa revelado con 3,3 DAB

Tabla 6. Número y porcentaje de componentes identificados por los diferentes sueros

Número de componentes identificados	Crónicos Sintomáticos		Crónicos Asintomáticos		Negativos	
	n	%	n	%	n	%
0-4	0	0.00	0	0.00	4	100.00
5_9	1	10.00	1	14.30	0	0.00
10_14	4	40.00	5	71.40	0	0.00
15 o +	5	50.00	1	14.30	0	0.00
total	10	100.00	7	100	4	100

Se calcularon los pesos moleculares de los componentes reconocidos por los diferentes sueros y se determinó la presencia de tres componentes inmunodominantes de 27, 34 y 38 kDa reconocidos por la totalidad de los sueros de individuos infectados, tanto sintomáticos como asintomáticos. En la tabla 7 se muestra que presentan un 100% de reconocimiento, otros componentes con alto porcentaje de reconocimiento son los de 91,75 y 71 kDa.

Tabla 7. Porcentaje de reconocimiento de los componentes en las fases clínicas de la enfermedad de Chagas.

Marcador	PM	Sintomáticos		Asintomáticos		Total	
		#	%	#	%	#	%
250		0	0	1	14	1	6
	200	8	80	2	29	10	59
150		2	20	1	14	3	18
	138	6	60	4	57	10	59
100	100	2	20	3	43	5	29
	91	8	80	7	100	15	88
75	75	9	90	7	100	16	94
	71	9	90	6	86	15	88
	64	5	50	1	14	6	35
	53	1	10	1	14	2	12
50		0	0	0	0	0	0
	45	1	10	0	0	1	6
	40	4	40	2	29	6	35
37	38	10	100	7	100	17	100
	34	10	100	7	100	17	100
	31	8	80	3	43	11	65
	30	8	80	4	57	12	71
	29	8	80	4	57	12	71
	28	8	80	3	43	11	65
	27	10	100	7	100	17	100
	26	8	80	3	43	11	65
	25	0	0	1	14	1	6
25	24	7	70	3	43	10	59
	23	5	50	0	0	5	29
20		0	0	1	14	1	6

Respecto a la búsqueda de componentes diferenciales entre las fases clínicas de la enfermedad de Chagas, se observa una tendencia a reconocer mayor número de componentes reactivos con los sueros de pacientes en fase crónica sintomática, en especial un grupo de componentes entre 28 y 34 kDa.

El Western-blot en 2D, se realizó empleando un suero de un individuo en fase crónica sintomática (figura 12a) y uno de asintomática (figura 12b), en los cuales se encontraron reconocimientos diferentes, principalmente de componentes con pI 5-6 y peso molecular entre 18 y 38 kDa. El control negativo no mostró ningún reconocimiento.

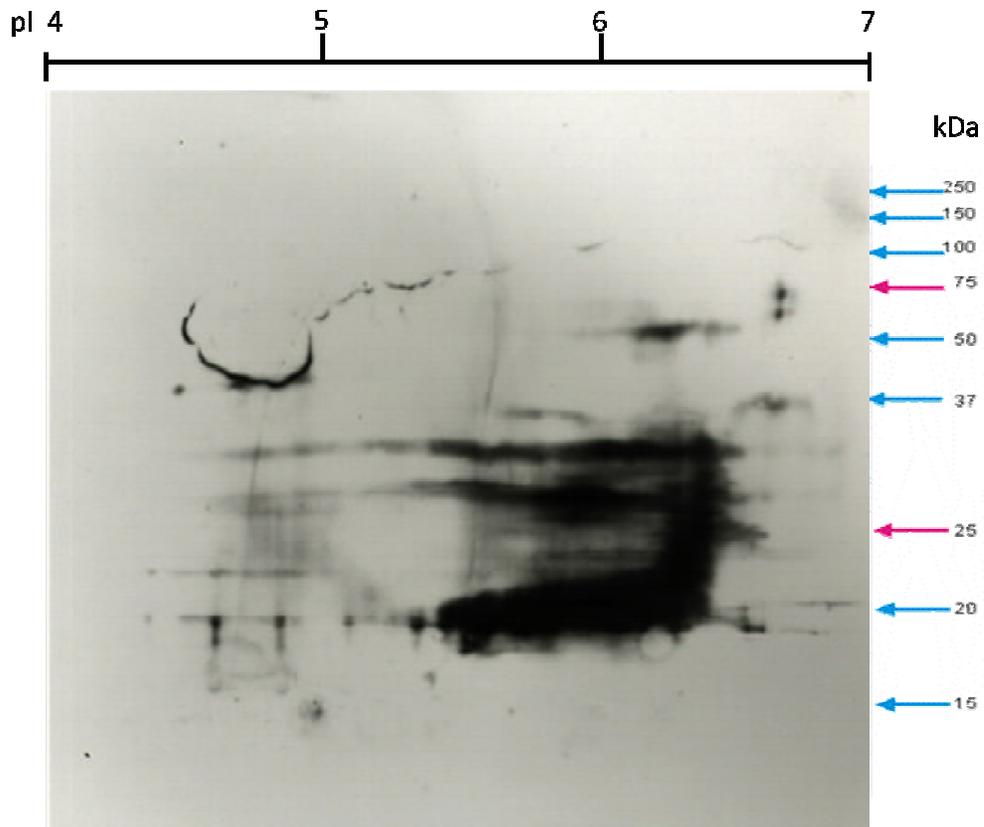
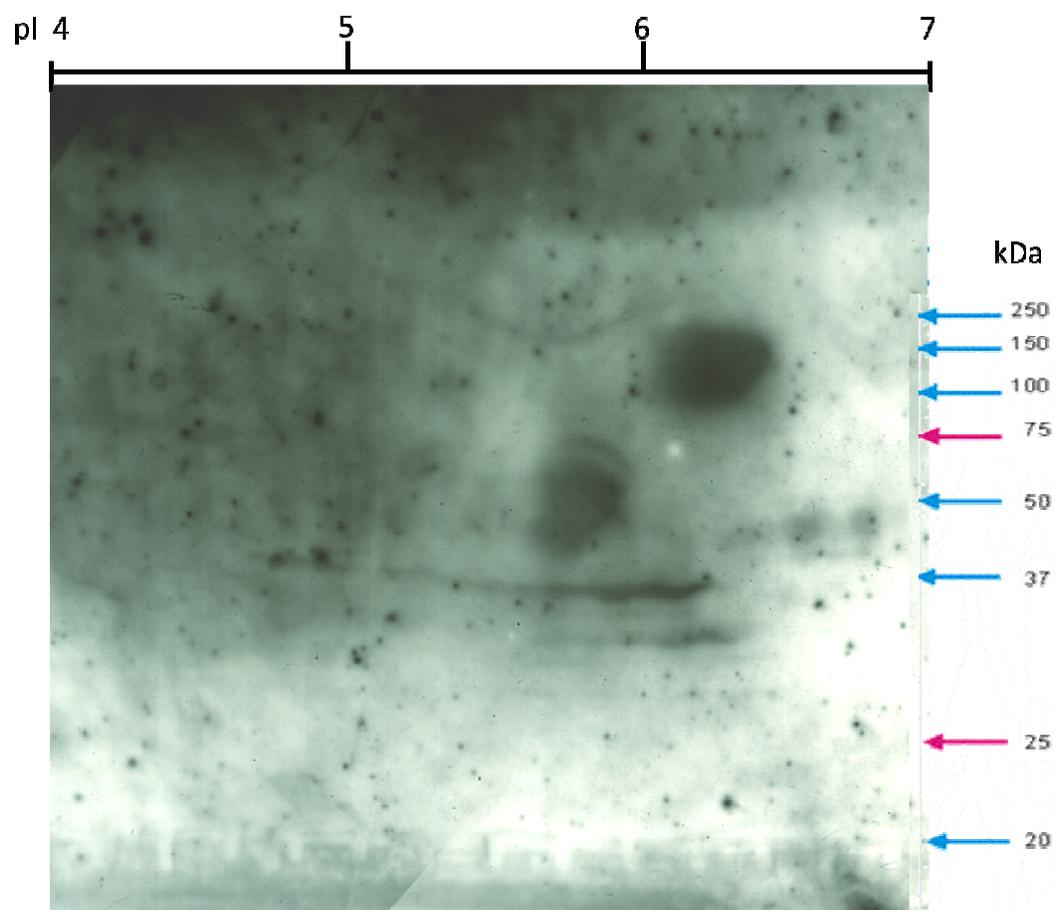


Figura 12a. Western-blot en 2D del extracto proteico de *T. cruzi*, retado con el suero de un individuo en fase crónica sintomática en dilución 1:400. pI 4-7, acrilamida al 12.5%, 200 µg de proteína, segundo anticuerpo Anti IgG conjugado a peroxidasa en dilución 1:20 mil, revelado por quimioluminiscencia.



Análisis Proteómico

Figura 12b. Western-blot en 2D del extracto proteico de *T. cruzi*, retado con el suero de un individuo en fase crónica asintomática en dilución 1:400. pI 4-7, acrilamida al 12.5%, 200 µg de proteína, segundo anticuerpo Anti IgG conjugado a peroxidasa en dilución 1:20 mil, revelado por quimioluminiscencia.

MALDI-TOF

Se seleccionó para analizar por espectrometría de masas un componente proteico inmunodominante de 38 kDa reconocido por sueros de individuos en fase crónica sintomática y asintomática. Los péptidos trípticos obtenidos, fueron comparados con diversas bases de datos.

Tabla 8. Identificación de las Masas monoisotópicas de la proteína de 38kDa del aislado de Tequesquitengo

Masa Monoisotrópica Obtenida	Masa Monoisotrópica Teórica	Posición	Secuencia de Peptidos
2280.773	2281.110	111-129	DVNNTVPFMRAWWECLITSK
1532.640	1532.881	286-299	RNPLLPGALAAFHR
1376.571	1376.780	287-299	NPLLPGALAAFHR
2383.652	2384.096	316-337	VEVAEVAESDEDAASAEDRVHR

Las masas monoisotópicas del espectro LS/MS resultantes de la digestión con tripsina del aislado ITRI/MX/1991/TQ (38kDa) fueron identificados al comparar sus valores relativos con los obtenidos de las bases de datos UniProtKB/Swiss-Prot y UniProtKB/TrEMBL (19/03/2011). La proteína relacionada corresponde a una Proteína hipotética de 379 a.a., no caracterizada de *Leishmania major* con 40.67 kDa y un pI de 5.05; el porcentaje de cobertura fue del 15% y un Score normalizado de 2.18 (Número de acceso Q4FXT3_LEIMA (19)).

DISCUSIÓN

El diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, es de gran importancia epidemiológica, clínica y para la prevención de la transmisión. Durante la fase aguda de la enfermedad se recomiendan técnicas parasitológicas que permiten observar e incluso aislar al parásito; sin embargo, en la fase crónica, disminuye la parasitemia y se recomienda la detección de IgGs específicas.

Los antígenos empleados para el diagnóstico de *T. cruzi*, generalmente están representados por fracciones proteicas y glucoproteicas totales, semipurificadas, purificadas o incluso parásitos enteros. En el presente trabajo, se emplean agentes solubilizantes en el proceso de extracción y se separa la fracción soluble; se utilizó el extracto del aislado ITRI/MX/1991/TQ, debido a que previamente ha sido caracterizado para su empleo con fines diagnósticos en México, y que al ser comparado con otros aislados, ninguno de estos ha mostrado inmunodominancia ni se han encontrado mecanismos de variación antigénica como ha sido comprobado en *T. brucei*. Por lo anterior y porque es posible obtener gran cantidad de parásitos en medio de cultivo, es que el estadio de epimastigote es el más socorrido para la obtención de antígenos para el diagnóstico y el cual también se emplea en el presente trabajo (21, 31, 58-60).

El patrón electroforético muestra componentes con pesos moleculares entre 250 y 18 kDa, entre los que destacan, por su apariencia los de 90, 85, 65, 46, 43, 38, 34, 32, 27, 25 y 18 kDa, ***lo cual coincide con el trabajo realizado por Bucio en 1999 y es similar a lo encontrados por de Lima y colaboradores, que observan 13 bandas glicopeptídicas de las cuales 5 fueron dominantes en intensidad; sin embargo, se ha observado que con otras metodologías de extracción, se presentan diferencias en la cantidad y relevancia***

de algunas bandas proteicas, como lo explican Schechter y Nogueira en 1988, quienes observan que los procesos de lavado, de lisis y la adición de inhibidores de proteasas alteran el perfil de componentes que se pueden observar en la electroforesis (29, 61, 62).

La metodología de la extracción proteica, teóricamente favorece la presencia de proteínas de membrana, debido a la acción solubilizante del detergente. Para confirmar la presencia de glicoproteínas en el extracto del parásito, se realizaron ensayos con el reactivo Pro Q Emerald, lo cual mostró 15 componentes y con la tinción con Sypro Ruby (específica para proteínas), se detectaron 13 de las 15 glicoproteínas, lo cual confirma que todas las proteínas detectadas se encuentran glicosiladas; respecto a los 2 componentes que solo se detectaron con Pro Q Emerald, es posible que sean proteínas con una inusual proporción de carbohidratos respecto a la fracción peptídica; con lo anterior, se concluye que el extracto proteico está compuesto principalmente por glicoproteínas de membrana.

Debido a la amplia glicosilación observada en el patrón electroforético del extracto, se determinó por cromatografía de gases la composición de monosacáridos, la cual mostró que estaban representados principalmente por N-acetil glucosmina (63.62%), lo cual corresponde a lo descrito por otros autores, ya que las proteínas de superficie, especialmente mucinas de T. cruzi, presentan O-glicosilaciones con N-acetil glucosamina. Otros carbohidratos, detectados en menor proporción fueron galactosa (11.9%), manosa (9.53%) y glucosa (9%), los cuales son los principales constituyentes de la elevada proporción de carbohidratos (19-56%) de los componentes de 90, 85, 72,

37, 31 y 25 kDa, obtenidos por cromatografía de afinidad a lectinas (60). Adicionalmente, estos monosacáridos, también se ha visto que son componentes de los GPI que unen proteínas a la membrana del parásito (23). Finalmente, respecto a la presencia de *ribosa* (5.18%) y *xilosa* (0.73%), estos compuestos, han sido encontrados en la glicoproteína de superficie de 72 kDa (63).

Para identificar los carbohidratos presentes en los componentes del patrón electroforético, se realizaron ensayos con lectinas; estos resultados son congruentes con lo descrito previamente respecto a la cromatografía de gases, ya que la WGA que reconoce N-acetil glucosamina, se unió a componentes a todo lo largo del patrón electroforético y de forma más evidente a los de 90, 71, 53, 40 y 27 kDa. De igual forma, la detección de manosa y glucosa (Con A) fue amplia y se correlaciona con las proporciones previamente determinadas por la cromatografía de gases con lo que se confirma lo descrito en la literatura para epimastigotes, donde se sugiere que estos carbohidratos son esenciales para la supervivencia en el insecto, ya que le permiten protegerse de las proteasas, unirse a la membrana intestinal del triatomino, establecerse y llevar a cabo su reproducción (4, 64).

Respecto a las otras lectinas empleadas, ALL que reconoce e Gal β (1, 3)GalNAc (65), detectó 4 componentes con pesos moleculares de 250, 150, 100 y 67 kDa (figura 9); MRL, MAA y SNA reconocen ácido siálico y detectaron los mismos 4 componentes y las 2 últimas, reconocieron un componente adicional de 81 kDa. Se ha reportado que las mucinas de *T. cruzi* se pueden clasificar en derivadas de las formas de insecto con peso molecular entre 35 y 50kDa y las derivadas de mamífero localizadas entre 60 y 200 kDa, las cuales se caracterizan por presentar el epítipo Ssp-3 que contiene ácido siálico y una Gal β (1,3)

GalNAc (66, 67); estas características, coinciden con lo detectado en los ensayos y ayudaría a explicar porque reconocen prácticamente los mismos componentes; sin embargo, nuestro extracto es de epimastigotes (forma reproductiva en insecto y medios de cultivo), por lo que sería necesario verificar si se trata de los mismos.

Respecto al patrón observado en electroforesis 2D se identificaron aproximadamente 300 puntos, distribuidos principalmente en el rango de pI entre 4.5 y 7; esto difiere de trabajos previos donde se han localizado incluso 500 en este mismo rango (21, 58, 68); esto puede deberse a que el proceso de extracción empleado en este trabajo, favorece la presencia de proteínas de membrana a diferencia de otros reportes, donde se obtienen extractos totales. Incluso, con el empleo de variantes de la metodología del IEF, se han reportado cerca de 700 puntos con pI entre 6 y 11, de los cuales 400 están por encima de 7 (69). Estas diferencias en el extracto proteico podrían representar una limitante, debido a que se reduce el espectro de posibles blancos antigénicos.

Al comparar los pesos moleculares de los componentes detectados en la electroforesis en una dimensión con los presentes en la electroforesis 2D podemos observar que no se trata de componentes únicos, sino de diferentes proteínas con el mismo peso molecular que comigran y se observan como una sola banda; esto es un hecho ampliamente reportado en la literatura y es necesario señalarlo, debido a que la gran mayoría de los ensayos realizados para este trabajo fueron en corrimientos electroforéticos sencillos y por tanto, no es posible definir si la afinidad o resultados observados para una banda correspondan a una sola proteína o a un grupo de ellas.

En el análisis de la reactividad mostrada con los sueros humanos de casos asintomáticos y sintomáticos, se encontrarán hasta 20 componentes reconocidos, sin; sin embargo, nos llama la atención, la presencia de tres componentes con pesos moleculares de 38, 34 y 27 kDa en la totalidad de los sueros con reactividad a *T. cruzi*, además de otros tres presentes aproximadamente en el 90% con pesos de 91(88%), 75 (94%) y 71 kDa (88%). Al respecto, otros autores, señalan diversos patrones de reconocimiento como son los trabajos de Teixeira y colaboradores en 1994 encuentran 74% y 100% de reconocimiento de sueros de Chagasicos por las proteínas de 55 y 75 kDA respectivamente, ese mismo año, O´Daly y colaboradores, describen un componente de 42 kDa, reconocido por la mayoría de los sueros reactivos a *T. cruzi*. Reiche y colaboradores (1998) encuentran también el componente de 30 kDa con reconocimiento en el 82.35% de los sueros, y el grupo de Pereira (2000) observa una elevada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico con los componentes de 46 y 58 kDa (14-16, 47, 55, 70). En trabajos realizados con extractos proteicos de aislados mexicanos, Sanchez y colaboradores (2001) encuentran un amplio rango de patrones de reconocimiento, donde destaca el componente de 32 kDa reconocido por el 100% de los sueros de pacientes crónicos sintomáticos, además de otros seis componentes inmunodominantes y ese mismo año en un estudio en el estado de Morelos, Rangel-Flores y colaboradores encuentran reconocimiento por entre 1 y 6 componentes en sueros de individuos seropositivos, destacando el de 74 kDa reconocido por 86% (16, 33). Los pesos moleculares de los componentes inmunodominantes obtenidos en el presente trabajo, son muy cercanos a algunos de los previamente reportados por otros autores, como son los de 90, 75 o 74 y 30 kDa, por lo que consideramos podría tratarse de los mismos, aunque cabe destacar que la cantidad de componentes reconocidos por los sueros de los diferentes trabajos es muy variable. Al comparar los diferentes estudios, nos damos cuenta

de la complejidad de los componentes de *T. cruzi* y la variabilidad de los perfiles antigénicos que se pueden observar con las diferentes metodologías de extracción, por lo que no existe un consenso definitivo acerca de la definición de los principales antígenos de *T. cruzi*. Al comparar los patrones de reconocimiento observados en las diferentes fases clínicas, no se encontró un patrón o componente diferencial que permita discriminar entre ambas fases; sin embargo, los resultados obtenidos, permiten definir que el número de componentes reconocidos, puede plantearse como un indicador, ya que, individuos sintomáticos reconocen mayor cantidad de componentes, particularmente, un grupo entre 28 y 31 kDa que se observaron, en el 80% de los casos sintomáticos y 43 y 57% de los asintomáticos, lo cual concuerda con lo reportado por O'Daly, que con Western-blot realizado con extractos totales, de superficie y de secreción, no encuentra correlación de algún patrón o título de anticuerpos con la severidad de la enfermedad, resultados, también similares a lo observado por Pereira y Reiche y por Rangel-Flores, quien no encuentra asociación entre alteraciones electrocardiográficas y títulos de anticuerpos en ELISA o bandas presentes en Western-blot (15, 33, 34, 47).

Al observar que la gran complejidad de la constitución molecular del parásito sobrepasa los límites de resolución del inmunoblot, se realizó el mapeo de los componentes inmunogénicos en dos dimensiones, con el empleo de un suero de un caso asintomático y otro de un sintomático; sin embargo, la gran cantidad de suero que se requiere para realizar la técnica, no permitió tener muestras suficientes para realizar más ensayos. De esta manera, se encontraron algunas marcas de reconocimiento que en el caso del suero del paciente asintomático correspondieron principalmente a la zona con pI entre 5-6.5 dentro del rango de pesos entre 20 y 50 kDa, zona que concuerda con los pesos moleculares de los

componentes detectados en una dimensión con reactividad en el 100% de los sueros. En el caso del suero del individuo asintomático, se detectaron marcas similares pero en un rango de 30 a 50 kDa; sin embargo, al ser solamente 2 sueros no es posible determinar la frecuencia con que se presentan y mucho menos si pudieran ser específicas de fase clínica. En la literatura no se encontró ningún trabajo donde se realice esta técnica empleando extractos crudos o semipurificados del parásito; a la fecha, existe un solo trabajo reportado donde se emplearon antígenos de excreción secreción y en el cual reportan que la isoforma de aproximadamente 6.4 (pI) de la proteína de 150-160 kDa, se hace inmunodominante con la progresión de la enfermedad; sin embargo, los sueros que emplean los dividen en fase aguda temprana, aguda tardía y crónica, sin diferenciar entre sintomática y asintomática (36).

Posteriormente, en el Instituto Nacional de Cardiología se hicieron estudios clínicos ecocardiográficos a la mayor parte de los casos cuyos sueros fueron empleados en este trabajo; en ellos se detectaron lesiones cardiacas de leves a moderadas, incluso en individuos previamente clasificados como asintomáticos. Esto ha sido reportado en trabajos previos, aunque en menor proporción de pacientes (71). Con base en estos hallazgos, se reclasificaron los sueros dividiéndolos en individuos con algún tipo de lesión y totalmente asintomáticos con lo que el lote de individuos, inicialmente caracterizados como asintomáticos se redujo drásticamente de 7 a 1 lo que dificultó el poder realizar una comparación en la búsqueda de algún patrón específico de fase. Estos resultados, aunados a lo observado el Western-blot, nos permiten confirmar el hecho de que no existe realmente una fase asintomática en la enfermedad, sino que la ausencia de signos y síntomas puede deberse a varios factores relacionados tanto con la respuesta del sistema inmune que

disminuye la multiplicación parasitaria, así como con los mecanismos compensatorios que se presentan antes de que aparezca la sintomatología cardíaca.

Finalmente, se analizó por espectrometría de masas el componente de 38 kDa, debido a que este fue reconocido por la totalidad de los sueros de individuos infectados y era visible en el patrón electroforético en una dimensión. Las masas monoisotópicas obtenidas, se compararon con las bases de datos UniProtKB/Swiss-Prot y UniProtKB/TrEMBL, que las relacionan con una proteína hipotética no caracterizada de *Leishmania major*; a pesar de que la baja identidad encontrada ($score= 2.18$), no permitió identificar alguna molécula de forma definitiva, este resultado no era esperado, debido a que la proteína seleccionada no mostró cruce inmunológico en los sueros de individuos con anticuerpos anti *Leishmania mexicana*; probablemente, esto sea debido al número reducido de secuencias disponibles en las bases de datos de *T. cruzi* (21), o bien, por la glicosilación de las proteínas analizadas por esta metodología que modifica los valores masa/carga (m/z) obtenidos experimentalmente y que los desvía de los teóricos que se calculan al considerar sólo la región peptídica. Otra posibilidad sería que la banda escindida para su estudio, no corresponda a una sola proteína como fue mencionado anteriormente.

CONCLUSIONES

Los principales componentes observados en el patrón electroforético corresponden a glicoproteínas de membrana.

Los componentes de 38, 34 y 27 kDa mostraron reconocimiento en todos los sueros de individuos seropositivos, con los cuales se definió un patrón característico, el cual podría ser propuesto con fines diagnósticos.

No se identificaron componentes específicos de fase clínica.

El número de componentes reconocidos se correlaciona con la presencia de alteraciones en el trazo electrocardiográfico.

El número de componentes reactivos, especialmente dentro del grupo entre 28 y 31 kDa, podría proponerse como un indicador precoz para determinar daño tisular antes de que se presenten los síntomas y signos característicos.

PERSPECTIVAS

Los componentes determinados en el presente trabajo como altamente sensibles para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* pueden ser empleados en futuros estudios para determinar su constitución de aminoácidos y carbohidratos específicos y elucidar su función en el parásito y su interacción con el huésped.

Se requiere continuar con los análisis de una cantidad significativa de sueros con la técnica de inmunoblot en 2 dimensiones, para obtener con mayor detalle el mapa de componentes inmunogénicos de *T. cruzi*.

Por inmunoblot de los componentes deglicosilados con glicasas, se podría determinar el reconocimiento hacia la fracción proteica, lo cual facilitaría su aislamiento, caracterización e identificación para su empleo con otros fines

Mediante inmunización de animales de laboratorio, se podrían obtener anticuerpos específicos para ser empleados para el diagnóstico o bien como marcadores que por medio de inmunohistoquímica podrían ser de utilidad para determinar la localización de los componentes del parásito, ya sea en el vertebrado o en el transmisor.

BIBLIOGRAFÍA

1. OPS/OMS. 2006. *Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas*, OMS
2. OMS. 2007. *Reporte sobre la Enfermedad de Chagas del Grupo de Trabajo Científico.*, OMS, Ginebra. Suiza
3. Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loebllich AR, 3rd, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* 27: 37-58
4. Alves MJ, Colli W. 2008. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. *Subcell Biochem* 47: 58-69
5. O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-21
6. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1051-4
7. Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. 2010. Chagas disease. *Lancet* 375: 1388-402
8. Burleigh BA, Woolsey AM. 2002. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol* 4: 701-11
9. De Souza W. 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* 8: 269-85
10. Andrade LO, Andrews NW. 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol* 3: 819-23
11. UNAM S, OPS. 2006. Manual para el Diagnóstico de la Infección por *Trypanosoma cruzi*, OPS OMS, México D.F.

12. Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS. 2009. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol* 31: 673-85
13. Lopez-Ordonez T, Panzera F, Tun-Ku E, Ferrandis I, Ramsey JM. 2009. [Genomic and proteomic contributions for Chagas disease control]. *Salud Publica Mex* 51 Suppl 3: S410-23
14. Reiche EM, Cavazzana M, Jr., Okamura H, Tagata EC, Jankevicius SI, Jankevicius JV. 1998. Evaluation of the western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 59: 750-6
15. Pereira VR, Nakazawa M, Furtado VC, Abath FG, Gomes YM. 2000. Immunodiagnosis of chronic Chagas' disease using the Tc 46 and Tc 58 antigens. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 367-70
16. Sanchez B, Monteon 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. *Arch Med Res* 32: 382-8
17. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, et al. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309: 416-22
18. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-15
19. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, et al. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309: 436-42
20. Cuervo P, Domont GB, De Jesus JB. 2010. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *J Proteomics* 73: 845-67

21. Paba J, Santana JM, Teixeira AR, Fontes W, Sousa MV, Ricart CA. 2004. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics* 4: 1052-9
22. Turco S, Cummings R. 2009. Parasitic Infections. In *Essentials of Glycobiology*, ed. TCoG Editors. La Jolla, California: Cold Spring Harbor
23. de Lederkremer RM, Agusti R. 2009. Glycobiology of *Trypanosoma cruzi*. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 62: 311-66
24. Ouaisi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N, Thieblemont N, Jeannin P. 2002. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J Immunol* 168: 6366-74
25. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167: 416-23
26. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT. 2010. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med* 12: e29
27. Golgher D, Gazzinelli RT. 2004. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity* 37: 399-409
28. Dutra WO, Rocha MO, Teixeira MM. 2005. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol* 21: 581-7
29. De Lima Rivero AR, Farias Tamoy MN, Tortolero Leal E, Navarro Aguilera MC, Contreras Alvarez VT. 2001. [Partial purification and use of *Trypanosoma cruzi* glycosidic fractions for Chagas disease diagnosis]. *Acta Cient Venez* 52: 235-47
30. Verani JR, Seitz A, Gilman RH, LaFuente C, Galdos-Cardenas G, Kawai V, de LaFuente E, Ferrufino L, Bowman NM, Pinedo-Cancino V, Levy MZ, Steurer F, Todd CW, Kirchhoff LV, Cabrera L, Verastegui M, Bern C. 2009. Geographic variation in the sensitivity of recombinant antigen-based rapid tests for chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 80: 410-5
31. Primavera KS, Umezawa 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: 172-80

32. Bucio MI, Cabrera M, Segura EL, Zenteno E, Salazar-Schettino M. 1999. Identification of immunodominant antigens in Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Invest* 28: 257-68
33. Rangel-Flores H, Sanchez B, Mendoza-Duarte J, Barnabe C, Breniere FS, Ramos C, Espinoza B. 2001. Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central Mexico: correlation with electrocardiographic alterations. *Am J Trop Med Hyg* 65: 887-95
34. Umezawa 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: 2143-7
35. da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. 2001. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* 17: 286-91
36. Silva AG, Silveira-Lacerda EP, Cunha-Junior JP, de Souza MA, Favoreto Junior S. 2004. Immunoblotting analyses using two-dimensional gel electrophoresis of *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens. *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 454-9
37. Luquetti AO, Espinoza B, Martinez I, Hernandez-Becerril N, Ponce C, Ponce E, Reyes PA, Hernandez O, Lopez R, Monteon V. 2009. Performance levels of four Latin American laboratories for the serodiagnosis of Chagas disease in Mexican sera samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 797-800
38. Nogueira N, Chaplan S, Tydings JD, Unkeless J, Cohn Z. 1981. *Trypanosoma cruzi*. Surface antigens of blood and culture forms. *J Exp Med* 153: 629-39
39. Teixeira MM, Yoshida N. 1986. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol* 18: 271-82
40. Yoshida N. 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* 78: 87-111
41. Silber AM, Marcipar IS, Roodveldt C, Cabeza Meckert P, Laguens R, Marcipar AJ. 2002. *Trypanosoma cruzi*: identification of a galactose-binding protein that binds to cell

surface of human erythrocytes and is involved in cell invasion by the parasite. *Exp Parasitol* 100: 217-25

42. Marcipar IS, Welchen E, Roodveldt C, Marcipar AJ, Silber AM. 2003. Purification of the 67-kDa lectin-like glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*, LLGP-67, and its evaluation as a relevant antigen for the diagnosis of human infection. *FEMS Microbiol Lett* 220: 149-54
43. Villalta F, Lima MF, Howard SA, Zhou L, Ruiz-Ruano A. 1992. Purification of a *Trypanosoma cruzi* trypomastigote 60-kilodalton surface glycoprotein that primes and activates murine lymphocytes. *Infect Immun* 60: 3025-32
44. Martinez J, Campetella O, Frasch AC, Cazzulo JJ. 1991. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is antigenic in human infections. *Infect Immun* 59: 4275-7
45. Scharfstein J, Rodrigues MM, Alves CA, de Souza W, Previato JO, Mendonca-Previato L. 1983. *Trypanosoma cruzi*: description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. *J Immunol* 131: 972-6
46. Gusmao RD, Rezende JM, Rassi A, Gam AA, Neva FA. 1982. Antibody levels to *Trypanosoma cruzi* in infected patients with and without evidence of chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 31: 452-8
47. O'Daly JA, Carrasco H, Fernandez V, Rodriguez MB. 1994. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Acta Trop* 56: 265-87
48. Michel. DuBois KAG, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, Fred. Smith. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem* 28: 359-6
49. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
50. Steinberg TH, Pretty On Top K, Berggren KN, Kemper C, Jones L, Diwu Z, Haugland RP, Patton WF. 2001. Rapid and simple single nanogram detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots. *Proteomics* 1: 841-55
51. Berggren K, Steinberg TH, Lauber WM, Carroll JA, Lopez MF, Chernokalskaya E, Zieske L, Diwu Z, Haugland RP, Patton WF. 1999. A luminescent ruthenium complex for ultrasensitive detection of proteins immobilized on membrane supports. *Anal Biochem* 276: 129-43

52. Zanetta JP, Pons A, Iwersen M, Mariller C, Leroy Y, Timmerman P, Schauer R. 2001. Diversity of sialic acids revealed using gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives. *Glycobiology* 11: 663-76
53. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4
54. Sharon N, Lis H. 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246: 227-34
55. Teixeira MG, Borges-Pereira J, Netizert E, Souza ML, Peralta JM. 1994. Development and evaluation of an enzyme linked immunotransfer blot technique for serodiagnosis of Chagas' disease. *Trop Med Parasitol* 45: 308-12
56. Cura E WS. 1994. *Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre*, Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C
57. World Health Organization. 2002. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series 905, 109
58. Atwood JA, 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R, Tarleton RL. 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309: 473-6
59. Snary D, Hudson L. 1979. *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins: identification of one major glycoprotein. *FEBS Lett* 100: 166-70
60. Carroll M, McCrorie P. 1987. Glycoproteins of trypanosomes: their biosynthesis and biological significance. *Comp Biochem Physiol B* 88: 7-12
61. Schechter M, Nogueira N. 1988. Variations induced by different methodologies in *Trypanosoma cruzi* surface antigen profiles. *Mol Biochem Parasitol* 29: 37-45
62. Bua JE, Bontempi EJ, Ruiz AM, Segura EL. 1990. [Antigens in *Trypanosoma cruzi*]. *Rev Argent Microbiol* 22: 37-55
63. Snary D, Ferguson MA, Scott MT, Allen AK. 1981. Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol* 3: 343-56

64. Villalta F, Scharfstein J, Ashton AW, Tyler KM, Guan F, Mukherjee S, Lima MF, Alvarez S, Weiss LM, Huang H, Machado FS, Tanowitz HB. 2009. Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*-host cell receptor interactions. *Parasitol Res* 104: 1251-60
65. Lascurain R, Chavez R, Gorocica P, Perez A, Montano LF, Zenteno E. 1994. Recognition of a CD4+ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunology* 83: 410-3
66. Schenkman S, Jiang MS, Hart GW, Nussenzweig V. 1991. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* 65: 1117-25
67. Almeida IC, Ferguson MA, Schenkman S, Travassos LR. 1994. GPI-anchored glycoconjugates from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes are recognized by lytic anti-alpha-galactosyl antibodies isolated from patients with chronic Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res* 27: 443-7
68. Parodi-Talice A, Duran R, Arrambide N, Prieto V, Pineyro MD, Pritsch O, Cayota A, Cervenansky C, Robello C. 2004. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 34: 881-6
69. Magalhaes AD, Charneau S, Paba J, Guercio RA, Teixeira AR, Santana JM, Sousa MV, Ricart CA. 2008. *Trypanosoma cruzi* alkaline 2-DE: Optimization and application to comparative proteome analysis of flagellate life stages. *Proteome Sci* 6: 24
70. TORRES LG, Zaida; ARAUZ, Patricia y TAYLOR, Lizeth. 2004. Prevalencia de anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre de la Seguridad Social- Costa Rica, Setiembre 2003 - Setiembre 2004. *Rev. costarric. cienc. méd* 25: 15-26
71. Rigou DG, Gullone N, Carnevali L, De Rosa AF. 2001. [Asymptomatic Chagas disease. Electrocardiographic and echocardiographic findings]. *Medicina (B Aires)* 61: 541-4