

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

Evaluación de la respuesta de anticuerpos de la clase IgG a proteínas de *Trypanosoma cruzi* de 65-200 kDa en individuos post-tratamiento en la Enfermedad de Chagas

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MIGUEL ÁNGEL CASTRO ALANIS

DIRECTOR:

Biól. SERGIO PASTÉN SÁNCHEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2010



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

"Evaluación de la respuesta de anticuerpos de la clase IgG a proteínas de Trypanosoma cruzi de 65-200 kDa en individuos post-tratamiento en la Enfermedad de Chagas".

que presenta el pasante: Miguel Angel Castro Alanis
con número de cuenta: 30026997-0 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de junio de 2010.

PRESIDENTE MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes

VOCAL Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón

SECRETARIO MVZ. Angel Germán Martínez Sosa

PRIMER SUPLENTE QFB. Ladislao Palomar Morales

SEGUNDO SUPLENTE MIBB. Jorge Luis de la Rosa Arana



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

Evaluación de la respuesta de anticuerpos de la
clase IgG a proteínas de *Trypanosoma cruzi* de
65-200 kDa en individuos post-tratamiento en la
enfermedad de Chagas

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Enfermedad de Chagas del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos InDRE, de la Secretaría de Salud, bajo la dirección del Biól. Sergio Pastén Sánchez y revisado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por el MVZ. Ángel Germán Martínez Sosa.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar hasta este momento de mi vida y por haberme dado la fuerza y la confianza que necesitaba para salir adelante.

A mi familia, primeramente a mi papá ya que el me enseñó a no darme por vencido y que gracias a su apoyo incondicional hoy pude cumplir con una de mis metas mas importantes. A mi mamá, que siempre ha estado a mi lado procurando mi bienestar y que en muchas ocasiones se desvelo conmigo ayudándome cuando lo necesitaba. A mi hermanita, por ser la alegría de mi vida y por que siempre sabía como arrancarnos una sonrisa. A todos ustedes gracias por brindarme su cariño y su apoyo siempre y gracias por creer en mi, ahora les digo que es mi turno de ver por ustedes y poderles dar un poco de lo mucho que me han dado, aunque yo se de antemano que no me alcanzaría la vida para hacerlo. Los Amo.

A esa personita que durante tres años compartió su vida conmigo y que sin darse cuenta me enseñó el significado del amor, gracias por llegar a mi vida, por apoyarme siempre que lo necesite y por que siempre supiste como hacerme sentir mejor en mis momentos de tristeza. Gracias por todos aquellos momentos tan increíbles que pase a tu lado. A pesar de que la vida nos llevo por caminos diferentes, te digo que siempre serás parte de mi y que en mi corazón siempre tendrás un lugar muy especial. Te Quiero.

M

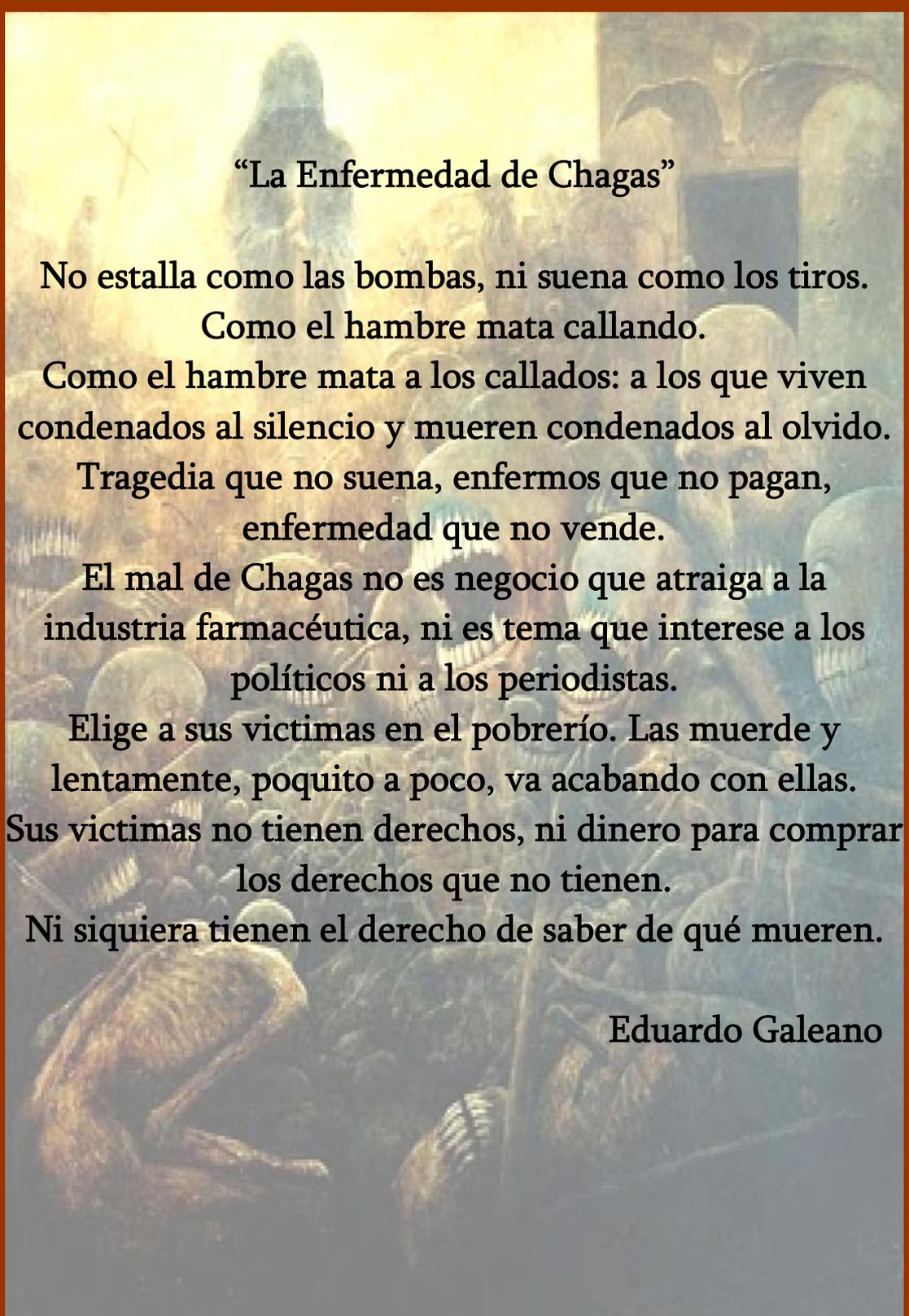
A mis amigos: Diana, Lorena, Karina, Carmen, Blanca, José Luis, Noé e Israel por hacer de todo este tiempo que pasamos en la escuela, una de las etapas mas bonitas de mi vida, gracias por todos esos momentos de alegría, pero sobre todo gracias por su amistad incondicional.

Al Biol. Sergio Pastén Sánchez por aceptarme en su laboratorio, pero sobre todo por la paciencia que me tuvo durante todo este tiempo y por compartir conmigo sus conocimientos. Gracias por confiar en mí y por sus valiosos consejos. Este trabajo es un logro de ambos y espero tener la oportunidad de seguir trabajando con usted.

A mis compañeros del Laboratorio de Enfermedad de Chagas: Norma, Sandra, Edgar, Mari y Rosario gracias todo su apoyo y por compartir conmigo su experiencia, pero sobretodo por hacerme sentir parte de este gran equipo de trabajo.

A la Dra. Carmen Guzmán Bracho por todo el apoyo recibido, así como las facilidades y atenciones que siempre tuvo hacia mí.

Al MVZ. Ángel Germán Martínez Sosa por aceptar ser mi asesor dentro de la escuela, y por sus valiosos consejos para la revisión de esta tesis.



“La Enfermedad de Chagas”

No estalla como las bombas, ni suena como los tiros.

Como el hambre mata callando.

Como el hambre mata a los callados: a los que viven condenados al silencio y mueren condenados al olvido.

Tragedia que no suena, enfermos que no pagan,
enfermedad que no vende.

El mal de Chagas no es negocio que atraiga a la industria farmacéutica, ni es tema que interese a los políticos ni a los periodistas.

Elige a sus víctimas en el pobrerío. Las muere y lentamente, poquito a poco, va acabando con ellas. Sus víctimas no tienen derechos, ni dinero para comprar los derechos que no tienen.

Ni siquiera tienen el derecho de saber de qué mueren.

Eduardo Galeano

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. ABREVIATURAS	2
II. ÍNDICE DE FIGURAS	4
III. ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS	5
IV. ÍNDICE DE ANEXOS	6
V. RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Definición.....	8
1.2 Antecedentes históricos.....	9
1.3 Agente etiológico.....	10
1.4 Ciclo de vida.....	11
1.5 Formas de transmisión.....	12
1.6 Vectores.....	13
1.7 Reservorios.....	14
1.8 Epidemiología.....	15
1.9 Cuadro clínico.....	17
1.9.1 Fase Aguda.....	17
1.9.2 Fase Indeterminada.....	18
1.9.3 Fase Crónica.....	19
1.10 Inmunopatología.....	20
1.11 Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria.....	24
1.12 Diagnóstico.....	24
1.13 Tratamiento.....	28
1.14 Valoración del tratamiento.....	30
1.15 Prevención y Control.....	31
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
3. OBJETIVOS	33
4. HIPÓTESIS	34
5. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	
5.1 Tipo de estudio.....	34

5.2 Material biológico.....	34
5.3 Población.....	34
5.4 Criterios inclusión, exclusión y eliminación.....	36
5.5 Variables.....	36
5.6 Materiales.....	36
5.7 Métodos	
5.7.1 Obtención de extracto crudo a partir de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	38
5.7.2 Determinación de concentración de proteínas (Método de Lowry).....	39
5.7.3 Electroforesis geles poliacrilamida (PAGE-SDS 10%, Glicerol 10%).....	40
5.7.4 Tinción Azul de Coomassie.....	42
5.7.5 Inmunoelectrotransferencia.....	42
5.7.6 Inmunodetección.....	43
5.8 Análisis estadístico.....	45
6. RESULTADOS.....	46
7. DISCUSIÓN.....	62
8. CONCLUSIONES.....	66
9. PERSPECTIVAS.....	67
10. BIBLIOGRAFÍA.....	68
11. ANEXOS.....	75

I. ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
Ag	Antígeno
ARN	Ácido Ribonucleico
Bz	Benznidazol
BSA	Albúmina Serica Bovina
CTa	Crónico Tardío
CTe	Crónico Temprano
DAF	Decay Accelerating Factor
DOI	Densidad Óptica Integrada
ENSE	Encuesta Nacional Serológica
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático
gp	Glicoproteína
GPI	Glucosilfosfatidilinositol
HAI	Hemaglutinación Indirecta
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IFN-γ	Interferón gama
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
IMC	Inmunidad Mediada por Células
InDRE	Instituto de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos
iNOS	Sintetasa inducible de Oxido Nítrico
kDa	Kilodaltos

NK	Natural Killer
NO	Oxido Nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
R²	Coeficiente de Determinación
SDS	Duodecil Sulfato de Sodio
SSa	Secretaria de Salud
TBS	Tioglicolato de Sodio
TDR	Tropical Diseases Research
TEMED	N, N, N', N'- Tetrametil etilén diamina
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante Beta
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
URL	Uniform Resource Locators
VAC	Vía Alterna del Complemento
WB	Western Blot

II. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	Pág.
1. Formas evolutivas del <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
2. Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
3. Vectores de importancia médica en México.....	14
4. Distribución de reservorios salvajes y domésticos en México.....	15
5. Manifestación del Signo de Romaña.....	17
6. Inducción de IFN- γ por células NK.....	21
7. Proliferación y diferenciación de los fenotipos Th1 y Th2.....	22
8. Regulación de la síntesis de IFN- γ por la IL-10 y el TGF- β	22
9. Examen directo de sangre teñido con Giemsa.....	26
10. Diagrama de flujo que muestra la metodología utilizada.....	44
11. Perfil de reactividad de los casos 1, 3, 8 y 9.....	51
12. Perfil de reactividad del caso 2.....	52
13. Perfil de reactividad de los casos 3, 4, 26 y 65.....	52
14. Perfil de reactividad de los casos 5, 6, 7 y 8.....	53
15. Perfil de reactividad de los casos 10, 11, 12, 13 y 14.....	53
16. Perfil de reactividad de los casos 15, 16, 17, 18 y 19.....	54
17. Perfil de reactividad de los casos 20, 21, 22, 63 y 64.....	54
18. Perfil de reactividad del caso 66.....	55
19. Perfil de reactividad de los casos 67, 68 y 69.....	55

III. ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

TABLAS	Pág.
1. Cambios en los parámetros epidemiológicos en la Enfermedad de Chagas.....	16
2. Selección de las técnicas de laboratorio según la fase clínica.....	27
3. Criterios par la clasificación de casos en la Enfermedad de Chagas.....	28
4. Efectos secundarios adversos detectados en el tratamiento.....	30
5. Población estudiada.....	35
6. Resultados de serología convencional de la población en estudio.....	46
7. Análisis de serología convencional empleando datos generales.....	48
8. Análisis de serología convencional para el grupo de CTe.....	49
9. Análisis de serología convencional para el grupo de CTa.....	50
10. Resumen de los valores de predicción al 100% de negatividad.....	50
11. Respuesta de anticuerpos (DOI) con el método estándar.....	56
12. Respuesta de anticuerpos (DOI) con el método de Urea 6M.....	57
13. Porcentaje de reconocimiento de cada marcador.....	58
14. Análisis con datos generales de los marcadores.....	59
15. Análisis de los marcadores para el grupo de CTe.....	60
16. Análisis de los marcadores para el grupo de CTa.....	61
17. Resumen de los valores de predicción en 100% de negatividad.....	61

GRÁFICAS

1. Resultados de serología convencional para CTe y CTa.....	47
---	----

IV. ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXOS	Pág.
1. Preparación de la masa húmeda (epimastigotes).....	75
2. Preparación de inhibidores de proteasas.....	75
3. Preparación de soluciones: Método de Lowry.....	76
4. Preparación de soluciones: PAGE-SDS 10%, Glicerol 10%.....	76
5. Preparación de soluciones: Tinción Azul de Coomassie.....	78
6. Preparación de soluciones: Electrotransferencia.....	79

V. RESUMEN

La Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas, es una zoonosis causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*. Constituye un importante problema de salud pública en América Latina, dada su magnitud y la poca atención prestada por las políticas de salud. Desde la década de 1930 fue investigado el tratamiento etiológico en donde las metas de éste son a nivel individual, eliminar el parásito y disminuir la probabilidad de desarrollar la enfermedad (Sosa Estani, 1999). El mayor problema es la determinación de la eficacia del tratamiento, ya que el criterio de curación provoca una gran incertidumbre. Históricamente se ha entendido como fracaso terapéutico la positividad del xenodiagnóstico o cultivo y como éxito terapéutico la negatividad a las pruebas serológicas convencionales (Espinoza, 2003). No obstante, la serología convencional presenta limitantes relacionadas a la elevada complejidad antigénica del *T. cruzi*, a la existencia de diferentes cepas, a la similitud con otros parásitos, así como a la respuesta inmunológica específica e independiente de cada individuo (Fabbro, 2007). Además de que estas técnicas fueron diseñadas como apoyo en el diagnóstico y no para evaluar efectividad de tratamiento. Por tal motivo grupos de expertos internacionales han manifestado la necesidad de evaluar nuevas herramientas que monitoreen la eficacia del tratamiento.

En este trabajo se evaluó la cinética de anticuerpos IgG en serología convencional y el reconocimiento de los marcadores de 190, 143, 110, 75 y 69 kDa mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia en 31 pacientes post-tratamiento. Los pacientes se dividieron en 2 grupos: CTe (≤ 18 años) y CTa (> 18 años); en un análisis inicial se observó que la respuesta de anticuerpos es menor en CTe que en CTa para la serología convencional; siendo la técnica de HAI es la que presenta los mejores resultados comparada con IFI y ELISA. El marcador de 110 kDa mostró una tasa de cambio de 27.403 unidades esperando la negatividad en 2.5 años aproximadamente. El de 190 kDa muestra una tasa de cambio de 22.415 unidades esperando negatividad en 3 años. Este comportamiento es semejante para CTe y CTa. Mientras que el de 143 kDa presenta mejores resultados en el grupo de CTa con una tasa de cambio de 24.073 unidades y esperando la negatividad en 2.5 años aproximadamente.

Los marcadores de 110 y 190 kDa son los que presentan mayor posibilidad de ser considerados en el diseño de herramientas de evaluación del tratamiento, mientras que el de 143 kDa podría ser considerado en individuos CTa.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas es un padecimiento muy complejo, anteriormente era exclusivo del Continente Americano (González Fernández, 2000), pero ahora se pueden encontrar casos en otras partes del mundo debido al problema de la migración de personas infectadas. En la cadena de transmisión interviene un gran número de reservorios vertebrados y de insectos triatomínicos vectores que hacen imposible su erradicación. Constituye una amenaza permanente para casi la cuarta parte de toda la población de América Latina, estimada en 28 millones de personas en el año 2006, las cuales se encuentran en riesgo de adquirir la infección, teniendo en cuenta la distribución geográfica de los insectos vectores y los múltiples reservorios involucrados en los diversos ciclos de transmisión. Si bien la enfermedad se encuentra presente en México, toda la América Central y del Sur, sus manifestaciones clínicas y características epidemiológicas son muy variables entre una y otra zona endémica (OMS, 2005).

La existencia de la enfermedad de Chagas humana es un hecho puramente accidental, en la medida en que el hombre fue entrando en contacto con los focos naturales y provocó desequilibrios ecológicos, forzó a los triatomínicos infectados a ocupar viviendas humanas, se llevó a cabo el proceso de domiciliación y así, encontraron refugio y suficiente alimento en la sangre humana y la de los animales domésticos. De esta manera, entra el hombre a formar parte activa de la cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas (González Fernández, 2000 y OMS, 2005).

Esta parasitosis es una de las que presenta mayor morbilidad entre sus habitantes, especialmente en aquellos de bajo nivel económico que viven en las áreas rurales cuyas viviendas facilitan el albergue del insecto transmisor de la infección. Si bien el ingreso de la Enfermedad de Chagas al mundo de la medicina es relativamente reciente, es posible encontrar referencias relacionadas con ella, prácticamente desde la conquista del continente americano (URL¹).

1.2 Antecedentes históricos

La enfermedad fue nombrada en reconocimiento al médico e infectólogo brasileño, Carlos Chagas, quien en 1909 la había descrito por primera vez (Chagas, 1909 y Redhead, 2006). En ese entonces la enfermedad no era considerada un problema de salud pública de importancia. Chagas realizó su primer descubrimiento cuando observó que los intestinos del *Triatomidae* albergaban un protozoo flagelado, una nueva especie del género *Trypanosoma*, y fue capaz de demostrar experimentalmente que éste podía transmitirse a monos típies del género *Callithrix* que habían sido picados por el insecto portador. Estudios posteriores demostraron que el mono ardilla era también vulnerable a la infección (Hulsebos, 1989).

Al parásito que causa la enfermedad, Chagas lo llamó *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) honrando al Dr. Oswaldo Cruz, el famoso médico y epidemiólogo brasileño. El trabajo de Chagas fue especial en la historia de la medicina, por ser el único investigador que pudo describir por completo una enfermedad infecciosa, es decir, el patógeno, su vector y hospedador, las manifestaciones clínicas y la epidemiología. En Argentina muchas veces se le llama *Mal de Chagas-Mazza*, en honor al médico argentino Salvador Mazza, quien en 1926 comenzó a investigar la enfermedad y con los años se transformó en el principal estudioso de esta patología en el país. Como la tripanosomiasis era una enfermedad que afectaba prevalentemente a los pobres, no se le daba trascendencia, y la medicina la negaba como patología.

En 1946, se llevó a cabo la primera encuesta seroepidemiológica. Con este estudio se inicia la seroepidemiología en México, sin embargo no se da la importancia a la enfermedad y se objeta la existencia de la miocardiopatía chagásica (Tay, 1979). El grupo de Goldsmith, el cual trabajando en Oaxaca en 1970, realizó una labor de seroepidemiología (Goldsmith, 1978¹ y Goldsmith, 1978²) y dio a conocer la problemática del Estado de Oaxaca, sobre esa enfermedad, aunque minimizada por exigir un título serológico muy elevado 1:128 para considerarlo como caso. Para 1991 existían al menos 15 grupos de investigación sobre enfermedad de Chagas, de los cuales la mitad se localiza en la Ciudad de México (Velasco Castrejón, 1991).

En los últimos años el estudio de la enfermedad de Chagas en México, ha mostrado un gran florecimiento, merced al nacimiento de nuevos grupos de estudio, y al trabajo más calificado tanto de los grupos tradicionales como de los nuevos.

1.3 Agente etiológico

Trypanosoma cruzi es un protista caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria, en la cual su genoma se encuentra ordenado en una compleja y compacta red denominada cinetoplasto. Su clasificación taxonómica (Momen, 1999) es:

Reino	Protista	Sub Phylum	Mastigophora
Sub Reino	Protozoa	Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida	Género	Trypanosoma
Sub Orden	Trypanosomatina	Sub género	Schizotrypanum
Familia	Trypanosomatidae	Especie	cruzi
Phylum	Sarcomastigophora		

Los análisis de isoenzimas y biología molecular, muestran claras evidencias de la existencia de dos subgrupos genéticos designados como: Linaje 1 predominantemente de ciclo doméstico y Linaje 2 de ciclo selvático, este último se divide en 5 grupos. Ambos linajes son patógenos para el hombre. En sus distintos hospederos y en medios de cultivo *Trypanosoma cruzi* presenta tres tipos morfológicos diferentes (Fig. 1):

⊕ **Tripomastigote**: Fusiforme de aproximadamente 20 a 25 μm de largo, citoplasma granuloso con un núcleo central. Presenta un cinetoplasto subterminal, de éste nace una membrana ondulante que en su borde libre lleva un flagelo. Se encuentra circulando en la sangre de los mamíferos y en el extremo posterior del vector (tripomastigote metacíclico); no se divide.

⊕ **Epimastigote**: Fusiforme de unos 20 a 30 μm , con el cinetoplasto ubicado delante del núcleo. Tiene una corta membrana ondulante y un flagelo libre. Es la forma de multiplicación en el intestino del vector y la forma predominante en los medio de cultivo.

⊕ **Amastigote**: Elemento redondeado de 3 a 6 μm aproximados, en el que se distinguen el núcleo y el cinetoplasto. Posee un flagelo corto no emergente, el cual no se distingue con microscopía de luz. Esta es la forma de multiplicación intracelular en el mamífero (Guzmán, 1999).

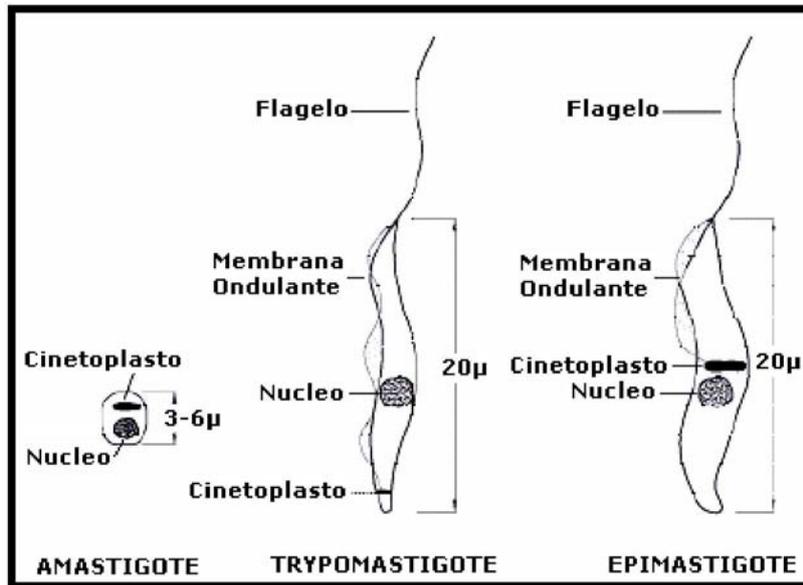


Fig. 1 Formas evolutivas del *Trypanosoma cruzi*.

1.4 Ciclo de vida

T. cruzi se presenta en varios estadios durante su crecimiento y desarrollo. La infección es transmitida por chinches a más de 100 diferentes especies de animales salvajes y domésticos. Las chinches que pueden actuar como vector son hemípteros de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, de aproximadamente 6 cm de largo, que se alimentan de sangre durante la noche (Mc Ghee, 1980). Estas chinches se infectan al morder a un animal infectado, ingiriendo así al parásito. Dentro de la chinche y a lo largo de su tracto digestivo, el parásito sufre una serie de transformaciones antes de ser expulsado en las heces. A mitad del intestino se transforman en epimastigotes que se replican mediante fisión binaria y finalmente, aproximadamente 2 semanas después, llegan al recto, donde se convierten en tripanosomas metacíclicos. La infección del mamífero se inicia cuando un insecto infectado defeca mientras se alimenta, liberando tripanosomas metacíclicos en sus heces y orinas. Los tripanosomas, incapaces de atravesar la piel intacta, entran en el organismo a través de heridas en la piel (sitio de la mordedura), o a través de las mucosas, invadiendo inmediatamente las células hospederas. Dentro de las células, los tripomastigotes pierden su flagelo y se redondean para formar amastigotes, los cuales se multiplican intracelularmente por fisión binaria. Cuando los amastigotes casi llenan la célula, se transforman en tripomastigotes procíclicos, los cuales son liberados a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo, rompiendo la célula. Los tripomastigotes tiene la habilidad de invadir otras células, dónde se transforman de nuevo en amastigotes,

repetiéndose indefinidamente el ciclo de infección. El ciclo de vida se cierra cuando un triatomino no infectado se alimenta de un animal con tripanosomas circulando (Cevallos, 2003) Fig. 2.

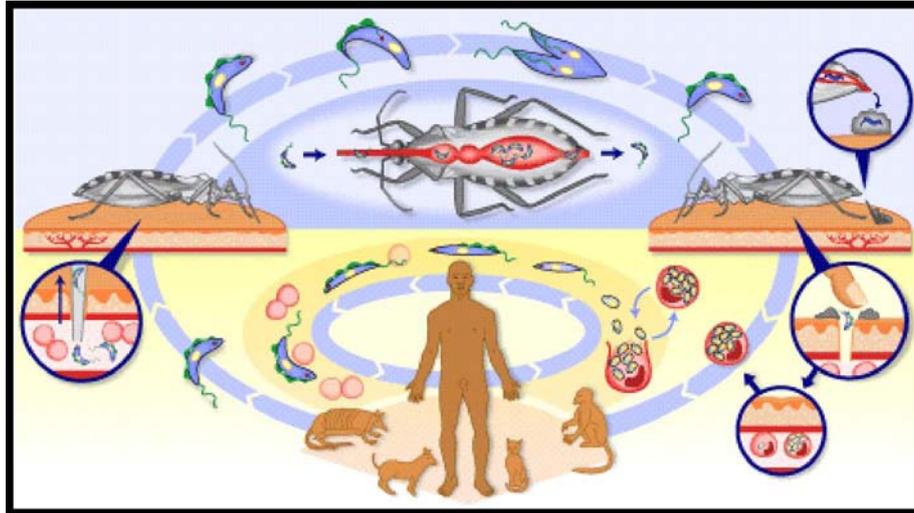


Fig. 2 Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*.

1.5 Formas de transmisión

⊕ Transmisión vectorial, es la principal vía de transmisión, el 80% de los casos en humanos se debe a la transmisión vectorial (Rojas Loyza, 2002), a través de las heces del Triatoma. Esta se da cuando los parásitos presentes en las heces del insecto penetran por la herida que causa la picadura, por lesiones en la piel o por las mucosas de ojos, boca o nariz (URL²)

⊕ Vía trasplacentaria, la infección prenatal por vía trasplacentaria de *Trypanosoma cruzi* presente en la circulación materna con infección aguda o crónica, es posible, pero no obligada.

⊕ Por transfusión, otro considerable número de infecciones se produce mediante la transfusión de sangre proveniente de donadores con infecciones ignoradas, generando cuadros clínicos agudos en los receptores, se han registrado casos mortales fulminantes.

⊕ Por trasplante de órganos, los casos de infección por algún trasplante de órgano de una persona infectada hacia una sana son poco conocidos; pero en algunos lugares son

frecuentes, partiendo del hecho de que los tripomastigotes penetran células de algunos órganos y forman nidos de amastigotes, principalmente células del corazón.

⊕ Por contaminación de alimentos, la transmisión oral de enfermedad de Chagas se ha documentado en las varias epidemias en Brasil, Colombia, y México, se lleva a cabo con la ingestión de comida contaminada con triatomíneos infectados (WHO, 2000).

⊕ Por contaminación accidental en laboratorios, son múltiples los casos conocidos de esta enfermedad por infección accidental en laboratorios médicos, por manipulación de chinches provenientes de animales infectados, cultivos de *T. cruzi* o material biológico proveniente de personas infectadas.

La transmisión natural de *T. cruzi* en la que interviene el vector se lleva a cabo en tres ciclos: el *doméstico*, en el cual el vector infesta de manera exclusiva la vivienda humana en áreas rurales y suburbanas; el *peridoméstico*, donde se mantienen alrededor de núcleos de población humana, y el *enzoonótico*, que se presenta alejado de asentamientos humanos y con participación exclusiva de reservorios silvestres y ecotopos naturales (Wendel, 1992).

1.6 Vectores

Se considera que todas las especies de triatomíneos son vectores potenciales de *T. cruzi*, pero los factores más importantes que determinan su capacidad de transmisión son: un intervalo corto entre la alimentación y la defecación, su adaptación a la vivienda humana, el alto grado de antropofilia y su amplia distribución geográfica (Guzmán Bracho, 2001 y TDR, 1993)

Sin considerar la subespecie, hay 30 especies de triatomíneos presentes en México, distribuidos en siete géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius*, y *Triatoma*. Basado en los hábitos domiciliarios y la facilidad para defecar inmediatamente después de ingerir sangre, 9 de éstos han sido considerados vectores importantes de *Trypanosoma cruzi* (Vidal Acosta, 2002 y Cruz Reyes, 2006) Fig. 3.

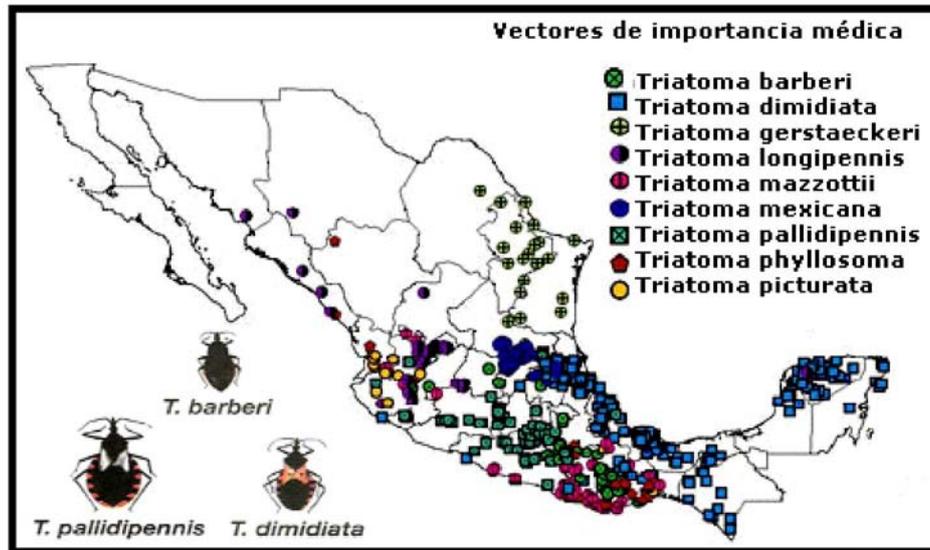


Fig. 3 Vectores de importancia médica en México.

La mayoría de las especies ocupa principalmente hábitats selváticos en asociación con sus hospederos y entre los cuales sobresalen: madrigueras de mamíferos, nidos de aves, montones de rocas, huecos de árboles, cuevas y en general todo tipo de accidente geográfico que les proporcione refugio. Otras especies han colonizado el ambiente peridoméstico habitando gallineros, corrales, montones de leña y piedras, en tanto que algunas pocas se han adaptado a vivir dentro de la vivienda humana. Durante el día reposan en los refugios y por la noche se acercan a los hospederos para alimentarse succionando cantidades variables de sangre que va desde menos de 0.5 mL hasta 6 mL en los adultos de ciertas especies (González Fernández, 2000).

1.7 Reservorios

En México, han sido clasificados como reservorios de *T. cruzi*, por demostración parasitológica animales silvestres y domésticos. De los silvestres los más frecuentes son la rata, el armadillo, el tlacuache, la ardilla y ratones. Entre los reservorios domésticos además del perro y el gato que tienen gran trascendencia epidemiológica, la vaca y el caballo son víctimas frecuentes de la mordedura de estos triatominos (Velasco Castrejón, 1992). La distribución de los reservorios en México se puede observar en la Fig. 4.

La enfermedad se establecía casi exclusivamente en áreas rurales, donde el insecto transmisor, correspondiente a la subfamilia de los Triatominae, puede reproducirse y alimentarse en su reservorio natural (las más comunes son el armadillo y marsupiales).

Actualmente con las migraciones internas desde zonas rurales a las grandes ciudades el establecimiento de la enfermedad de Chagas está cambiando su perfil epidemiológico. Dependiendo de las interacciones locales de los vectores y sus hospedadores, otros animales como los humanos infectados, animales domésticos como gatos, perros, ratones domésticos y animales silvestres pueden servir también como reservorios. Aunque los triatominos se alimentan de aves, éstas parecen tener mecanismos de inmunidad frente a la infección y por ello no son consideradas reservorios del *T. cruzi*, aunque puede haber un eslabón entre las aves como fuente alimentaria del insecto y la proximidad a las habitaciones humanas.

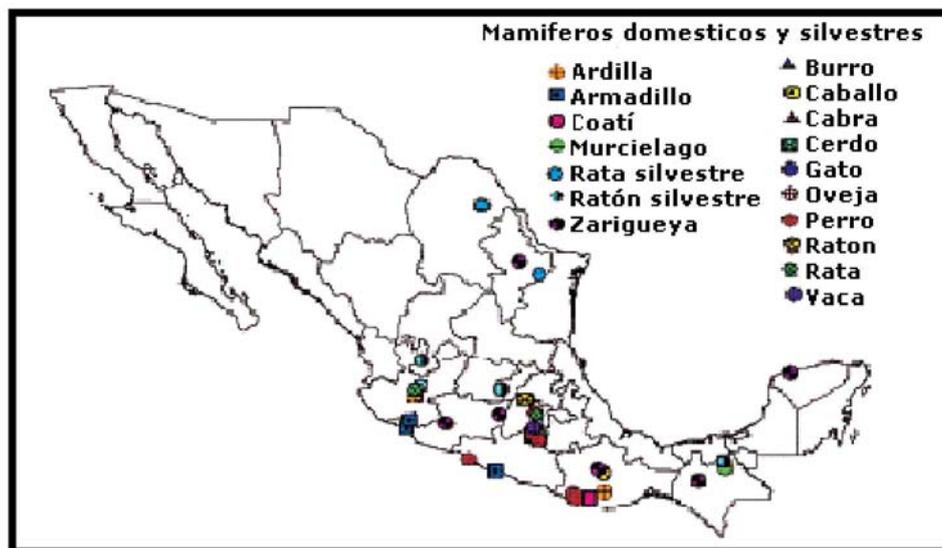


Fig. 4 Distribución de reservorios salvajes y domésticos en México.

1.8 Epidemiología

La infección vectorial se localiza únicamente en América, desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile (Cevallos, 2003). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la enfermedad de Chagas afecta entre 15 y 16 millones de personas, con unos 28 millones (25% de la población de Latinoamérica) de personas que estarían en riesgo de contraer la enfermedad (Tabla 1), matando anualmente a cerca de 15 mil personas (OMS, 2005). La enfermedad crónica de Chagas sigue siendo un gran problema de salud en muchos países de América Latina, a pesar de la eficacia de medidas preventivas e higiénicas, tales como el eliminar los insectos transmisores, lo cual ha reducido a cero la aparición de nuevas infecciones en al menos dos países en la región: Uruguay y Chile.

Parámetros epidemiológicos	1990	2000	2006
Muertes anuales	>45.000	21.000	12.500
Casos humanos de infección	30 millones	18 millones	15 millones
Nuevos casos anuales	700.000	200.000	41.200
Población en riesgo	100 millones	40 millones	28 millones
Distribución	21 países	21 países	21 países

Tabla 1. Cambios en los parámetros epidemiológicos por la interrupción de la transmisión y descenso de la incidencia de la enfermedad de Chagas.

Con el incremento en la migración de poblaciones, la posibilidad de transmisión por transfusión sanguínea ha llegado a ser sustancial en los Estados Unidos. Aproximadamente 500 000 personas infectadas viven en los Estados Unidos. Adicionalmente a ello, se ha encontrado que el *T. cruzi* ha infectado a marsupiales y mapaches en regiones que se extienden hasta Carolina del Norte (Kirchhoff, 1993).

La situación en México la presentan estudios como la primera Encuesta Nacional Serológica (ENSE) realizada en el periodo de 1987 a 1989, en donde se muestra que el 1.6% del total de la población presentaba infección y que la transmisión por transfusión ocurría en casi todos los estados del país, aunque se presentaba con mayor magnitud en estados como Chiapas, Oaxaca, Hidalgo, San Luis Potosí, Zacatecas, Veracruz, Yucatán y Quintana Roo (Velasco Castrejón, 1992). En el período 1990-1999 se han reportado 216 casos, de los cuales el estado de Morelos notificó 41, (18.9%), San Luis Potosí 32 (14.8%), Chiapas 31 (14.3%), Jalisco 24 (11.1%), y los restantes 88 casos (40.9%) correspondieron a diecisiete entidades (SSA, 1990-1998).

Guzmán Bracho en el 2001, publicó datos de seroprevalencia en México, y en esto puso de manifiesto que individuos de áreas en México, donde la enfermedad de Chagas es endémica, tienden a migrar en busca de trabajo a los Estados Unidos y a zonas industrializadas de ciudades mexicanas. El estudio reveló una seroprevalencia elevada en ciudades fronterizas norteamericanas donde no se han encontrado vectores domésticos.

El problema de la enfermedad de Chagas por hemotransfusión en México, se comenzó a tomar en consideración cuando en 1978 Goldsmith y colaboradores, publicaron un estudio en donde se reporta un 4.4% de seropositividad en donadores solamente en la ciudad de Oaxaca. Mucho tiempo después en el 2001, Guzmán Bracho, menciona que se realizó

una búsqueda en 65 000 donadores de sangre de los centros de transfusión mostrando 1.5% de predominio de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Los estados económicamente más pobres (Hidalgo, Oaxaca y Chiapas) mostraron tres veces más riesgo de transmisión por *T. cruzi*, que los estados económicamente fuertes (Baja California, Nuevo León y Chihuahua). Esto es debido a que no se realizaba la búsqueda de anticuerpos anti-*T. cruzi* en unidades de sangre.

1.9 Cuadro clínico

En 1971, en una reunión de expertos enfocada a los aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas, se acordó el uso de tres fases clínicas para el estudio del padecimiento: fase aguda, fase indeterminada y la fase crónica (Guzmán Bracho, 2000).

1.9.1 Fase aguda

La fase aguda se presenta después de un período de incubación de 4 a 10 días, y dura generalmente de tres días a cuatro semanas. Se hace evidente con un cuadro febril y presencia o no del chagoma de inoculación como nódulo o úlcera, generalmente en cara o miembros superiores (Cevallos, 2003). Cuando la puerta de entrada ha sido la conjuntiva, hay un edema no doloroso de los párpados y de los tejidos aledaños que característicamente es unilateral al cual se le conoce como signo de Romaña (Rodríguez Morales, 2005) Fig. 5.

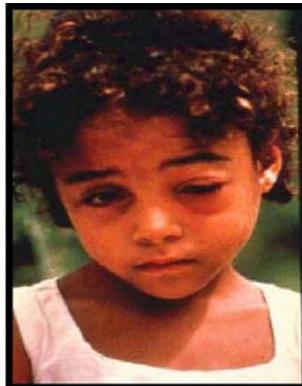


Fig. 5 Manifestación del Signo de Romaña.

La fase aguda de la enfermedad es generalmente asintomática, sólo 1-2% de los pacientes presentan síntomas, los cuales se presentan 1-2 semanas después de adquirir la infección. Las manifestaciones clínicas de la fase aguda incluyen fiebre, anorexia, diarrea, inflamación de los ganglios, inflamación del hígado y del bazo y miocarditis. La

fase aguda se resuelve espontáneamente en 4-8 semanas. Un pequeño número de pacientes, generalmente niños, desarrollan miocarditis aguda o meningoencefalitis que pueden ser fatales. En estos casos, los estudios post-mortem muestran presencia de numerosos parásitos, en su estadio de amastigotes, en los músculos liso y esquelético, en el corazón, así como también en las células gliales del sistema nervioso (Rodríguez Morales, 2005). La fase aguda post-transfusional se presenta de 8 a 49 días después de recibir el hemoproducto infectado y cursa con fiebre de hasta 39.5° C, adenopatía generalizada y esplenomegalia. La infección congénita con *T. cruzi* puede producir aborto, muerte intrauterina o enfermedad aguda, la cual puede detectarse al momento de nacer, pero se hace evidente varias semanas después. La enfermedad de Chagas congénita se caracteriza por fiebre, ictericia, anemia, crecimiento de bazo e hígado y lesiones cutáneas. La mortalidad de la enfermedad congénita es secundaria a miocarditis, neumonitis o encefalitis. La fase aguda sintomática cede espontáneamente, en un periodo de 4 a 6 semanas, y la enfermedad entra a la fase indeterminada, sin manifestación clínica alguna y cuya evidencia de fácil demostración, es la presencia de anticuerpos séricos anti-*T. cruzi*.

1.9.2 Fase indeterminada

Empieza 8-10 semanas después de la infección (Guzmán Bracho, 2000). Se trata de personas aparentemente sanas, en las que la inoculación del parásito y los síntomas de las formas agudas o crónicas no son reconocidos por el portador del parásito. En esta forma, son muy escasos los tripomastigotes en sangre y amastigotes en tejidos (Cevallos, 2003). A nivel estructural y funcional los tejidos del hospedero son normales y se refleja en la ausencia de alteraciones en los exámenes de gabinete, cardiológicos y de tracto digestivo, la enfermedad parece haberse curado espontáneamente, ya que no se observan manifestaciones clínicas.

La situación del portador se evidenció, generalmente, cuando la persona desea donar sangre y el tamizaje demuestra serología positiva para *Trypanosoma cruzi*. Entre el 70 y el 80% de los individuos infectados permanecen en esta fase durante toda su vida, el 20 al 30% restante evolucionan a la fase crónica.

1.9.3 Fase crónica

La fase crónica de la enfermedad se manifiesta en aproximadamente un 30% de los casos, 10 a 30 años después de la infección inicial (Guzmán Bracho, 2000), casi siempre en personas de 20 a 50 años de edad.

Principalmente se presentan complicaciones en el corazón y en el tracto digestivo. Los problemas cardíacos son los más serios y se manifiestan principalmente como daño al tejido muscular del corazón y con trastornos de la conducción de la señal eléctrica del corazón, lo que produce insuficiencia cardíaca y facilita la producción de tromboembolias (Guzmán Bracho, 2000). El pronóstico de los individuos con cardiopatía crónica chagásica evidente es malo, con una sobrevivencia de alrededor de 5 años. La muerte súbita es frecuente y sucede por taquicardia paroxística y fibrilación ventricular y más de la mitad presentan insuficiencia cardíaca, cuya descompensación significa poco tiempo de vida.

La afectación gastrointestinal consiste en la dilatación del esófago (megaesófago) y del colon (megacolon) y se debe muy probablemente a daño local al sistema neuronal autónomo. El megaesófago se manifiesta como dificultad para tragar, dolor al tragar, regurgitaciones, desnutrición, neoplasias, rompimiento del esófago, fístulas y alteraciones pulmonares. El megacolon se manifiesta como dolor abdominal y estreñimiento crónico; en casos muy severos puede haber obstrucción y perforación. La hipertrofia de tejido se debe al debilitamiento de células ganglionares en el plexo mesentérico provocando la disminución del peristaltismo y la acumulación del contenido colónico. Por razones que se desconocen, la enfermedad chagásica gastrointestinal es común al sur del Amazonas, pero rara en México y en Centroamérica (Guzmán Bracho, 2000). Todos estos daños ocurren con la virtual ausencia del parásito.

Finalmente, en la fase crónica, también es importante definirla en forma específica, es decir, subestratificarla en fase crónica reciente y en fase crónica tardía (Rodríguez Morales, 2005).

Fase crónica reciente. Infección adquirida en los últimos 10 años, puede incluir niños.

Fase crónica tardía. Infección adquirida hace más de 10 años.

1.10 Inmunopatología

La resistencia a la infección con *T. cruzi* ha sido asociada con la mayoría de los mecanismos inmunitarios efectores conocidos, que fueron estudiados principalmente en modelos experimentales en los que los ratones desarrollan altas parasitemias. En estos casos, los principales mecanismos efectores para el control del parásito en la etapa aguda serían los anticuerpos específicos, dependientes de linfocitos TH2, y el aumento de la actividad tripanocida de células fagocíticas por IFN- γ (Cardoni, 1999).

Durante la fase temprana de la infección y antes del desarrollo de inmunidad específica, puede encontrarse a *T. cruzi* en los diferentes tejidos y órganos, y normalmente se acompaña por una reacción inflamatoria mononuclear en pequeños focos necróticos (Gazzinelli, 1998). El control de la infección con *T. cruzi* depende principalmente de la producción de IFN- γ . Durante la infección experimental esta citocina se produce primero, principalmente por las células NK y después por las células T (Une, 2003) Fig. 6.

En el hospedero infectado, el control del número de parásitos depende principalmente de la activación de la óxido nítrico sintetasa de macrófagos inducible por IFN- γ (iNOS), y del consecuente aumento de la producción de óxido nítrico (NO) (Cardoni, 1999).

En la etapa aguda se observa globalmente una respuesta TH1 con producción de IL-12 y de altas concentraciones de IFN- γ . Enmarcan a esta respuesta una activación generalizada de células fagocíticas, que parece estar relacionada tanto con el proceso inflamatorio como con la resistencia a la infección, y la aparición de infiltrados inflamatorios en varios tejidos (Une, 2003).

El primer blanco de la IL-12 liberada por los macrófagos expuestos a productos de protozoarios intracelulares son las células asesinas naturales (NK). Después de la exposición a la IL-12, las células NK producen niveles altos de IFN- γ , incluso en ausencia de células T. El IFN- γ derivado de las células NK es responsable de la activación de las funciones efectoras microbicidas (por ejemplo, la síntesis del óxido nítrico) exhibido por los macrófagos durante la fase temprana de la infección. La interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) potencializan los efectos de la IL-12 en las células NK y el IFN- γ refuerza la síntesis de IL-12 por macrófagos expuestos a los productos microbianos (Gazzinelli, 1998).

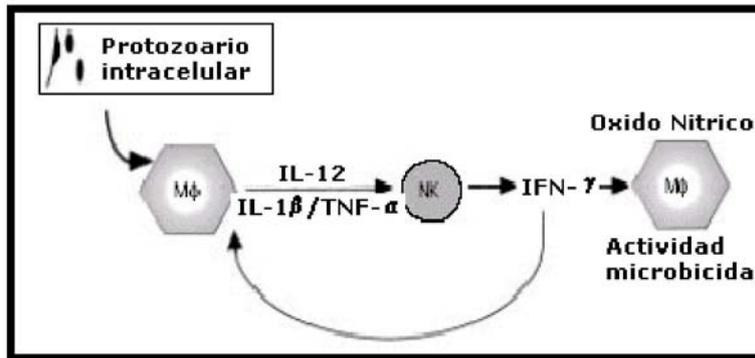


Fig. 6 Inducción de IFN- γ por células NK.

Las citocinas proinflamatorias, principalmente el TNF- α y el IFN- γ , desempeñan un papel fundamental en el control del parasitismo tisular durante la infección por *T. cruzi*. En modelos experimentales se ha podido establecer al corazón y al sistema nervioso central como los principales sitios de reactivación de la infección. Los macrófagos humanos *in vitro* infectados con *T. cruzi* y los cardiomiocitos, responden a quimiocinas incrementando la captación de *T. cruzi*, aumentando la producción de óxido nítrico y controlando la multiplicación del parásito (Pérez Clímaco, 2007).

La estimulación de las células Th precursoras (Thp) por células profesionales presentadoras de antígeno como las células dendríticas, induce la síntesis de la IL-2 que promueve la proliferación y la diferenciación hacia sus últimas fases efectoras, Th1 o Th2, vía Th0. Los niveles altos de IL-12 favorecen la diferenciación hacia el fenotipo Th1 y desarrolla la inmunidad mediada por células. En contraste, los altos niveles de IL-4 favorecen la diferenciación hacia el fenotipo Th2. El IFN- γ producido por las células NK o células Th1 es un inhibidor potente del desarrollo de linfocitos Th2, mientras favorece al fenotipo Th1 ^[30] (Fig. 7). La respuesta TH1 se caracteriza por la liberación de IL-2, IFN- γ y TNF- α , mientras que IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 están asociadas con la respuesta TH2. La IL-12 induce la producción de IFN- γ por células NK, en la respuesta no adaptativa, así como por células T para el desarrollo de la respuesta TH1 específica (Cardoni, 1999).

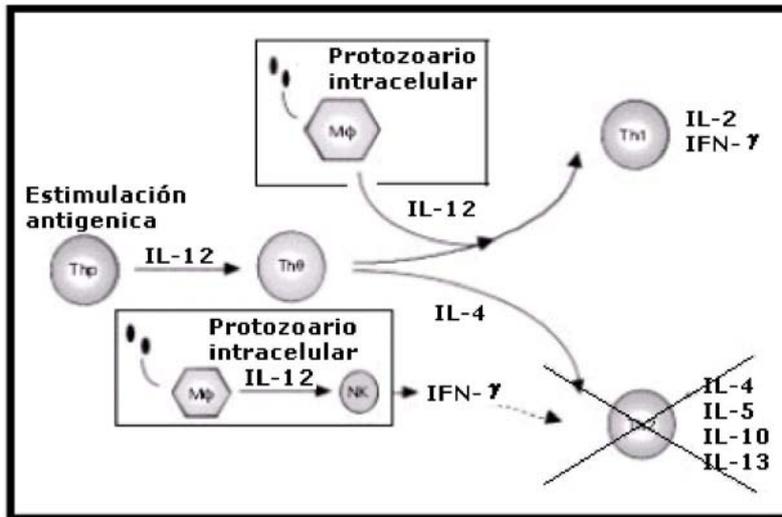


Fig. 7 Proliferación y diferenciación de los fenotipos Th1 y Th2.

Los macrófagos expuestos a los productos microbianos producen IL-10 así como el factor crecimiento transformante β (TGF- β) activo que modula la síntesis de IL-12, IL-1 β y TNF- α por los macrófagos, inhibiendo así la inducción de la síntesis de IFN- γ por las células de NK y los linfocitos Th1. La actividad microbicida (por ejemplo, síntesis de óxido nítrico) desplegada por el IFN- γ activada por macrófagos es también inhibida por IL-10 y TGF- β (Gazzinelli, 1998). La IL-10 juega un papel regulador importante en la resistencia a la infección con *T. cruzi* conferida por la respuesta inmunitaria específica (Fig. 8). Sin embargo, la IL-10 también es un regulador esencial de las respuestas inmune e inflamatoria que son perjudiciales al hospedero. Este papel regulador puede ser muy importante controlando la patología en las situaciones de intensa activación de respuesta de citocinas de tipo TH1, como es el caso en la infección con *T. cruzi* (Abrahamsohn, 1998).

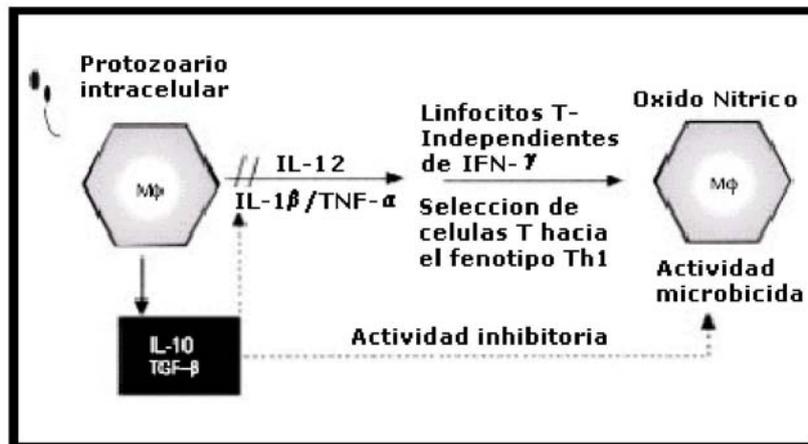


Fig. 8 Regulación de la síntesis de INF- γ por la IL-10 y el TGF- β .

En la infección con *T. cruzi*, las células productoras de TGF- β se encuentran en el bazo, tanto en la fase aguda como crónica de la infección. Además, la administración *in vivo* de TGF- β aumenta la parasitemia y la mortalidad.

In vivo, la IL-10 y el TGF- β podrían disminuir la activación de células fagocíticas, como reflejo de su capacidad inhibidora de la destrucción intracelular de *T. cruzi in vitro* en macrófagos activados. De esta forma, a pesar de disminuir la destrucción del parásito, limitarían el daño tisular causado por los mediadores de macrófagos activados (Cardoni, 1999).

La respuesta inmunológica es polarizada a una respuesta tipo TH2 para combatir patógenos extracelulares mediante la producción de anticuerpos, mientras que una respuesta tipo TH1 favorece una reacción inflamatoria para inducir una respuesta inmunitaria celular. El balance de estas subpoblaciones de linfocitos T cooperadores, así como el balance de las citocinas pro y antiinflamatorias que producen es vital para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y control de la respuesta inflamatoria (Ortiz, 2009).

El control homeostático de la respuesta inmunitaria para prevenir el daño tisular y limitar la duración del proceso inflamatorio, involucra células con potencial regulador que forman parte de la inmunidad innata y adaptativa tales como las células dendríticas y los linfocitos T reguladores (Treg) (Fabbro, 2007). La función supresora de los linfocitos Treg normaliza el grado de activación de los linfocitos T durante la respuesta inmunológica. La carencia de la actividad de linfocitos Treg conduce a condiciones patológicas caracterizadas por una exacerbada respuesta inmunológica (Ortiz, 2009).

El aumento en la frecuencia de linfocitos Treg puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad crónica de Chagas, como efecto secundario a un mecanismo de control para evitar el daño tisular. Sin embargo, los datos reportados en la infección humana muestran que la mayoría de pacientes en fase crónica indeterminada (asintomática) presentan un perfil predominante de citocinas reguladoras, al compararlos con pacientes crónicos con la forma cardíaca de la enfermedad, siendo los linfocitos T reguladores la principal fuente de citocinas (Lasso, 2009).

1.11 Mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica

El primer mecanismo observado en *T. cruzi*, es la evasión a la vía alterna del complemento (VAC), ya que mientras el epimastigote del vector es susceptible, el tripomastigote infeccioso extracelular es resistente a este mecanismo. Esta propiedad se debe a que el tripomastigote posee una glicoproteína de 160 kDa (gp160) que es homóloga a la proteína reguladora del complemento DAF (*decay accelerating factor*); en la misma forma que este factor, la gp160 se une a C3b e inhibe la captación de miembros subsecuentes de la cascada del complemento, previniendo la formación de la convertasa y lisis del parásito. Además, el enlace de C3b a la gp160 permite a una proteasa del parásito degradar a este complejo, lo cual puede representar un mecanismo para evitar la lisis, así como la opsonización mediada por complemento (Rosales Borjas, 2008).

También se ha propuesto que la IgM formada se enlaza a la superficie de los tripomastigotes e interfiere con el enlace de anticuerpos IgG inhibidores, previniendo así su eliminación. En relación a la inmunidad mediada por células (IMC), se ha descrito también una supresión mediada por células T, asociada con un aumento en la actividad fagocítica. Otro mecanismo de evasión de *T. cruzi* lo lleva a cabo a través de una glucosilfosfatidilinositol (GPI) anclada a la mucina (AgC10) que se une al macrófago e induce la secreción de interleucina (IL)-1 β pero no de IL-12 o factor de necrosis tumoral (TNF)- α , esenciales para la protección de la enfermedad de Chagas. Además, el tripomastigote de *T. cruzi* expone una fosfatidilserina que dispara una vía de señalamiento del factor de crecimiento transformante (TGF)- β que conduce a la desaparición de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en los macrófagos infectados. Esta desactivación del macrófago favorece la supervivencia del parásito intracelular y puede ser una característica común de parásitos intracelulares obligatorios que tienen que enfrentarse a macrófagos activados (Rosales Borjas, 2008).

1.12 Diagnóstico

Para hacer un diagnóstico apropiado de la enfermedad de Chagas es de suma importancia tener presente los modos de transmisión, las fases diferentes de la infección, así como la fisiopatología y las manifestaciones clínicas de la enfermedad (López Antuñano, 2000).

En general, el diagnóstico de una enfermedad infecciosa se apoya en informaciones epidemiológicas, clínicas y de laboratorio. En la infección por *Trypanosoma cruzi*, se aplica lo mismo (Luquetti, 2007).

Diagnóstico clínico-epidemiológico

Los criterios epidemiológicos se basan en la investigación que debe realizarse al iniciar la clasificación clínica del caso, o al sospechar que se trata de un caso de Enfermedad de Chagas, siendo necesario investigar:

- Antecedentes epidemiológicos (procedencia o residencia de áreas endémicas, características de la vivienda y conocimiento del vector).
- Antecedentes de transfusión sanguínea.
- Antecedentes de transplantes de órganos.
- Antecedentes de madre seropositiva a *T. cruzi*.
- Antecedentes de infección previa.
- Síntomas y signos.

También se debe tomar en cuenta la posibilidad de infección accidental por manejo de sangre, vectores o medios de cultivo infectados por *T. cruzi* o por la ingestión de alimentos contaminados con heces de Triatomino.

Diagnóstico de laboratorio

En lo referente al diagnóstico de laboratorio, los exámenes a utilizar dependerán de la etapa clínica que curse el paciente. En las etapas iniciales de la enfermedad se encuentran parasitemias importantes, las que a medida que transcurre la infección van disminuyendo hasta hacerse mínimas y aleatorias. Por ello en la etapa aguda los estudios van a centrarse en la búsqueda del agente (metodología parasitológica directa), en las etapas crónicas (inaparente y sintomática) el diagnóstico se realiza fundamentalmente por métodos serológicos, que ponen de manifiesto la reacción inmunológica (URL⁵).

Etapa aguda

En esta etapa se incluyen, además de los cuadros agudos adquiridos por vía vectorial, los cuadros producidos por la transfusión sanguínea, por los transplantes de órganos, la reactivación en inmunocomprometidos y transmisión congénita.

Los estudios estarán centrados en la búsqueda y reconocimiento de *Trypanosoma cruzi* en sangre (Fig. 9). La sensibilidad de los mismos es variable, por lo que es aconsejable mantener la siguiente rutina diagnóstica de acuerdo a protocolos establecidos (URL⁵): Examen directo, método de Strout, microhematocrito, hemocultivo y serología.

En la serología convencional, en la etapa aguda la capacidad de identificar anticuerpos se registra a partir de la 4^a semana de la infección.

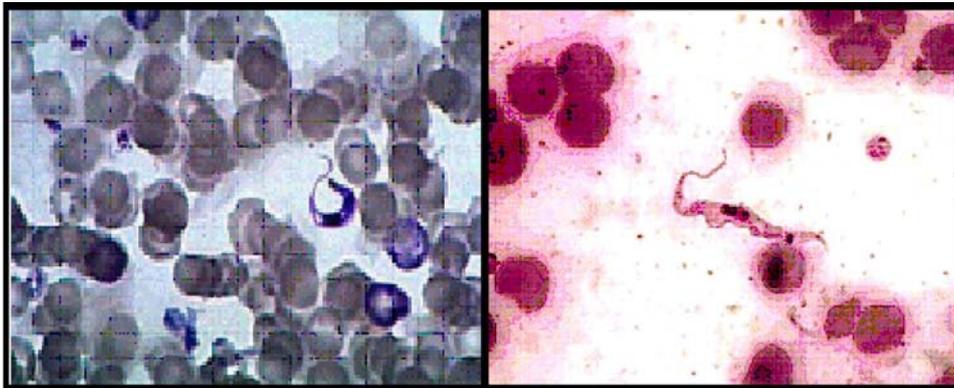


Fig. 9 Examen directo de sangre teñida con Giemsa, en donde se observa un tripomastigote.

Etapa indeterminada y crónica

En estas etapas, las parasitemias son transitorias, por lo que la detección del parásito en sangre es totalmente aleatoria y de baja sensibilidad. El diagnóstico se basa en el hallazgo de anticuerpos circulantes anti-*T. cruzi*. Se recomienda utilizar al mismo tiempo por lo menos dos técnicas de formato diferente para identificar a un paciente como chagásico:

Las técnicas serológicas son de mayor aplicación durante estas etapas que es cuando la parasitemia en el torrente sanguíneo es baja o nula y las técnicas directas no pueden evidenciar la presencia del parásito. Detectan anticuerpos a partir de la segunda o tercera semana de iniciada la infección (Vega Chirinos, 2006).

⊕ ELISA: la sensibilidad es de 100% y la especificidad es del 96%, es actualmente el método diagnóstico más difundido.

⊕ Inmunofluorescencia indirecta (IFI): la sensibilidad es de 100 %, y su especificidad es cercana al 100 %.

⊕ Hemaglutinación indirecta (HAI): la sensibilidad es del 96 % y su especificidad es del 98%.

La sensibilidad y la especificidad son las medidas tradicionales y básicas del valor diagnóstico de una prueba. Miden la discriminación diagnóstica de una prueba en relación a un criterio de referencia (Fescina, 1985).

La **sensibilidad** (S) indica la capacidad de la prueba para detectar a un sujeto enfermo, es decir, expresa cuan "sensible" es la prueba a la presencia de la enfermedad. Se define como:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Total de enfermos}} = \frac{VP}{VP + FN}$$

La **especificidad** (E) indica la capacidad que tiene la prueba de identificar como sanos (no enfermos) a los que efectivamente lo son y se expresa como:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Total de no enfermos}} = \frac{VN}{VN + FP}$$

La selección de las técnicas serológicas a usar según la fase clínica de la enfermedad se realiza como se indica en la tabla 2.

TÉCNICA	FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS		
	AGUDA	INDETERMINADA	CRÓNICA
Examen directo	++	-	-
Frotis y gota gruesa	+	-	-
Strout	+++	+	-
Microstrout	+++	+	-
Microhematocrito fluorescente	+++	++	-
Xenodiagnóstico	+++	++	+
Hemocultivo	+++	+	+
Inoculación en animales	+++	+	+
Aglutinación directa (AD)	++	+++	+++
Hemaglutinación indirecta (HAI)	++	+++	+++
Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	+	+++	+++
ELISA (IgG)	+	++	++

Tabla 2. Selección de las técnicas de laboratorio según la fase clínica del padecimiento. En donde (+) indica poco útil, (++) útil y (+++) muy útil.

En la actualidad se están examinando fracciones antigénicas del parásito que posiblemente permitirán la interpretación del estadio clínico del paciente. Así mismo, técnicas inmunocromatográficas basadas en proteínas recombinantes o péptidos sintéticos para un diagnóstico rápido de la infección.

Los criterios de laboratorio para la clasificación de los casos clínicos se harán según se indica en la tabla 3 (PROY-NOM-032-SSA2-2000):

Parásitos cualquier método	Serología dos pruebas	Sintomatología	Criterio diagnóstico
+	+	+	Agudo
+	-	+	Agudo
-	+	+	Agudo
+	+	-	Indeterminado
-	+	-	Indeterminado
-	+	+	Crónico
-	-	+	No caso

Tabla 3. Criterios para la clasificación de casos en la Enfermedad de Chagas.

La demostración del parásito y/o la reactividad positiva del suero del paciente a dos técnicas de determinación de anticuerpos es la confirmación de infección por *T. cruzi*, sin embargo por las características de esta parasitosis un resultado negativo no indica necesariamente ausencia de infección. El resultado serológico positivo es indicativo de infección y no del estado clínico del paciente, el mismo sirve de orientación al médico, junto con el examen clínico y los antecedentes, para llegar al diagnóstico final.

1.13 Tratamiento

El tratamiento etiológico en la enfermedad de Chagas está dirigido a eliminar el parásito del organismo del hospedero, y evitar la aparición y/o progresión de lesiones viscerales, procurando la cura total del paciente (URL⁵). LA OMS postulo que el fármaco ideal debería de cumplir con los siguientes aspectos (Pinto Días, 2003):

- ⊕ La cura para la fase aguda y para la fase crónica
- ⊕ De administración oral para adultos y una presentación pediátrica
- ⊕ Efectividad en pocas dosis (o dosis única)

-
- ⊕ Bajo costo
 - ⊕ Ausencia de efectos secundarios indeseables
 - ⊕ La no inducción de resistencia

Desde la década de los años 1930 se realizaron intentos para obtener una droga apropiada para el tratamiento de la infección por *Trypanosoma cruzi*. En forma experimental se han utilizado cerca de un centenar de compuestos, de los cuales solamente algunos superaron la etapa preclínica (Sosa Estani, 1999). Sólo dos medicamentos han demostrado poder tripanosomicida, con efectos adversos tolerables: el nifurtimox (Lampit®) y el benznidazol (Rochagan®) (Luquetti, 2007).

El **nifurtimox** un nitrofurano (3-metil-4-(5'nitro furfúril idenamína)-tetra-hidro-4H-1,4-tiazida-1,1 dióxido) (López Antuñano, 1997), fue aprobado para su uso en 1965. Actúa por la vía de la reducción del grupo nitro a radicales aniónicos inestables, lo cual produce una reacción que conlleva a la producción de metabolitos de oxígeno reducido altamente tóxicos (Ej.: anión superóxido, peróxido de hidrógeno). *T. cruzi* es deficiente en mecanismos de detoxificación para metabolitos de oxígeno, particularmente peróxido de hidrógeno, muy sensible al estrés oxidativo (Rodríguez Morales, 2005).

El **benznidazol** es un nitroimidazol (N-bencil-2-nitro-1-imidazol acetamida), fue lanzado al mercado en 1971. Su modo de acción afecta la síntesis de proteínas y del ARN del parásito; 100 mg de la droga provocan la inhibición total de la producción de proteína en una hora (López Antuñano, 1997).

Dosificación según contextos clínicos

- ⊕ **Fase Aguda:** De 8-10mg/kg/día de nifurtimox o 5-7.5mg/kg/día de benznidazol. Los dos medicamentos se deben administrar en 2 ó 3 dosis diarias por 30 a 60 días.
- ⊕ **Fase Crónica Reciente:** 8mg/kg/día de nifurtimox ó 5mg/kg/día de benznidazol, administrándose en 2 o 3 dosis diarias por 30-60 días (Rodríguez Morales, 2005).
- ⊕ **Fase Crónica Tardía:** El nifurtimox se administra en dosis de 8-10 mg/kg/día durante 60 a 90 días, cada 8 horas. El benznidazol en dosis de 5 mg/kg/día durante 60 días, cada 8 o cada 12 horas (OPS/OMS, 1999).
- ⊕ **Infección Congénita:** nifurtimox, 10-15/mg/kg/día, o benznidazol 10 mg/kg/día. En caso de bajo peso, el tratamiento deberá iniciarse con la mitad de la dosis. Si a las 72

horas no se evidencia leucopenia o plaquetopenia, se debe pasar a la dosis definitiva por los próximos 60 días.

Las indicaciones para el tratamiento etiológico en la enfermedad de Chagas, propuestas por la OMS y con el consenso de la comunidad científica son:

- ⊕ Todos los agudos, inclusive los congénitos.
- ⊕ En quimioprofilaxia (accidentes, trasplantes).
- ⊕ En episodios de reactivación.
- ⊕ En crónicos de baja edad y crónicos recientes.
- ⊕ Para las formas clínicas iniciales (en carácter experimental).

Los efectos colaterales de los fármacos son raros durante la fase aguda o en niños, pero más frecuentes en adultos, pues afectan hasta el 40% de los pacientes chagásicos crónicos tratados (Galvao, 2003) (Tabla 4).

Efectos colaterales del uso de Benznidazol y nifurtimox en chagásicos adultos		
Síntoma/señal	Benznidazol	Nifurtimox
Anorexia	++	+++
Cefalea	+	++
Dermatitis	+++	+
Excit. Síquica	-	+++
Gastralgia	+	+++
Insomnia	+	++
Mareos	++	+++
Pérdida de peso	+	++
Polineuropatía	+	++
Depleción medular	+	-
Vómitos	++	+++

Tabla 4. Efectos secundarios adversos detectados en el tratamiento. En donde (+) indica efectos leves. (++) efectos moderados y (+++) efectos severos.

1.14 Valoración del tratamiento

Aunque la eficacia del tratamiento etiológico contra la infección por *T. cruzi* ya ha sido demostrada, las herramientas para su evaluación son todavía de implementación e interpretación complejas (OMS, 2005). Para evaluar la respuesta a la quimioterapia específica, es recomendable utilizar la combinación diagnóstica, clínica, serológica y parasitológica.

En los últimos años se ha demostrado en Argentina y otros países como Brasil, la utilización de nuevas herramientas (Ag recombinantes o Ag de tripomastigote, así como la reacción en cadena de la polimerasa PCR) para la evaluación de la efectividad del tratamiento. A la luz de los conocimientos actuales, es necesario considerar en la eficacia antiparasitaria del tratamiento, la ausencia del parásito y la disminución significativa de la concentración de Ac o hasta la negativización de la serología. Se debe tener en cuenta la limitación de los métodos parasitológicos como el método de Strout y el xenodiagnóstico en la evaluación del tratamiento en fase indeterminada y crónica debido a la baja sensibilidad y complejidad del xenodiagnóstico para su realización (Sosa Estani, 1999).

El tratamiento en la fase crónica requiere una vigilancia sistemática durante años, sobre todo en los casos tratados tardíamente o en forma incompleta. La vigilancia comprende: control del paciente en tratamiento: exámenes clínicos periódicos, parasitoscopías de sangre para verificar la erradicación de los tripanosomas circulantes, serología para conocer los niveles de anticuerpos y vigilancia de funcionamiento del corazón. El enfermo puede considerarse como curado si dos exámenes diagnósticos consecutivos con treinta días de intervalo, resultan negativos; con frecuencia, los cuadros agudos tratados a tiempo remiten pronto hacia la curación (PROY-NOM-032-SSA2-2000).

La experiencia indica que para llegar a una serología negativa, debe esperarse un tiempo proporcional al tiempo de infección. En los lactantes con transmisión congénita, se logra la negativización hasta en dos años. En la fase aguda, si se ha tratado durante los primeros 30 días del inicio de los síntomas, la serología se negativiza en 3 a 5 años. En la fase crónica reciente se logran esos resultados en 5 a 10 años y en aquellos tratados durante la fase crónica tardía, en general entre 20 y 30 años después (Luquetti, 2007).

En la actualidad, se está recomendando la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) como el estándar de oro para evaluar la eficacia pos-tratamiento, sin embargo esta prueba es cara, exige un laboratorio de alta tecnología con personal calificado, por ello no se usa de rutina (Galvao, 2003).

1.15 Prevención y control

En la enfermedad de Chagas la vigilancia epidemiológica debe contemplar la vigilancia vectorial y la vigilancia no vectorial:

La vigilancia vectorial es un conjunto de acciones que suministran información necesaria que permita la implementación de acciones para la eliminación de los vectores en la vivienda humana y sus anexos peridomiciliarios en forma permanente (OPS/OMS, 2003).

Eventos a vigilar:

- ⊕ Infestación (intra y peridomiciliaria)
- ⊕ Dispersión
- ⊕ Colonización
- ⊕ Infección natural
- ⊕ Se debe incluir la vigilancia con participación comunitaria

La vigilancia no vectorial se encarga de actividades regulares de salud, para la obtención de información específica y oportuna que oriente a efectivas acciones de intervención en los niveles primarios y secundarios de prevención, y para la supervisión y evaluación del programa.

Eventos a vigilar:

- ⊕ Control de sangre a transfundir
- ⊕ Detección de mujer embarazada y seguimiento al hijo de la mujer portadora de *T. cruzi*
- ⊕ Detección de niños infectados para tratamiento etiológico
- ⊕ Control de donantes y receptores de órganos
- ⊕ Farmacovigilancia de los medicamentos para tratamiento etiológico (debe incluir la vigilancia de las reacciones adversas a los medicamentos)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque la eficacia del tratamiento etiológico contra la infección por *T. cruzi* ya ha sido demostrada, las herramientas para su evaluación son todavía de implementación e interpretación complejas. Un tema importante que todavía presenta controversias es la definición de cura de pacientes que recibieron tratamiento etiológico. Hasta ahora, el criterio universalmente aceptado es el obtenido por la conversión negativa de la serología convencional. Sin embargo, las técnicas serológicas fueron diseñadas para el diagnóstico y no para evaluar la eficacia del tratamiento, ya que presentan diferentes respuestas según el antígeno o mezcla de antígenos empleados, y el diseño de prueba serológica a usar. Otro inconveniente son aquellos pacientes en quienes la enfermedad ha evolucionado por lo menos 20 años y la evidencia de conversión negativa sólo puede observarse muchos años más tarde. Por tal motivo es importante evaluar nuevas herramientas que puedan ser utilizadas como indicadores de cura después del tratamiento, en este caso se emplea la Inmunolectrotransferencia, ya que su utilidad en seguimiento de tratamiento es poco conocida.

3. OBJETIVOS

● General

Evaluar la cinética de anticuerpos IgG que reconocen proteínas en un rango de 65-200 kDa en individuos crónicos tempranos y tardíos post-tratamiento.

● Particulares

A) Evidenciar la tendencia de cambio en la respuesta de anticuerpos de la clase IgG mediante las técnicas serológicas convencionales (HAI, IFI, ELISA) en individuos post-tratamiento.

B) Evidenciar la tendencia de cambio de los anticuerpos de la clase IgG mediante la técnica de Inmunolectrotransferencia en individuos crónicos tempranos (CTe) y crónicos tardíos (CTa) post-tratamiento.

C) Examinar la avidéz de anticuerpos IgG con la técnica de Inmunolectrotransferencia en individuos crónicos tempranos (CTe) y crónicos tardíos (CTa).

D) Comparar la respuesta de anticuerpos IgG en individuos CTe y CTa post-tratamiento.

E) Identificar posibles marcadores para el seguimiento de tratamiento.

4. HIPOTESIS

La especificidad de los anticuerpos de la clase IgG, hacia los determinantes antigénicos de 65-200 kDa es diferente en individuos crónicos tempranos y crónicos tardíos post-tratamiento.

5. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

5.1 Tipo de estudio

Observacional, retrospectivo, longitudinal y comparativo.

5.2 Material Biológico

Se utilizó una cepa del banco de cepas del Laboratorio de Enfermedad de Chagas del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la Secretaría de Salud, la cual se aisló de un vector (*T. dimidiata*) en la localidad de La Laja en el estado de Veracruz, en junio del 2000. De esta cepa (epimastigotes) se obtuvo un extracto rico en proteínas el cual se utilizó como fuente de antígeno en la electroforesis y electrotransferencia para la producción de tiras de nitrocelulosa sensibilizadas.

5.3 Población

Constituida por 30 individuos mexicanos bajo tratamiento con Benznidazol a una dosis de 5 mg/kg, dos dosis diarias durante 30 días; de estos se colectaron 70 muestras de sangre entre el 2005 y el 2009 de las cuales se obtuvieron los sueros empleados en este estudio, los cuales se encuentran resguardados en el banco de sueros del Laboratorio de Enfermedad de Chagas del departamento de Parasitología del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la Secretaría de Salud, InDRE, SSa.

CASO	MUES	AÑO	EDO	EDAD	SEXO	CASO	MUES	AÑO	EDO	EDAD	SEXO	
1	1	2005	MOR	12	F	17	1	2008	DF	47	F	
	2	2006		47								
	3	2006		18		53	M	1	2008	MOR	53	
	4	2007				47						
	5	2008				47						
2	1	2007	MOR	31	M	19	1	2008	MOR	46	F	
	2	2007		47								
	3	2008		20		32	MEX	1	2008	DF	44	M
	4	2008				32						
	5	2009				32						
3	1	2007	YUC	48	F	21	1	2008	MEX	47	M	
	2	2007		48								
	3	2007		48								
4	1	2008	MEX	55	M	26	1	2005	MOR	6	M	
	2	2008		55								
	3	2008		55								
4	2009	10										
5	1	2007	MOR	52	M	63	1	2008	MOR	40	M	
	2	2008		40								
	3	2008		52								
6	1	2006	MOR	4	F	64	1	2008	MOR	34	M	
	2	2007		5								
7	1	2006	QAX	15	M	65	1	2007	MOR	47	F	
	2	2007		16								
	3	2007		16								
4	2009	49										
8	1	2007	MOR	22	M	66	1	2008	QRO	32	M	
	2	2008		22								
9	1	2005	MOR	35	M	67	1	2007	MOR	7	F	
	2	2007		37								
	3	2008		38								
4	2009	9										
10	1	2006	MOR	50	F	68	1	2005	PUE	6	F	
	2	2007		51								
	3	2007		51								
11	1	2007	YUC	52	M		2	2006		6		
	2	2007		52								
12	1	2007	MOR	23	F		3	2006		7		
	2	2008		24								
13	1	2007	MOR	19	F		4	2007		8		
	2	2008		20								
14	1	2007	MOR	30	F	5	2007	8				
	2	2008		30								
15	1	2007	MOR	58	M	6	2008	9				
	2	2008		59								
16	1	2008	MEX	50	F	7	2009	9				
	2	2008		50								
17	1	2005	MOR	8	M	8	2009	10				
	2	2008		11								
	3	2009		12								
	4	2009		13								

Tabla 5. Población estudiada, las muestras sombreadas son las disponibles en el banco de sueros y por lo tanto son las que se utilizaron en la prueba de Western Blot.

Los 30 casos que comprenden el universo de estudio (Tabla 5) se clasificaron en dos grupos de acuerdo a la edad en: Crónicos Tempranos (CTe) incluyendo a individuos menores de 18 años y Crónicos Tardíos (CTa) individuos mayores de 18 años. Este criterio de clasificación se realizó tomando en cuenta que los individuos menores de 18 años se encontraban en una etapa inicial de la infección y los mayores de 18 años el tiempo de infección era mayor o se encontraban en fase indeterminada detectados en el Banco de Sangre. Como testigos se utilizaron 40 sueros obtenidos a partir de muestras de sangre de pacientes que no recibieron tratamiento (20 de pacientes menores de 18 años y 20 mayores de 18 años).

5.4 Criterios

Criterio de Inclusión: Muestras de individuos tratados y que de estos, los que se encuentran en el banco del laboratorio contarán con las tres pruebas convencionales serológicas, además de que cumplieran los lineamientos establecidos en los procedimientos estándares del laboratorio referentes a su conservación.

Criterio de Exclusión: Aquellas muestras que no fueran de individuos tratados, que no contarán con la serología requerida, también aquellos que no cumplieron con los requerimientos establecidos por el laboratorio referente a su conservación.

Criterio de Eliminación: Aquellas muestras que presentan contaminación, aquellos en donde solo se contara con una muestra de suero y aquellas muestras de individuos que presentan algún otro padecimiento que pudiera interferir en los resultados (parasitosis como leishmaniasis o toxoplasmosis y cardiopatías originadas por otra patología).

5.5 Variables

- ★ Tratamiento etiológico
- ★ Respuesta de anticuerpos IgG al tratamiento
- ★ Grupo de edad
- ★ Tiempo de recolección entre cada una de las muestras.

5.6 Materiales

Equipo

- ★ Agitador: Rotator-MODEL G2
- ★ Balanza analítica: Precisa 180^a
- ★ Centrifuga: JOVAN
- ★ Charolas para Western Blot
- ★ Criotubos de 1mL: Eppendorf
- ★ Embudo de plástico
- ★ Equipo de electroforesis: GIBCO BRL MINI-V810
- ★ Equipo de electrotransferencia: BIO-RAD Mini-Protean 3

-
- ★ Espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 21D
 - ★ Filtros pirinola de 0.45µm: Millipore
 - ★ Fuente de Poder: BIO-RAD MODEL 200/2.0 Power Supply
 - ★ Matraz volumétrico de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL
 - ★ Micropipetas de volumen variable de 0.5-10, 5-20, 50-200 y 1000 µL
 - ★ Papel filtro Whatman poro mediano
 - ★ Papel de Nitrocelulosa: BIO-RAD 0.2µm de poro
 - ★ Pipeta serológica graduada de 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mL
 - ★ Potenciómetro: THERMO Orion 3 Star
 - ★ Puntas para cargar geles: SORENSON 5-200µL
 - ★ Termoagitador: Felisa
 - ★ Tubos de ensaye 13x100
 - ★ Vaso de precipitado de 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 mL

Reactivos

- ★ Ácido acético glacial (Productos Químicos Monterrey, Lot. G13214)
- ★ Ácido clorhídrico 37% (MERCK, Lot. 821)
- ★ Ácido tricloroacético (SIGMA, Lot. 113H02551)
- ★ Acrilamida (BIO-RAD, Cat. 161-0107)
- ★ Agua ultrapura (Milli-Q)
- ★ Albúmina Sérica Bovina V (ROCHE, Lot. 70153825)
- ★ AP Conjugat Substrate Kit (BIO-RAD, Lot. 1706432)
- ★ Aprotinina (ROCHE, Lot. 70144531)
- ★ Azul de Bromofenol (SIGMA, Lot. 34H35181)
- ★ Azul de Coomassie (SIGMA, Cat. B-0149)
- ★ Bis-acrilamida (BIO-RAD, Lot. 1610201)
- ★ Carbón Activado (SIGMA, Cat. RA20115)
- ★ Carbonato de Sodio Na₂CO₃ (MERCK, Lot. 407236R)
- ★ Cloruro de Sodio NaCl (Omnichem, Lot. 15304078)
- ★ Conjugado Anti-IgG humana-biotina (ZYMED, Lot. 01062583)
- ★ DDT (Ditiotretiol) (APPLICHEM, Lot. 7KD05835)
- ★ EDTA (BIO-RAD, Lot. 1610728)
- ★ Etanol (REPROQUIFIN, Lot. 4010-C)

-
- ★ Estreptavidina-fosfatasa alcalina (JACKSON INMUNO RESEARCH, Lot. 59994)
 - ★ Fluoruro de fenilmetilsulfonilo PMSF (SIGMA, Lot. 066K0720)
 - ★ Fosfato de sodio monobásico monohidratado (MERCCK, Lot. A957546)
 - ★ Fosfato de sodio dibásico heptahidratado (J. T. BAKER, Lot. X14C20)
 - ★ Glicerol (SIGMA, Lot. 056K0079)
 - ★ Glicina (BIO-RAD, Lot. 1610718)
 - ★ Hidróxido de Sodio (J. T. BAKER, Lot. 3722-20)
 - ★ Marcadores de peso molecular 10-250 kDa (BIO-RAD, Cat. 161-0363)
 - ★ Metanol (J. T. BAKER, Lot. A48C62)
 - ★ Persulfato de Amonio (SIGMA, Lot. 054K0618)
 - ★ Reactivo de Folin (SIGMA, Cat. F9252)
 - ★ Regulador de Muestra (Laemmli simple Buffer) (BIO-RAD, Lot. 1610337)
 - ★ Rojo de Ponceau S (SIGMA, Lot. 110H3737)
 - ★ SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) (SIGMA, Lot. 14H0696)
 - ★ Sulfato de cobre (SIGMA, Lot. 1025H5)
 - ★ Tartrato de sodio (SIGMA, Lot. 2458H54)
 - ★ TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilén diamina) (BIO-RAD, Lot. 210003190)
 - ★ Tioglicolato de sodio (BIOXON, Lot. L228490M)
 - ★ Tris-base (ROCHE, Lot. 93401120)
 - ★ Tween 20 (BIO-RAD, Lot. 201113162)
 - ★ Urea (GIBCO BRL, Lot. 1017061)
 - ★ Yodacetamida (SIGMA, Lot. 75H5058)

5.7 Métodos

5.7.1 Obtención de un extracto rico en proteínas a partir de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

1. A un gramo de parásitos (masa húmeda) se le agregó 10 mL de tris base 100 mM, NaCl 0.15 M pH 7.5 - tioglicolato de sodio 1/20 000 (ver anexo 1).
2. Se resuspendieron y se dejaron durante 1 hora a 4°C.
3. Se centrifugaron durante 15 minutos a 3500 rpm a 4°C.

4. Se filtró el sobrenadante por membrana con 0.45 μm de poro.
5. Se determino la concentración de proteínas.
6. Se agregó 5 μL de PI-A, PI-B y aprotinina (ver anexo 2) por cada mL de extracto del parásito.
7. Se fraccionó y se almacenó a -70°C .

5.7.2 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry

1. Se construyó una curva estándar de 5 a 200 $\mu\text{g/mL}$ de proteína. La solución de proteínas es albúmina sérica bovina a una concentración de 1 mg/mL .
2. Se prepararon las diluciones de la muestra problema en agua y se agregaron los reactivos A y B (ver anexo 3) como indica la siguiente tabla:

Curva Estándar									
Tiempo	0 μg	5 μg	10 μg	20 μg	40 μg	80 μg	100 μg	200 μg	Vol.
-	1000	995	990	980	960	920	900	800	Agua μL
-	0	5	10	20	40	80	100	200	BSA μL
10 min	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	Reac A μL
30 min	300	300	300	300	300	300	300	300	Reac B μL

3. Se leyó a 500 nm de longitud de onda. Con el tubo 1 se calibró a cero de absorbancia (100% de transmitancia) y se leyeron los tubos de la curva estándar y muestra (s) problema.

Para determinar la concentración de proteínas, se calculan los estimadores de los parámetros m = pendiente y b = ordenada al origen de la relación lineal $y = mx+b$, se despeja x , se sustituye los valores m , b e y (absorbancia muestra problema) y se realizan las operaciones indicadas.

La concentración de proteínas obtenida corresponde a la dilución ensayada de la muestra problema, éste valor tiene que ser multiplicado por el factor de dilución para conocer la concentración de la solución sin diluir.

5.7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras (PAGE-SDS 10%, glicerol 10%)

1. Se llevaron las soluciones a temperatura ambiente, se recomienda preparar nuevas por lo menos cada mes para evitar la formación de componentes indeseables en la mezcla de monómeros (ver anexo 4).
2. Se lavaron los vidrios de las cámaras de electroforesis con detergente líquido neutro, y se secaron al aire.
3. Se armó el equipo de electroforesis.
4. Se verificó que no existiera fuga, agregando agua entre los vidrios, se eliminó ésta y se secaron los compartimentos.
5. Se preparó el persulfato de amonio justo antes de usarse.
6. se agregó en un matraz limpio cada reactivo para formar el gel separador y se vació la mezcla entre los vidrios hasta el nivel deseado.
7. Se agregó lentamente unas gotas de agua destilada, esto permitió la formación regular del límite superior del gel separador. El tiempo de polimerizar de un gel de 7x10 cm es de aproximadamente 20 minutos.
8. Se secó con papel filtro el exceso de agua.
9. La cantidad proteica del extracto o mezcla por separar electroforeticamente depende del tamaño y espesor del gel, del número de carriles y de la tinción a usar:
10. En un vial se depositó la cantidad correspondiente del extracto y se agregó un volumen de regulador de muestra 2X, se incubó en baño de agua a 100° C durante 5 minutos.

11. Para evitar la formación de complejos proteína-proteína se agregó 5 μ L de yodoacetamida al 10%.

12. Se agregó en un matraz limpio cada reactivo para formar el gel concentrador mas 10 μ L de azul de bromofenol al 0.5% p/v, se colocó la mezcla hasta el borde superior de los vidrios, se colocó el peine y la polimerización ocurrió entre 10 a 15 minutos.

13. Se preparó regulador de corrimiento.

14. Al término de la polimerización, se retiraron los peines.

15. Se agregó el regulador de corrimiento. Para los equipos de electroforesis de dos compartimentos, el regulador del interior debe ser nuevo en cada corrida y el exterior puede usarse 3 ó 4 veces, en los equipos de un solo compartimiento el regulador puede usarse 3 ó 4 veces.

16. Se colocaron cuidadosamente los extractos en los carriles deseados, si el volumen de la mezcla al diluirla con el regulador de muestra era más que la capacidad del pozo, se colocaba el máximo volumen y después de un tiempo de corrimiento se agregaba el resto de la muestra.

17. Se colocaron los marcadores de peso molecular siguiendo las recomendaciones del fabricante.

18. Se conectaron los cables a la fuente de poder y se ajustó el voltaje a 100 volts en el gel concentrador y a 150 volts en el gel separador.

19. Al termino se procedió a teñir (Azul de Coomassie) o bien se transfirió a papel de nitrocelulosa.

5.7.4 Tinción con Azul de Coomassie

1. Se colocó en un recipiente limpio el gel y la cantidad necesaria de colorante de trabajo de azul de Coomassie (ver anexo 5) e incubó 60 minutos a 37°C, o toda la noche a temperatura ambiente. Al término se recuperó el colorante.

2. Se agregó la solución decolorante y se cambió las veces necesarias hasta observar la nitidez de las bandas.

NOTA: El colorante de trabajo puede ser usado hasta 5 veces al igual que la solución decolorante que se adsorbe con carbón activado para eliminar el colorante.

5.7.5 Electrotransferencia

1. En un recipiente se colocó la cantidad suficiente de regulador de transferencia, pH 8.3, (ver anexo 6) para cubrir las esponjas y papel filtro.

2. Se retiró cuidadosamente el gel de los vidrios y se colocó en un recipiente que contenía regulador de transferencia. Se estabilizaron por 10 a 15 minutos a temperatura ambiente.

3. Se cortó el papel de nitrocelulosa al tamaño del gel y se trató, primero con agua (5 minutos) y luego con regulador de transferencia (5 minutos)

4. Se empalmó el papel de nitrocelulosa y el gel y se hicieron marcas con lápiz para reconocer los límites y orientación del gel, fue necesario revisar entre ellos que no existieran burbujas, ya que provocarían una mala transferencia de las proteínas al papel.

5. Se ensambló el cartucho de transferencia formado por la esponja, papel filtro, papel de nitrocelulosa, el gel, papel filtro y esponja.

6. El cartucho de transferencia se incorporó al tanque de la cámara de transferencia lleno con regulador de transferencia.

7. Se conectaron los cables a la fuente de poder, la transferencia para un Gel 7x10 cm se realizó durante 1 hora a 100 volts. Se recomienda trabajar a 4°C para disminuir el calor generado por el campo eléctrico.

8. Se verificó la eficiencia de la transferencia mediante la tinción con rojo de Ponceau S, al incubar la membrana en una solución de colorante al 0.02%. Si hay regularidad en la tinción indica que la transferencia no fue influida por burbujas. Los marcadores de peso molecular deben ser remarcados con lápiz. Lavar con agua destilada hasta eliminar el colorante.

5.7.6 Inmunodetección

1. Una vez transcurrida la transferencia, el papel de nitrocelulosa se colocó en un recipiente y se lavó una vez con PBS-Tween 20 0.1%, durante 5 minutos.

2. La membrana se bloqueó con PBS-BSA 1%-Tween 20 0.1% 1 hora a 37°C.

3. Se cortaron tiras de papel de 3 mm según el número de sueros a evaluar. Las tiras con los marcadores de peso molecular se conservaron para la evaluación.

4. Se lavaron 1 vez (5 min) con PBS-Tween 20 0.1%

5. Se agregó 1 mL (1/500) de la dilución del suero problema o suero de referencia a cada tira. La dilución se realizó en PBS-BSA 1%-Tween 20 0.1% y se incubó 1:30 horas a temperatura ambiente, en agitación.

6. Se lavó 1 vez con una solución de Urea 6M durante 30 minutos, únicamente cuando se realizó la determinación de la avidéz de los anticuerpos.

7. Se lavaron 4 veces con PBS-Tween 20 0.1%, un lavado rápido y 3 de 5 minutos cada uno.

8. Se adicionó 1 mL del conjugado Anti IgG humana-Biotina, 1:4000 por tira diluido en PBS-BSA 1%-Tween 20 0.1%, al suero problema o control y se incubó 1 hora a temperatura ambiente, en agitación.

9. Se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20 0.1%, un lavado rápido y 4 de 5 minutos cada uno.

10. Se adicionaron 1 mL de Estreptavidina-Fosfatasa Alcalina (Ex-PA), diluida 1:2000 en PBS-BSA 1%-Tween 20 0.1% e incubar 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Nota: El conjugado Anti IgG humana-Biotina como la Estreptavidina-Fosfatasa Alcalina deben ser titulados en cada cambio de lote de reactivo, con base recomendación del fabricante.

11. Se lavaron 3 veces (5 minutos c/u) con PBS-Tween-20 0.1% y 2 con PBS.

12. Se agregaron 10 mL de la solución de sustrato fosfatasa alcalina, la cual se preparó al momento de usarse, y se incubaron 20-30 minutos. Una vez observadas las bandas se agregó solución de paro, se lavaron con suficiente agua destilada y se secaron al aire para su análisis.

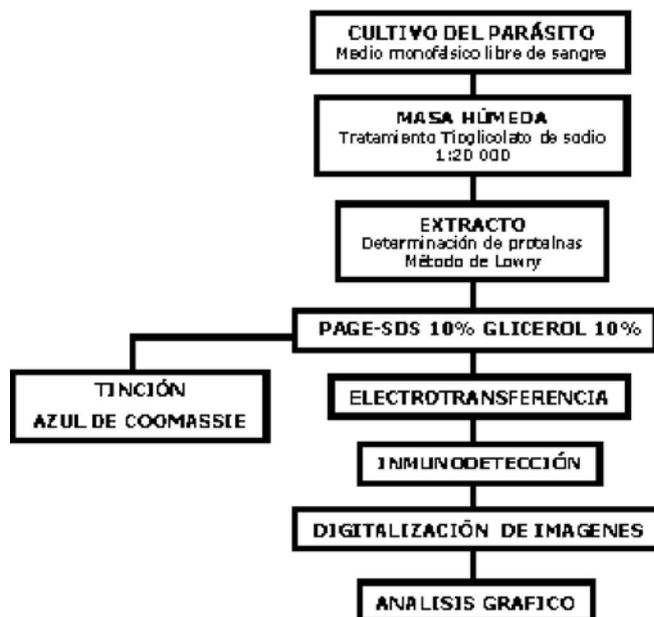


Fig. 10 Diagrama de flujo que muestra la metodología utilizada.

5.8 Análisis estadístico

Los patrones de inmunoreconocimiento se fotodocumentaron en un escáner hp 1200c, el formato de las imágenes se cambió a 8 bits utilizando el programa ImagenJ v.1.4.1.0. Con el programa EagleSight v.3.2 se determinó el peso molecular (PM) en kDa a las primeras 5 bandas del patrón electroforético. Con el programa RFLPscan plus versión 3.0 para Windows se determinó la Densidad Óptica Integrada (DOI) de cada una de las bandas de interés y se creó una base de datos en Microsoft® Excel 2002.

La base de datos final contenía los resultados de serología convencional a razón de título de anticuerpos entre el valor de corte, y los de DOI de cada muestra, organizada por caso. Esta base se procesó en el programa Minitab® 15 v.1.0.0., en donde se estratificaron los datos de acuerdo al grupo de edad y se elaboraron gráficos para evidenciar la diferencia entre CTe y CTa.

Posteriormente utilizando el programa SPSS se realizó un análisis de varianza para los datos obtenidos en las dos metodologías empleadas. Trabajando únicamente con los resultados de DOI con el WB estándar se empleó el modelo de regresión lineal, calculando los límites superior e inferior a un 95% de confianza, así como el ajuste. Con este programa también se obtuvieron tablas mostrando el modelo de la regresión y el análisis ANOVA y con Microsoft® Excel 2002 se elaboraron gráficos empleando los estimadores anteriores.

6. RESULTADOS

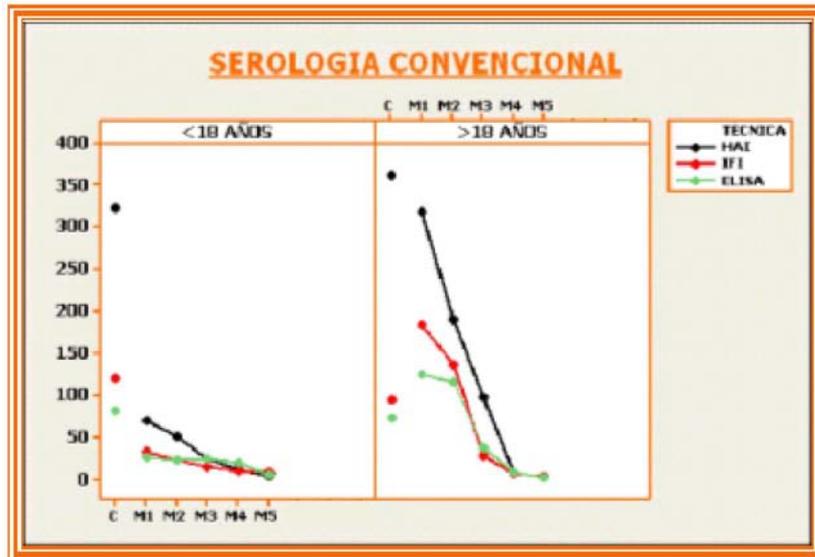
Todas las muestras que comprenden este estudio fueron procesadas con serología convencional en el Laboratorio de Enfermedad de Chagas del InDRE con tres pruebas de elaboración propia: Hemaglutinación Indirecta (HAI), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y un Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) realizadas en tiempos diferentes. Cuyos resultados se presentan en la tabla 6.

CASO	HAI					IFI					ELISA				
	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
1	1:32	1:16	1:32	1:32	1:16	1:128	1:128	---	1:64	1:32	1.553	0.834	1.991	1.709	0.753
2	1:128	1:32	8	1:32	1:16	1:128	1:64	1:64	1:32	1:128	0.874	0.721	0.624	1.132	0.677
3	1:512	1:512	1:512	---	---	1:128	1:64	1:128	---	---	2.173	1.806	2.894	---	---
4	1:16	0	0	---	---	0	1:128	1:64	---	---	0.375	0.762	0.546	---	---
5	0	1:64	1:32	---	---	0	---	1:64	---	---	0.734	0.495	0.601	---	---
6	1:128	0	---	---	---	1:64	1:32	---	---	---	0.507	0.391	---	---	---
7	1:64	1:32	1:64	---	---	1:128	0	1:32	---	---	1.626	1.563	1.754	---	---
8	1:128	1:128	---	---	---	1:128	1:32	---	---	---	1.321	1.040	---	---	---
9	0	0	0	---	---	1:128	1:32	1:64	---	---	1.061	0.435	0.323	---	---
10	1:32	0	0	---	---	---	0	0	---	---	0.822	0.097	0.164	---	---
11	1:64	0	---	---	---	1:128	1:64	---	---	---	1.538	1.249	---	---	---
12	0	0	---	---	---	0	0	---	---	---	0.090	0.127	---	---	---
13	1:32	1:16	---	---	---	1:64	0	---	---	---	1.542	0.730	---	---	---
14	1:8	0	---	---	---	1:128	1:256	---	---	---	0.964	1.007	---	---	---
15	1:16	1:16	---	---	---	1:64	1:32	---	---	---	1.186	0.885	---	---	---
16	1:128	1:32	--	---	---	1:128	1:64	---	---	---	1.022	1.279	---	---	---
17	1:16	1:16	---	---	---	1:32	1:128	---	---	---	0.655	0.722	---	---	---
18	1:16	1:16	---	---	---	1:128	1:64	---	---	---	1.027	0.939	---	---	---
19	1:16	1:16	---	---	---	1:128	1:128	---	---	---	1.122	1.390	---	---	---
20	1:128	1:32	---	---	---	1:128	1:512	---	---	---	2.426	1.350	---	---	---
21	1:8	0	---	---	---	1:64	1:128	---	---	---	0.506	0.706	---	---	---
22	1:8	1:8	---	---	---	1:64	1:128	---	---	---	0.665	0.335	---	---	---
26	1:128	1:64	1:16	1:8	---	1:64	1:64	1:64	1:64	---	1.022	0.760	0.603	0.511	---
63	1:32	1:32	---	---	---	1:128	1:256	---	---	---	1.165	0.800	---	---	---
64	1:128	1:128	---	---	---	1:512	1:1024	---	---	---	2.100	1.552	---	---	---
65	1:64	1:64	1:32	1:16	---	1:256	1:256	1:128	1:128	---	1.588	1.720	1.039	1.009	---
66	1:16	1:16	---	---	---	1:128	1:128	---	---	---	1.458	1.222	---	---	---
67	1:64	1:32	---	1:32	---	1:512	---	1:128	1:128	---	1.559	1.308	1.143	0.658	---
68	1:128	1:256	1:64	0	1:16	1:128	1:512	1:256	---	1:256	0.714	1.256	1.335	1.554	0.861
69	1:16	1:8	1:16	1:16	---	---	---	0	1:64	---	1.008	0.709	0.424	1.508	---

Tabla 6. Resultados de serología convencional de la población en estudio. En donde (---) indica las muestras no disponibles para este estudio.

Los resultados de las pruebas de HAI e IFI se expresan como título final y 0 equivale a un resultado negativo; en ELISA los resultados se expresan en valores de absorbancia, los que son menores de 0.30_{490nm} son negativos, ya que este valor corresponde al valor de corte de la prueba. Los espacios en donde no hay valores, corresponden a las muestras no disponibles en el banco de sueros del laboratorio, al momento de realizar el análisis.

Con los datos de la tabla anterior se calculó la razón título ó absorbancia / valor de corte, esto con la finalidad de que los datos pudieran ser comparables; el valor de corte de la prueba de HAI es 1:8, el de IFI es 1:32 y el de ELISA es 0.30, estos valores son los que se utilizaron para el análisis, con estos datos se elaboró un gráfico teniendo en el eje de las abscisas el número de muestra y en el eje de las ordenadas la razón título ó absorbancia; se estratificaron en CTe (<18 años) y CTa (>18 años) para hacer la comparación del tratamiento etiológico, se incluyen testigos sin tratamiento (C). Gráfica 1

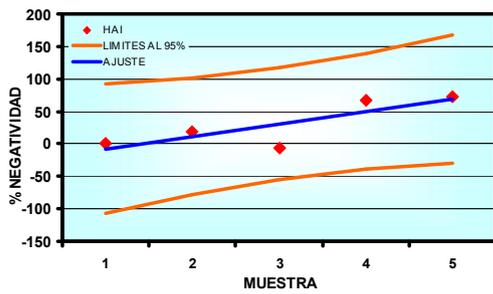


Gráfica 1. Resultados de serología convencional, en donde se observa la marcada diferencia en los niveles de anticuerpos en los grupos CTe y CTa.

La gráfica 1 muestra una diferencia evidente entre CTe y CTa, siendo la respuesta de anticuerpos más baja en CTe, en ambos grupos se observa tendencias hacia la negatividad en las tres técnicas empleadas conforme avanza el tiempo. Consistente con lo observado en grupos de expertos internacionales. Los valores del grupo control, en CTe y CTa, muestran un patrón semejante de respuesta.

Con el modelo de regresión lineal se efectuó un análisis exploratorio de la cinética de anticuerpos en la serología convencional a través del tiempo, empleando datos generales y realizando una estratificación en CTe y CTa (Tabla 7, 8 y 9).

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS TÉCNICAS SEROLÓGICAS

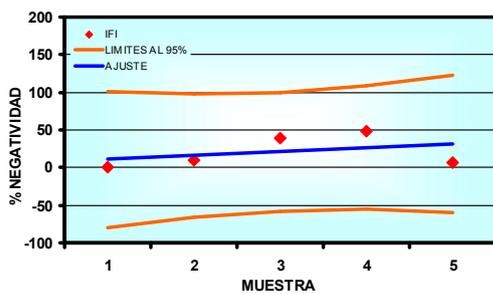


HAI Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.817	0.668	$y = -26.634 + 19.130x$	3.5 años (M7)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	3659.569	1	3659.569	6.029	0.091
Residual	1821.023	3	607.008		
Total	5480.592	4			

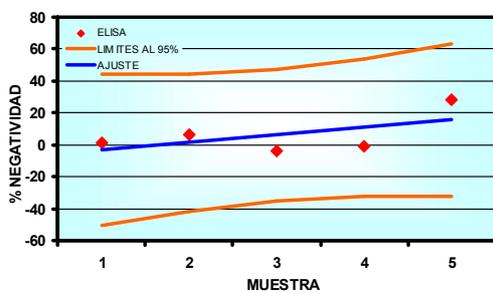


IFI Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.380	0.145	$y = 5.779 + 5.085x$	9.5 años (M19)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	258.572	1	258.572	0.507	0.528
Residual	1528.856	3	509.619		
Total	1787.429	4			



ELISA Resumen del modelo

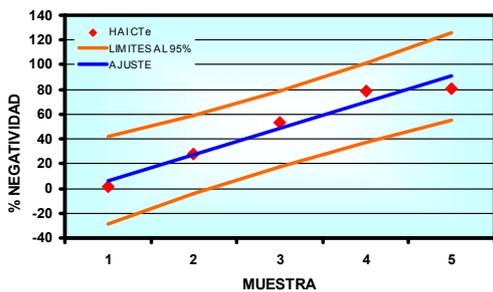
R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.584	0.342	$y = -7.813 + 4.673x$	11.5 años (M23)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	218.369	1	218.369	1.556	0.301
Residual	421.039	3	140.346		
Total	639.408	4			

Tabla 7. Análisis de serología convencional empleando datos generales.

CRONICOS TEMPRANOS

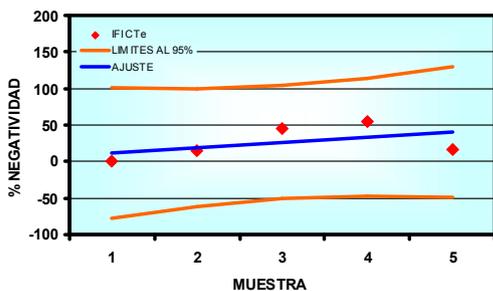


HAI Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.975	0.951	$y = -14.825 + 21.085x$	2.5 años (M5)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	4445.772	1	4445.772	57.656	0.005
Residual	231.326	3	77.109		
Total	4677.098	4			

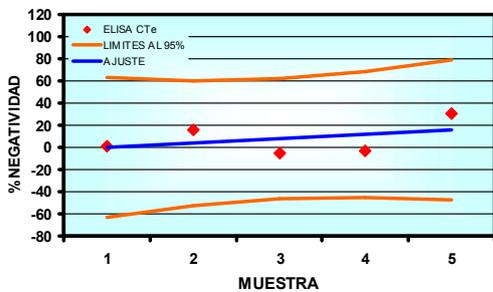


IFI Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.502	0.252	$y = 5.062 + 7.060x$	6.5 años (M13)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	498.436	1	498.436	1.008	0.389
Residual	1483.153	3	494.384		
Total	1981.589	4			



ELISA Resumen del modelo

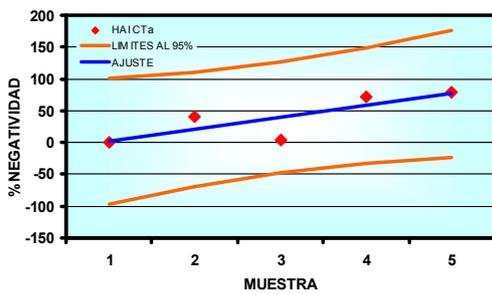
R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.421	0.178	$y = -4.161 + 3.979x$	13 años (M26)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	158.324	1	158.324	0.648	0.480
Residual	732.950	3	244.317		
Total	891.274	4			

Tabla 8. Análisis de serología convencional para el grupo CTe.

CRONICOS TARDIOS

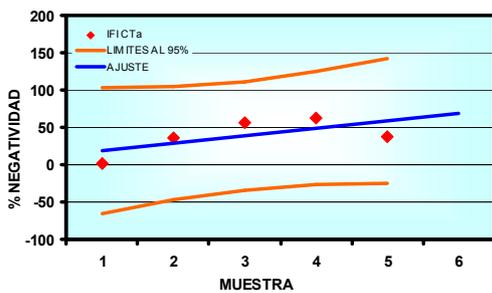


HAI Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.809	0.654	$y = -16.553 + 18.671x$	3 años (M6)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	3486.062	1	3486.062	5.667	0.098
Residual	1845.414	3	615.138		
Total	5331.477	4			

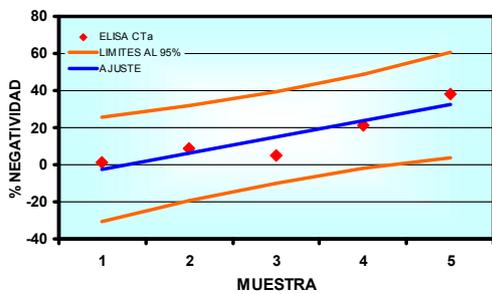


IFI Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.661	0.436	$y = 8.552 + 10.050x$	4.5 años (M9)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	1010.025	1	1010.025	2.322	0.225
Residual	1304.719	3	434.906		
Total	2314.744	4			



ELISA Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.914	0.835	$y = -11.212 + 8.682x$	6.5 años (M12)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	753.771	1	753.771	15.207	0.030
Residual	148.699	3	49.566		
Total	902.470	4			

Tabla 9. Análisis de serología convencional para el grupo CTa.

TIEMPO EN ALCANZAR EL 100% DE NEGATIVIDAD			
TECNICA	GENERAL	CTe	CTa
HAI	3.5 años (M7)	2.5 años (M5)	3 años (M6)
IFI	9.5 años (M19)	6.5 años (M13)	4.5 años (M9)
ELISA	11.5 años (M23)	13 años (M26)	6.5 años (M12)

Tabla 10. Resumen de los valores de predicción al 100% de negatividad. M= Muestra.

Los resultados de serología convencional para dar seguimiento a la efectividad de tratamiento en individuos chagásicos son consistentes con lo reportado. Es necesario evaluar nuevas herramientas como indicadores de cura post-tratamiento a recomendación de expertos internacionales en los últimos años (OMS, 2005). La efectividad de la Inmunolectrotransferencia o Western Blot es poco conocida en la evaluación de seguimiento de tratamiento etiológico, nosotros evaluamos la densidad óptica integrada (DOI) de la respuesta de anticuerpos frente a moléculas de 190, 143, 110, 75 y 69 kDa.

La inmunodetección se realizó en condición estándar (Pastén Sánchez, 2003) y con Urea 6M (Singh Redhu, 2006 y Mancipar, 2001). El perfil de reactividad de cada una de las muestras estudiadas se presenta en las figuras 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19.

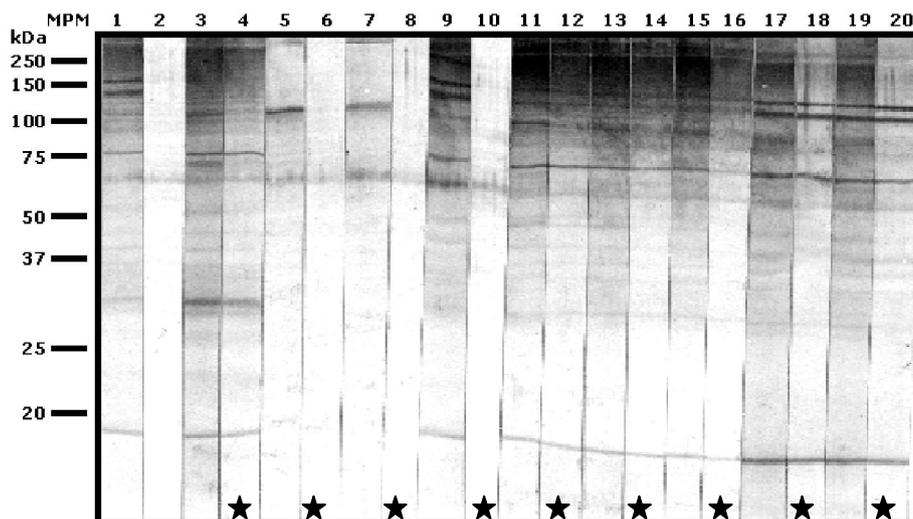


Fig. 11 Western Blot, carril **1)** T+, **2)** T-, **3 y 4)** C8M2, **5 y 6)** C9M1, **7 y 8)** C9M2, **9)** C+, **10)** C-, **11 y 12)** C1M1, **13 y 14)** C1M2, **15 y 16)** C1M3, **17 y 18)** C3M1, **19 y 20)** C3M2. T+: Testigo positivo, T-: Testigo negativo, C#M#: C es caso, M es muestra y # número que le corresponde. Las marcadas con ★ fueron tratadas con Urea 6M.

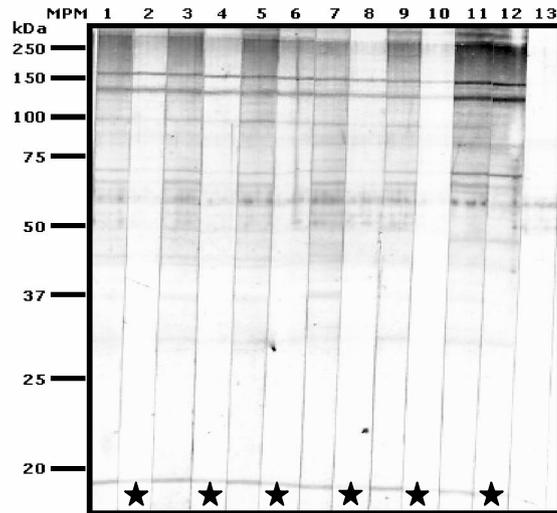


Fig. 12 Western Blot, carril **1 y 2)** C2M1, **3 y 4)** C2M2, **5 y 6)** C2M3, **7 y 8)** C2M4, **9 y 10)** C2M5, **11 y 12)** T+, **13)** T-. T+: Testigo positivo, T-: Testigo negativo, C#M#: C es caso, M es muestra y # número que le corresponde. Las marcadas con ★ fueron tratadas con Urea 6M.

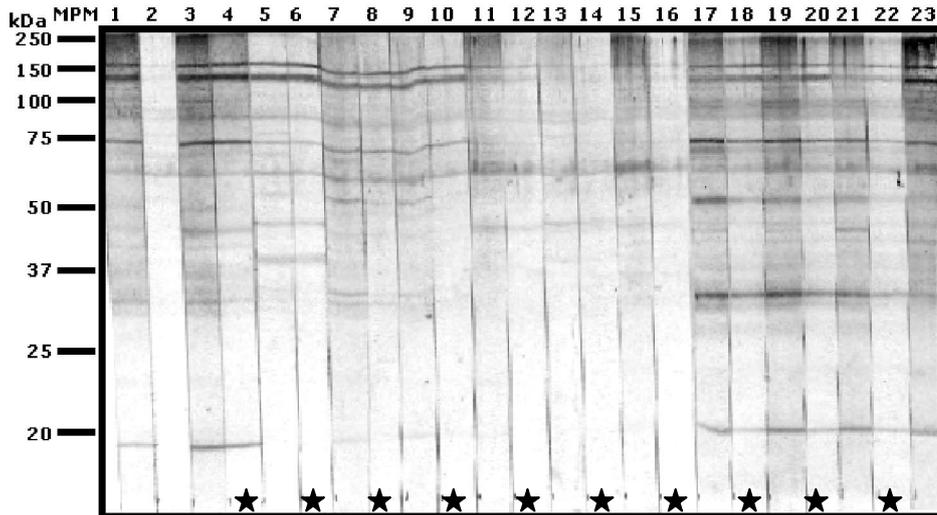


Fig. 13 Western Blot, carril **1)** T+, **2)** T-, **3 y 4)** C3M3, **5 y 6)** C4M1, **7 y 8)** C4M2, **9 y 10)** C4M3, **11 y 12)** C26M1, **13 y 14)** C26M2, **15 y 16)** C26M3, **17 y 18)** C65M1, **19 y 20)** C65M2, **21 y 22)** C65M3, **23)** T+. T+: Testigo positivo, T-: Testigo negativo, C#M#: C es caso, M es muestra y # número que le corresponde. Las marcadas con ★ fueron tratadas con Urea 6M.

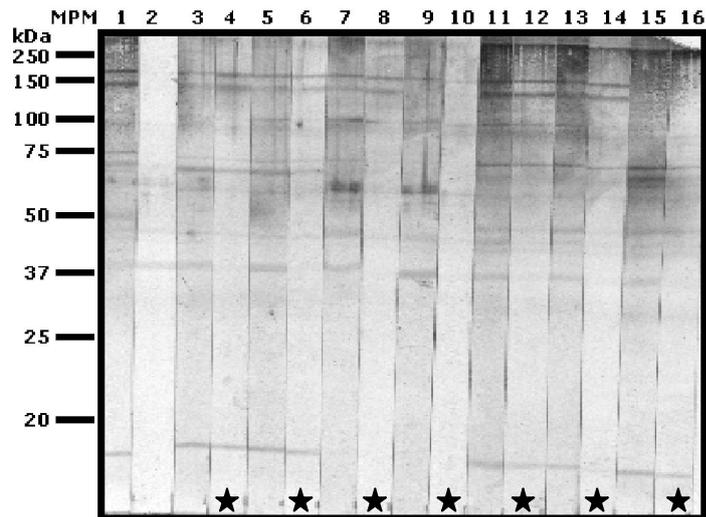


Fig. 14 Western Blot, carril 1) T+, 2) T-, 3 y 4) C5M1, 5 y 6) C5M2, 7 y 8) C6M1, 9 y 10) C6M2, 11 y 12) C7M1, 13 y 14) C7M2, 15 y 16) C8M1. T+: Testigo positivo, T-: Testigo negativo, C#M#: C es caso, M es muestra y # número que le corresponde. Las marcadas con ★ fueron tratadas con Urea 6M.

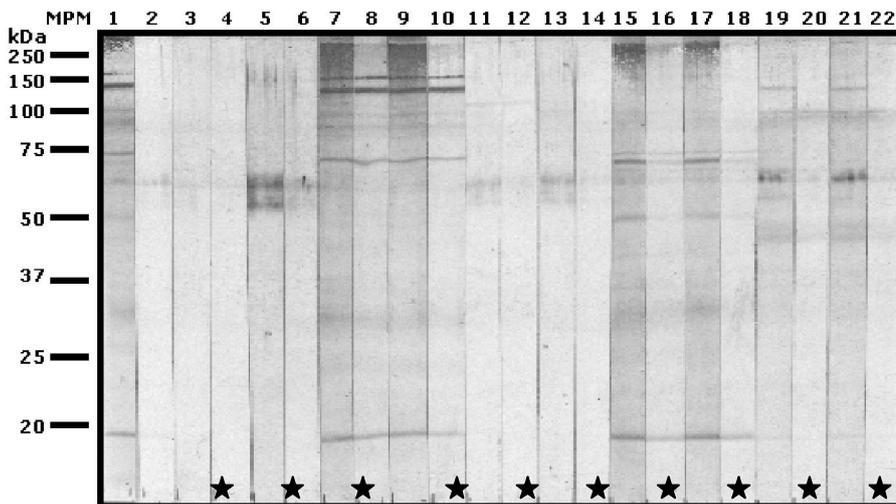


Fig. 15 Western Blot, carril 1) T+, 2) T-, 3 y 4) C10M1, 5 y 6) C10M2, 7 y 8) C11M1, 9 y 10) C11M2, 11 y 12) C12M1, 13 y 14) C12M2, 15 y 16) C13M1, 17 y 18) C13M2, 19 y 20) C14M1, 21 y 22) C14M2. T+: Testigo positivo, T-: Testigo negativo, C#M#: C es caso, M es muestra y # número que le corresponde. Las marcadas con ★ fueron tratadas con Urea 6M.

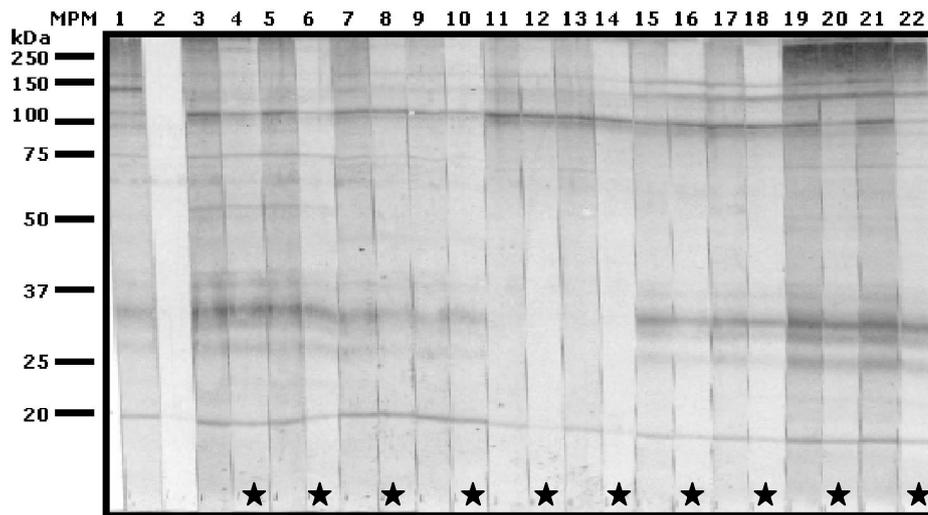


Fig. 16 Western Blot, carril 1) T+, 2) T-, 3 y 4) C15M1, 5 y 6) C15M2, 7 y 8) C16M1, 9 y 10) C16M2, 11 y 12) C17M1, 13 y 14) C17M2, 15 y 16) C18M1, 17 y 18) C18M2, 19 y 20) C19M1, 21 y 22) C19M2. T+: Testigo positivo, T-: Testigo negativo, C#M#: C es caso, M es muestra y # número que le corresponde. Las marcadas con ★ fueron tratadas con Urea

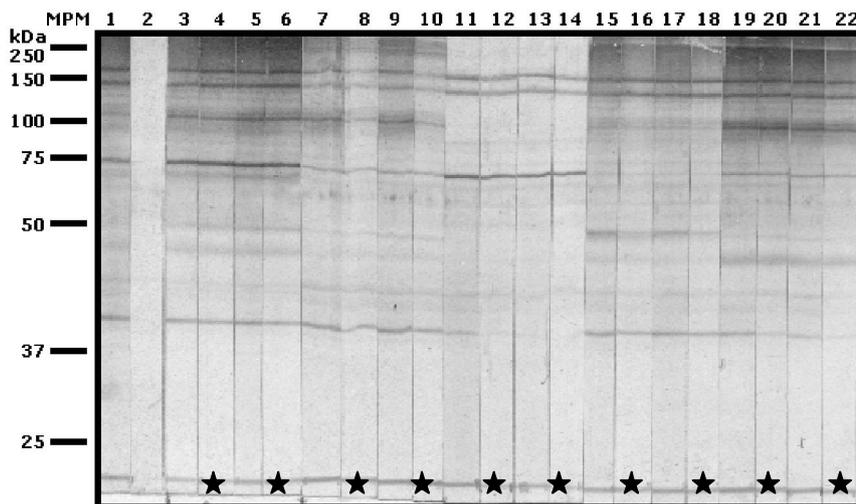


Fig. 17 Western Blot, carril 1) T+, 2) T-, 3 y 4) C20M1, 5 y 6) C20M2, 7 y 8) C21M1, 9 y 10) C21M2, 11 y 12) C22M1, 13 y 14) C22M2, 15 y 16) C63M1, 17 y 18) C63M2, 19 y 20) C64M1, 21 y 22) C64M2. T+: Testigo positivo, T-: Testigo negativo, C#M#: C es caso, M es muestra y # número que le corresponde. Las marcadas con ★ fueron tratadas con Urea 6M.

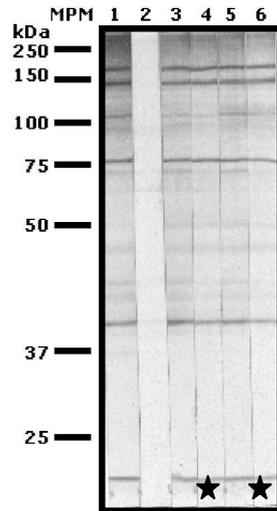


Fig. 18 Western Blot, carril **1)** T+, **2)** T-, **3 y 4)** C66M1, **5 y 6)** C66M2. T+: Testigo positivo, T-: Testigo negativo, C#M#: C es caso, M es muestra y # número que le corresponde. Las marcadas con ★ fueron tratadas con Urea 6M.

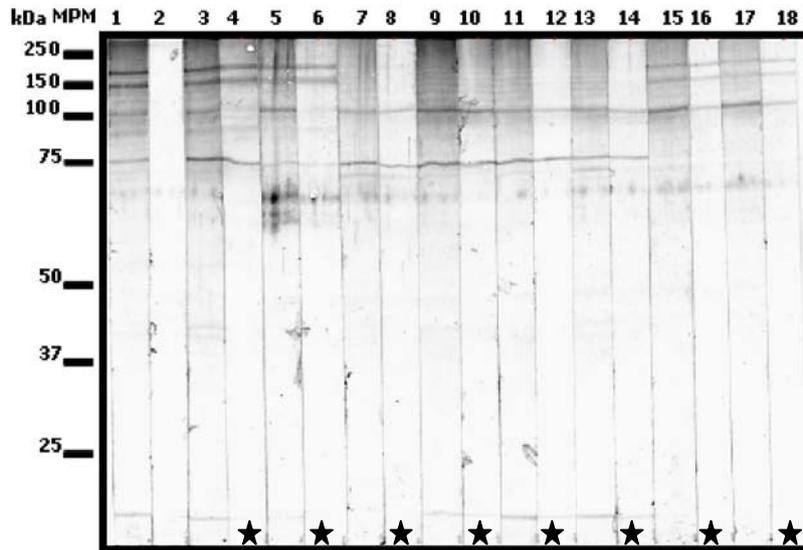


Fig. 19 Western Blot, carril **1)** T+, **2)** T-, **3 y 4)** C67M1, **5 y 6)** C67M5, **7 y 8)** C68M3, **9 y 10)** C68M5, **11 y 12)** C68M7, **13 y 14)** C68M8, **15 y 16)** C69M3, **17 y 18)** C69M4. T+: Testigo positivo, T-: Testigo negativo, C#M#: C es caso, M es muestra y # número que le corresponde. Las marcadas con ★ fueron tratadas con Urea 6M.

Los perfiles de inmunodetección se fotodocumentaron, se determinó el peso molecular de los marcadores de interés y se midió la densidad óptica integrada (DOI) en las muestras disponibles de cada caso, los resultados se presentan en las tablas 11 y 12.

⊕ **Resultados de DOI utilizando Western Blot estándar**

CASO	190 kDa					143 kDa					110 kDa					75 kDa					69 kDa				
	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
1	-	18.0	-	21.7	11.6	-	21.6	-	22.6	20.0	-	67.5	-	45.7	48.7	-	52.9	-	44.4	37.0	-	0	-	0	0
2	6.4	6.4	4.7	3.3	3.6	6.6	7.5	4.5	3.7	2.3	1.7	1.4	1.8	1.8	1.7	1.4	1.5	0.9	1.4	1.0	1.4	2.1	1.2	2.3	1.5
3	59.4	60.3	57.8	-	-	102.7	98.2	89.6	-	-	75.8	59.3	21.8	-	-	78.9	68.6	79.2	-	-	0	0	0	-	-
4	62.4	50.1	71.4	-	-	105.1	71.7	76.6	-	-	17.6	29.3	23.7	-	-	10.1	15.6	0	-	-	0	0	0	-	-
5	18.4	-	48.7	-	-	20.9	-	27.4	-	-	7.6	-	30.2	-	-	7.0	-	13.6	-	-	48.7	-	56.8	-	-
6	35.4	28.3	-	-	-	25.6	0	-	-	-	65.4	32.6	-	-	-	8.1	4.8	-	-	-	0	0	-	-	-
7	-	41.0	32.3	-	-	-	52.0	45.8	-	-	-	30.8	19.9	-	-	-	31.0	25.7	-	-	-	19.8	0	-	-
8	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	40.4	-	-	-	58.6	44.8	-	-	-	112.4	42.5	-	-	-
9	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	68.8	100.2	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-
10	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-
11	36.7	40.5	-	-	-	92.5	105.3	-	-	-	18.9	20.2	-	-	-	42.1	41.9	-	-	-	0	0	-	-	-
12	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-
13	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	11.5	12.9	-	-	-	64.3	63.5	-	-	-
14	0	0	-	-	-	25.7	25.8	-	-	-	13.1	21.0	-	-	-	3.1	0	-	-	-	4.7	5.9	-	-	-
15	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	113.5	73.5	-	-	-	22.7	28.8	-	-	-	9.3	0	-	-	-
16	17.1	8.7	-	-	-	16.3	11.1	-	-	-	73.7	48.4	-	-	-	14.8	11.6	-	-	-	10.8	0	-	-	-
17	13.4	9.8	-	-	-	14.6	16.1	-	-	-	129.6	91.0	-	-	-	0	0	-	-	-	7.4	8.8	-	-	-
18	25.1	26.4	-	-	-	39.6	56.1	-	-	-	72.2	102.8	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-
19	19.9	23.0	-	-	-	68.8	63.8	-	-	-	89.7	84.1	-	-	-	11.9	13.7	-	-	-	0	0	-	-	-
20	52.5	67.1	-	-	-	58.8	65.3	-	-	-	62.4	86.5	-	-	-	118.8	126.5	-	-	-	30.4	36.2	-	-	-
21	32.2	45.2	-	-	-	48.9	32.1	-	-	-	113.3	91.9	-	-	-	43.3	28.0	-	-	-	0	0	-	-	-
22	99.5	63.1	-	-	-	75.3	65.4	-	-	-	0	0	-	-	-	122.2	102.3	-	-	-	0	0	-	-	-
26	-	18.3	7.6	14.7	-	-	20.8	4.3	5.6	-	-	0	0	0	-	-	8.3	4.4	7.0	-	-	0	0	0	-
63	45.0	53.9	-	-	-	45.1	56.3	-	-	-	28.5	20.6	-	-	-	17.8	10.3	-	-	-	0	0	-	-	-
64	51.3	52.6	-	-	-	67.1	62.5	-	-	-	85.7	128.2	-	-	-	31.6	33.6	-	-	-	0	0	-	-	-
65	28.2	26.2	-	19.4	-	34.2	34.1	-	18.3	-	23.1	27.9	-	20.0	-	110.9	80.5	-	50.0	-	50.3	16.4	-	10.8	-
66	102.5	103.1	-	-	-	97.6	114.1	-	-	-	21.1	31.5	-	-	-	92.8	87.6	-	-	-	28.9	27.8	-	-	-
67	8.9	-	-	4.9	-	9.0	-	-	4.9	-	1.0	-	-	1.3	-	4.8	-	-	1.2	-	0	-	-	0	-
68	-	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	2.6	6.6	2.5	3.5	-	3.5	4.5	4.5	4.2	-	1.9	0	0	0
69	-	-	3.2	4.5	-	-	-	2.4	3.4	-	-	-	2.5	7.2	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-

Tabla 11. Respuesta de anticuerpos medida en Densidad Óptica Integrada (DOI) en cada uno de los casos estudiados. M#: M es muestra y # número de muestra.

⊕ **Resultados de DOI utilizando Western Blot Urea 6M**

CASO	190 kDa					143 kDa					110 kDa					75 kDa					69 kDa				
	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
1	-	17.2	-	17.2	16.9	-	15.9	-	22.4	19.9	-	26.0	-	38.1	20.3	-	54.2	-	30.7	21.8	-	0	-	0	0
2	5.3	5.0	4.8	4.0	1.4	6.5	4.9	3.8	3.2	1.1	0.4	0.7	1.0	0.4	0.2	0.2	0.1	0.4	0.1	0.2	0.3	0	0	0	0
3	67.6	98.0	75.3	-	-	157.0	135.2	112.9	-	-	110.2	56.3	0	-	-	0	0	74.6	-	-	0	0	0	-	-
4	78.8	49.5	61.0	-	-	115.4	45.3	79.6	-	-	14.2	32.0	26.9	-	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-	-
5	41.0	-	44.2	-	-	50.5	-	37.8	-	-	3.5	-	11.8	-	-	6.2	-	9.4	-	-	26.5	-	30.9	-	-
6	43.7	16.2	-	-	-	38.5	0	-	-	-	12.2	21.0	-	-	-	4.8	4.4	-	-	-	0	0	-	-	-
7	-	65.5	51.8	-	-	-	74.0	47.8	-	-	-	17.5	0	-	-	-	25.1	22.8	-	-	-	0	0	-	-
8	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	12.4	-	-	-	24.8	46.1	-	-	-	37.1	0	-	-	-
9	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-
10	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-
11	77.5	65.8	-	-	-	146.3	174.5	-	-	-	8.2	8.7	-	-	-	50.4	35.0	-	-	-	0	0	-	-	-
12	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-
13	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	10.2	7.4	-	-	-	12.6	18.5	-	-	-
14	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	25.2	21.2	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-
15	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	51.8	25.4	-	-	-	25.2	18.5	-	-	-	0	0	-	-	-
16	12.6	8.2	-	-	-	10.5	14.0	-	-	-	65.4	46.3	-	-	-	7.1	4.0	-	-	-	6.5	0	-	-	-
17	10.6	8.3	-	-	-	19.0	8.4	-	-	-	84.5	88.9	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-
18	37.7	19.2	-	-	-	59.4	68.8	-	-	-	121.1	92.4	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-
19	31.9	7.8	-	-	-	86.3	43.5	-	-	-	35.2	18.1	-	-	-	8.2	6.8	-	-	-	0	0	-	-	-
20	75.4	70.0	-	-	-	71.9	82.6	-	-	-	55.5	67.8	-	-	-	148.8	97.3	-	-	-	42.0	35.3	-	-	-
21	30.7	25.9	-	-	-	33.0	25.2	-	-	-	41.8	28.6	-	-	-	37.8	33.9	-	-	-	0	0	-	-	-
22	90.5	63.6	-	-	-	57.7	41.9	-	-	-	0	0	-	-	-	89.2	84.6	-	-	-	0	0	-	-	-
26	-	13.3	7.1	8.9	-	-	12.2	9.5	9.8	-	-	0	0	-	-	-	4.8	2.4	5.3	-	-	0	0	-	-
63	70.8	57.6	-	-	-	66.7	61.9	-	-	-	24.0	13.2	-	-	-	10.5	8.0	-	-	-	0	0	-	-	-
64	54.3	55.4	-	-	-	69.0	64.8	-	-	-	127.7	91.8	-	-	-	29.3	27.6	-	-	-	0	0	-	-	-
65	49.1	38.1	-	27.7	-	48.4	78.1	-	24.2	-	25.9	17.2	-	16.9	-	55.6	48.5	-	20.0	-	17.8	19.2	-	10.2	-
66	118.9	97.6	-	-	-	116.2	103.4	-	-	-	15.2	26.6	-	-	-	89.5	66.4	-	-	-	0	0	-	-	-
67	8.6	-	-	4.7	-	8.8	-	-	4.6	-	1.0	-	-	1.0	-	4.7	-	-	1.1	-	0	-	-	0	-
68	-	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	2.6	6.5	2.3	3.2	-	2.8	4.3	3.8	3.0	-	1.0	0	0	0
69	-	-	2.5	3.6	-	-	-	1.6	1.8	-	-	-	1.9	5.3	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-

Tabla 12. Respuesta de anticuerpos medida en Densidad Óptica Integrada (DOI) en cada uno de los casos estudiados. M#: M es muestra y # número de muestra.

Se realizó un análisis de varianza con los datos obtenidos en las dos técnicas de Western Blot con el fin de observar si existía diferencia significativa entre ellas, el resultado indicó que la DOI en ambas técnicas son semejantes; por tal motivo el análisis de los cinco marcadores solo se realizó utilizando los resultados del Western Blot estándar.

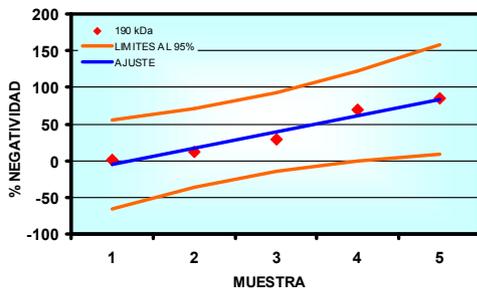
Se calculó el porcentaje de reconocimiento de cada marcador con respecto del número de casos estudiados, estratificado en CTe y CTa (tabla 13).

WB estándar	MUESTRA 1		MUESTRA 2		MUESTRA 3		MUESTRA 4		MUESTRA 5	
	CTe	CTa	CTe	CTa	CTe	CTa	CTe	CTa	CTe	CTa
190 kDa	100%	76%	80%	68%	75%	67%	80%	100%	50%	100%
143 kDa	100%	81%	80%	73%	75%	67%	80%	100%	50%	100%
110 kDa	100%	81%	80%	82%	75%	83%	80%	100%	100%	100%
75 kDa	100%	86%	80%	73%	75%	50%	80%	100%	100%	100%
69 kDa	0%	52%	40%	36%	0%	33%	0%	100%	0%	100%

Tabla 13. Porcentaje de reconocimiento de cada marcador con respecto al número de casos estudiado, en CTe y CTa obtenidos con el Western Blot estándar.

Utilizando el modelo de regresión lineal se efectuó un análisis exploratorio de la cinética de anticuerpos de los cinco marcadores analizados a través del tiempo, empleando datos generales y realizando una estratificación en CTe y CTa (Tabla 14, 15 y 16).

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS MARCADORES



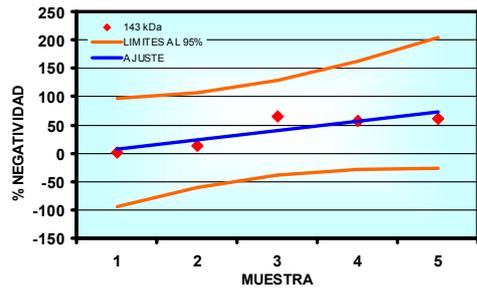
190 kDa

Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.977	0.955	$y = -28.039 + 22.415x$	3 años (M6)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	5024.322	1	5024.322	62.973	0.004
Residual	239.355	3	79.785		
Total	5263.677	4			



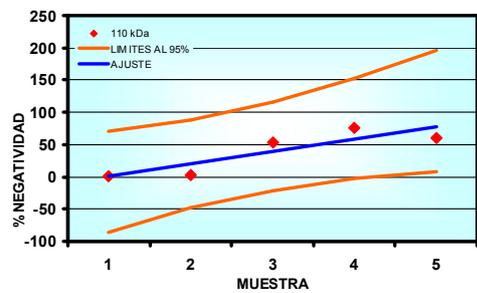
143 kDa

Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.867	0.752	$y = -9.662 + 16.382x$	3.5 años (M7)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	2983.699	1	2683.699	9.100	0.057
Residual	884.727	3	294.909		
Total	3568.426	4			



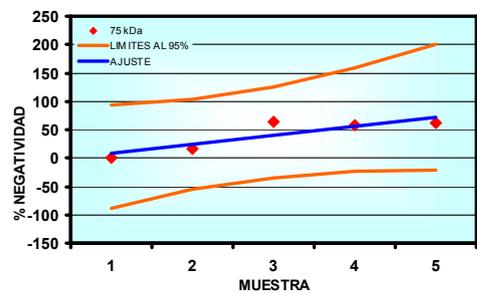
110 kDa

Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.952	0.907	$y = -34.970 + 27.403x$	2.5 años (M5)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	3754.622	1	3754.622	19.455	0.048
Residual	385.974	2	192.987		
Total	4140.596	3			



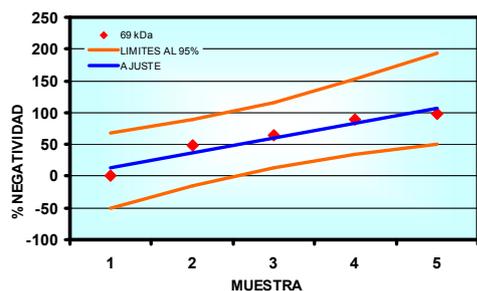
75 kDa

Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.869	0.756	$y = -8.332 + 16.116x$	3.5 años (M7)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	2597.255	1	2597.255	9.290	0.056
Residual	838.703	3	279.568		
Total	3435.958	4			



69 kDa

Resumen del modelo

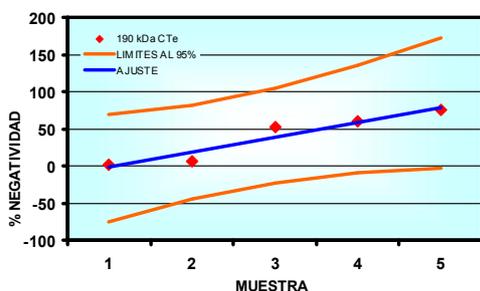
R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.962	0.926	$y = -9.822 + 23.394x$	2.5 años (M5)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	5472.792	1	5472.792	37.492	0.009
Residual	437.912	3	145.971		
Total	5910.705	4			

Tabla 14. Análisis con datos no estratificados para cada uno de los marcadores en estudio.

CRONICOS TEMPRANOS

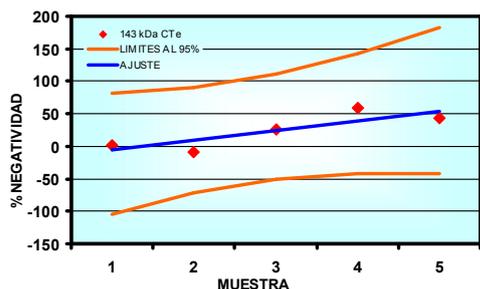


190 kDa Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.957	0.915	$y = -21.731 + 20.157x$	3 años (M6)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	4063.046	1	4063.046	32.487	0.011
Residual	375.196	2	125.065		
Total	4438.243	4			

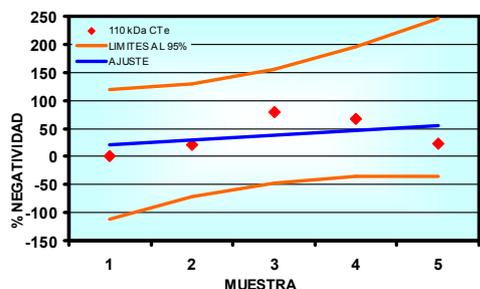


143 kDa Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.854	0.730	$y = -21.446 + 15.136x$	4 años (M8)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	2290.985	1	2290.985	8.115	0.065
Residual	846.968	3	282.323		
Total	3137.953	4			

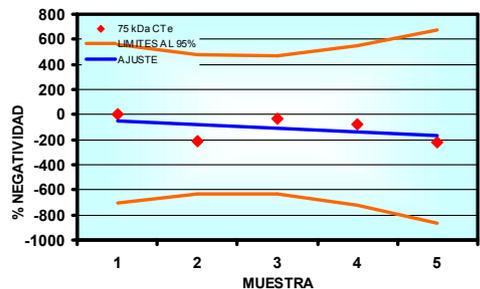


110 kDa Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.891	0.793	$y = -22.050 + 25.570x$	2.5 años (M5)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	3269.125	1	3269.125	7.671	0.109
Residual	852.365	2	426.183		
Total	4121.490	3			

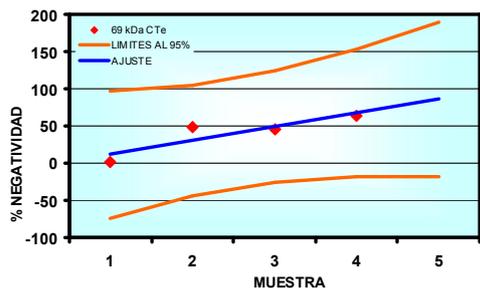


75 kDa Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.474	0.225	$y = -16.237 - 30.331x$	---

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	9199.696	1	9199.696	0.869	0.420
Residual	31747.487	3	10582.496		
Total	40947.182	4			



69 kDa Resumen del modelo

R	R ²	Modelo	Predicción a la negatividad
0.877	0.786	$y = -6.535 + 18.475x$	3 años (M6)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	1706.628	1	1706.628	7.359	0.113
Residual	463.824	2	231.912		
Total	2170.452	3			

Tabla 15. Análisis con datos estratificados para cada uno de los marcadores en estudio.

CRONICOS TARDIOS

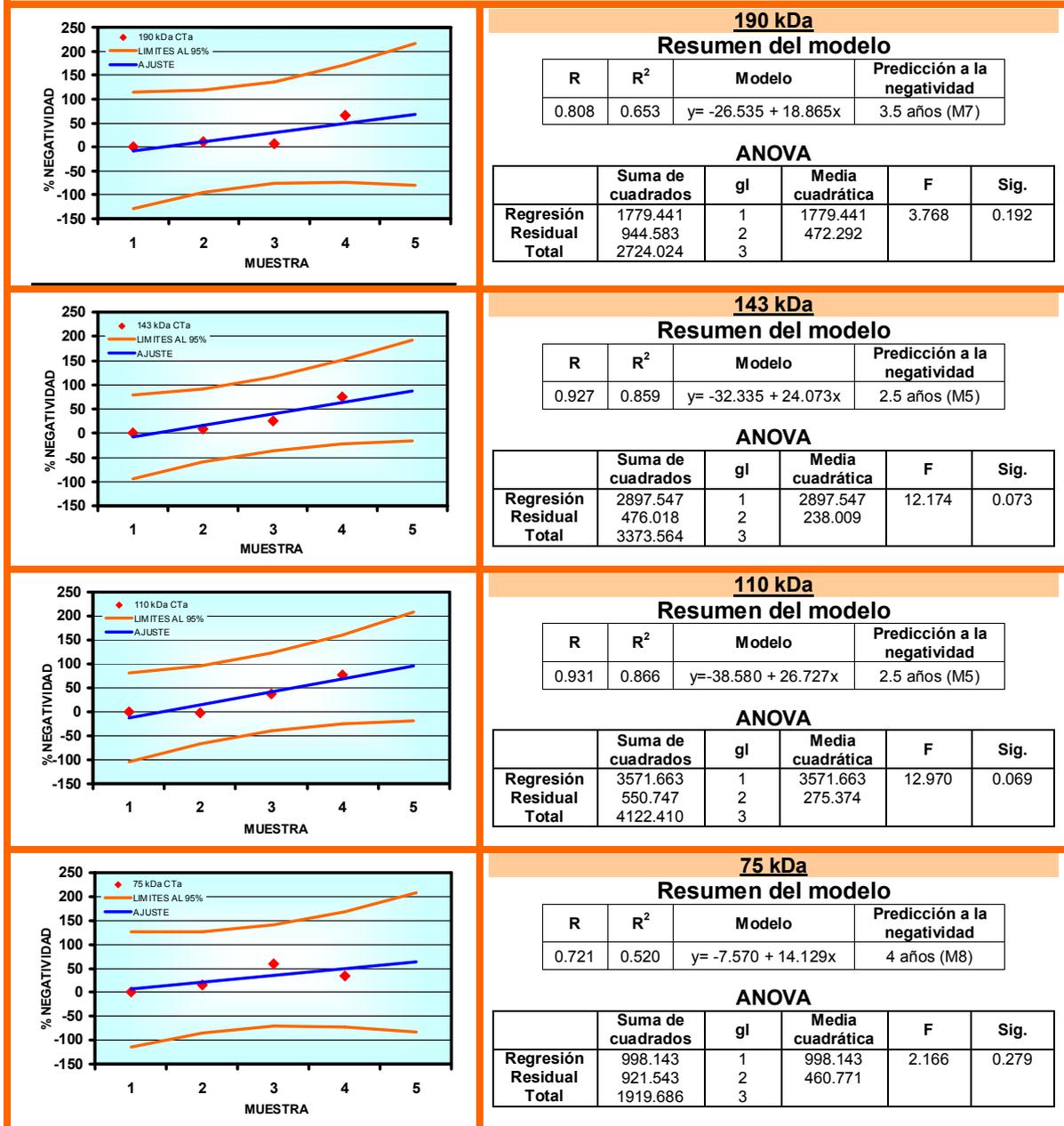


Tabla 16. Análisis con datos estratificados para cada uno de los marcadores en estudio.

TIEMPO EN ALCANZAR EL 100% DE NEGATIVIDAD			
	GENERAL	CTe	CTa
190 kDa	3 años (M6)	3 años (M6)	3.5 años (M7)
143 kDa	3.5 años (M7)	4 años (M8)	2.5 años (M5)
110 kDa	2.5 años (M5)	2.5 años (M5)	2.5 años (M5)
75 kDa	3.5 años (M7)	-----	4 años (M8)
69 kDa	2.5 años (M5)	3 años (M6)	-----

Tabla 17. Resumen de los valores de predicción al 100% de negatividad. M= Muestra.

7. DISCUSIÓN

Uno de los aspectos más complejos de la enfermedad de Chagas es evaluar el efecto del tratamiento etiológico con relación a los resultados de las pruebas serológicas, donde se necesita un seguimiento prolongado y los resultados obtenidos son en gran parte controversiales. Como criterios de evaluación del tratamiento (criterios de cura), se han empleado los cambios en la serología, la parasitemia y la evolución clínica; mientras los primeros se pueden observar en meses, la evaluación clínica requiere años de control, hecho que ha desalentado a varios grupos de investigación. Para muchos, aunque no exista correlación clínica que lo confirme, aquellos pacientes tratados que cursan con una parasitemia y serología negativas, se consideran curados (Espinoza, 2003).

Lo anterior sugiere la necesidad de reevaluar los criterios de cura en los pacientes con enfermedad de Chagas que reciben tratamiento etiológico, así como buscar nuevas herramientas para valorar el éxito terapéutico.

Este trabajo es el inicio de un proyecto en donde se plantean nuevas alternativas en la búsqueda de marcadores para evaluar la eficacia del tratamiento etiológico contra la Enfermedad de Chagas. La técnica del Western Blot o Inmunoelectrotransferencia, es empleada en la actualidad en apoyo al diagnóstico o investigación, por su alta sensibilidad y especificidad. En el laboratorio de Enfermedad de Chagas del InDRE fue implementada como apoyo al algoritmo de diagnóstico y se identificaron complejos proteicos de determinado peso molecular que son reconocidos por individuos en fase crónica asintomática.

La primera parte de este trabajo evalúa el comportamiento de la población en estudio, utilizando serología convencional (Gráfica 1). Entre CTe y CTa hay un patrón de comportamiento diferencial en donde; la respuesta de anticuerpos es menor en CTe con respecto a CTa. En el grupo control sin tratamiento el comportamiento es igual, sin embargo la caída post-tratamiento es mayor en CTe. Esto es consistente con lo observado por otros grupos de investigadores. En 1996, Andrade y col. En 129 niños de 7 a 12 años de edad, crónicos tratados con Benznidazol, seguidos tres años observó que solo el 58 % fueron negativos a un glicoconjugado de tripomastigote como antígeno y la Inmunofluorescencia indirecta (IFI), presentó una caída de cinco títulos sin llegar a la negatividad (De Andrade, 1996). En 1998, Sosa Estani y col. En 106 niños crónicos, de 6

a 12 años, que fueron tratados con Benznidazol y seguidos por cuatro años, solo el 62.1 % negativizaron al antígeno recombinante F29, y en las técnicas convencionales hubo una disminución significativa (Sosa Estani, 1998).

Evidenciando la tendencia de cada una de las técnicas de serología convencional (Tablas 6, 7 y 8), se pone de manifiesto que la técnica de HAI es la que presenta una tasa de cambio mayor comparada con las otras técnicas en los grupos de edad estudiados; aparentemente en un tiempo aproximado de 3 años se podría llegar a la negatividad, aunque este tiempo estimado es altamente variable en los parámetros del modelo ya que los valores de R^2 para esta técnica son muy bajos, lo cual puede deberse a la variabilidad entre reactivos utilizados. La aparente eficiencia de la técnica de HAI con respecto a IFI y ELISA, es debida a la sensibilidad analítica de la prueba ya que la técnica de HAI es menos sensible pero más específica y este puede ser el efecto que se está observando.

Esta podría ser una limitante operativa para utilizar estas técnicas en la evaluación eficaz del seguimiento de tratamiento; aunque no se le ha dado la importancia debida y se ha convertido en un problema poco considerado sin embargo la serología convencional y otros antígenos han sido utilizados para evaluar la efectividad terapéutica, estas pruebas fueron diseñadas para el diagnóstico serológico de la enfermedad. Teniendo este principio como fundamento pueden presentarse diferentes escenarios según el antígeno o mezcla de antígenos empleados, el linaje de *T. cruzi* utilizado y la población en donde se aplica la prueba. Actualmente en el reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas (TDR/GTC/09) se ha hecho la recomendación de evaluar herramientas diagnósticas que puedan ser utilizadas como criterio de cura después del tratamiento (OMS, 2005).

La siguiente parte del trabajo analizó cinco antígenos inmunodominantes de 65 a 200 kDa que son reconocidos por anticuerpos específicos provenientes de individuos post-tratamiento. En donde se observó que los perfiles de reactividad de cada uno de los casos son independientes entre sí; y la DOI de cada marcador varía conforme al tiempo después de recibido el tratamiento, esto se debe a que cada individuo responde de forma diferente al mosaico antigénico existente, tanto en relación con la concentración y afinidad de anticuerpos. La respuesta al tratamiento depende de la interacción entre el hospedero-parásito y fármaco lo cual es poco conocido (Espinoza, 2003). Por tal motivo es necesario

identificar marcadores específicos para la evaluación del tratamiento, con la finalidad de emitir información oportuna que permita establecer los lineamientos para un tratamiento terapéutico seguro, así como su seguimiento.

Para determinar la utilidad de los marcadores estudiados se realizó un análisis de regresión lineal; para esto se utilizaron los datos de media aritmética de la DOI de cada marcador expresado en %, como referencia tomamos la primera muestra considerándola como el 100% de positividad, la diferencia con las siguientes muestras nos da el % de negatividad en el tiempo. Como resultado de esto se obtuvieron graficas de % de negatividad en donde se presenta el modelo lineal ajustado, así como sus intervalos con un 95% de confianza; también se obtuvieron tablas indicando el coeficiente de determinación (R^2), la ecuación del modelo y el valor de predicción al 100% de negatividad. (Tablas 13, 14 y 15).

Tomando en cuenta lo anterior, el marcador de 110 kDa es el que muestra los resultados más alentadores ya que en su análisis general obtuvo un reconocimiento de 88.1 % de las muestras analizadas, su valor de R^2 fue de 0.907 y además presentó la tasa de cambio hacia la negatividad más alta en el estudio de 27.403 unidades respecto al tiempo. Con el modelo anterior ($y = 27.403x - 34.970$), y bajo el supuesto que las muestras son tomadas cada seis meses se espera llegar al 100% de negatividad en 2.5 años aproximadamente. Al estratificar en CTe y CTa el % de negatividad fue de 2.5 años en ambos casos.

Para el marcador de 190 kDa el reconocimiento fue del 79.6% de las muestras analizadas, el valor de R^2 fue de 0.955, y mostró una tasa de cambio de 22.415 unidades. La predicción para alcanzar el 100% de negatividad fue de aproximadamente 3 años; de igual manera no se observaron diferencias notables al estratificar los datos en CTe y CTa. El marcador de 143 kDa muestra un reconocimiento del 80.6% del total de las muestras; un valor de R^2 de 0.752, presenta una tasa de cambio de 16.382 unidades y un valor de predicción de 3.5 años. El análisis estratificado muestra que en los CTa el coeficiente de determinación se incrementa a 0.859 y de igual forma la tasa de cambio con 24.073 unidades respecto al tiempo, por consiguiente el tiempo en donde se observaría el 100% de negatividad disminuye a 2.5 años aproximadamente, por lo anterior se podría decir que el marcador de 143 kDa presenta mayor eficiencia en el grupo de CTa.

El marcador de 75 kDa, reconoció un 84.4% de las muestras, un valor de R^2 de 0.756 y una tasa de cambio de 16.116 unidades. Se esperaría llegar al 100% de negatividad en 3.5 años. En CTe se observó un comportamiento diferente con una R^2 de 0.225. En CTa la R^2 es de 0.520, la tasa de cambio es de 14.129 unidades y su valor de predicción sería de 4 años. El último marcador estudiado es el de 69 kDa obteniendo un valor de R^2 de 0.926 y una buena tasa de cambio de 23.394 unidades, llegando a la negatividad en 2.5 años aproximadamente y teniendo resultados semejantes al estratificar los datos en CTe y CTa, el único inconveniente para este marcador que solo presenta un 36.1% de reconocimiento en las muestras analizadas. Por lo anterior estos dos últimos marcadores se esperaría que fuera limitada su utilidad para evaluar efectividad del tratamiento.

En CTe y CTa no se observan diferencias en la tasa de cambio para los marcadores de 190 y 110 kDa. Solo el marcador de 143 kDa en CTa, presenta una tasa de cambio mayor. Por serología convencional se ha reportado que la efectividad del tratamiento en niños es mayor en comparación con los adultos y esto ocurre en un tiempo menor; este hecho se sustenta en un comportamiento diferente de la respuesta inmune entre CTe y CTa, en general el tratamiento etiológico para *T. cruzi* modula la respuesta de memoria efectora específica para el parásito, la cual depende del antígeno para persistir. Una hipótesis de la persistencia de anticuerpos post-tratamiento podría deberse a la posibilidad de incorporación de fragmentos del parásito al ADN de los tejidos del hospedero o por la reacción autoinmune a tejidos del mismo (Espinoza, 2003 y Vera de Bilbao, 2006).

Estudios de Oliveira Pinto en el 2000 demostraron que en niños con forma clínica asintomática de la enfermedad de Chagas, el tratamiento con Benznidazol incrementa las células CD8 y células NK productoras de altos niveles de IFN- γ al mismo tiempo aumenta las células CD4 y linfocitos B productores de IL-10. Estos datos apuntan a un balance regulador en el que las células efectoras contra el parásito y células supresoras de daños tisulares son concomitantemente moduladas por el tratamiento con Bz (URL⁶). Estas observaciones previas concuerdan con resultados vistos en modelos murinos, al demostrar que la activación del sistema inmune del hospedero por antígenos del parásito e IFN- γ endógeno, tendrían un papel preponderante en la eficacia del tratamiento con benznidazol (Bertocchi, 2008).

8. CONCLUSIONES

⊕ La serología convencional evidenció la diferencia en la respuesta inmune entre CTe y CTa, siendo los primeros los que presentaron una disminución de los títulos de anticuerpos en un menor tiempo.

⊕ La técnica de HAI debido a su baja sensibilidad analítica, pero a su alta especificidad, es la que requiere de menor tiempo para llegar a la negatividad; lo cual explicaría la caída de los títulos de anticuerpos en poco tiempo.

⊕ La cinética de anticuerpos de la clase IgG en el reconocimiento de proteínas inmunodominantes de 190, 143, 110, 75 y 69 kDa fue uniforme en individuos CTe y CTa post-tratamiento.

⊕ Los marcadores de 110 y 190 kDa son los que presentan mayor posibilidad de ser considerados como marcadores de éxito terapéutico, siendo el primero el más sobresaliente.

⊕ La respuesta de anticuerpos entre CTe y CTa con los marcadores estudiados no es aparentemente diferente como en la serología convencional.

⊕ El marcador de 143 kDa fue el único que presentó diferencias entre CTe y CTa, mostrando mejores resultados para el segundo grupo, por lo que se podría ser considerado como posible marcador de seguimiento de tratamiento para individuos CTa.

9. PERSPECTIVAS

Dado lo limitado de la población es importante estudiar un grupo más amplio y tener mayor información de sus características epidemiológicas y clínicas que nos permitan validar o no la utilidad de estos marcadores.

Realizar la caracterización fisicoquímica de estos marcadores, purificación, obtención de anticuerpos monoclonales.

Análisis por electroforesis en dos dimensiones, separación y purificación de marcadores específicos de seguimiento de tratamiento.

10. BIBLIOGRAFÍA

ABRAHAMSOHN IA. 1998. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 31: 117-121.

ANDRADE ALS, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida e Silva S, Luquetti A. 1996. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 348: 1407-13.

BERTOCCHI GL, Álvarez MG, Pérez D, Armenti A, Viotti RJ, Lococo B, Petti M, Postan M, Albareda MC, Laucella SA, Tarleton RL. 2008. Evaluación inmunológica del tratamiento con benznidazol en la enfermedad de Chagas crónica. REV ARGENT CARDIOL; 76:260-265.

CARDONI RL, Antunez MI, Abrami A. 1999. Respuesta Th1 en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. Medicina (Buenos Aires); 59 (Supl. II): 84-90.

CEVALLOS AM, Hernandez R. 2003. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Departamento Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

CHAGAS C. 1909. New human trypanosomiasis. Studies about the morphology and life-cycle of *Schizotripanum cruzi*, etiological agent of a new morbid entity of man. Mem Inst Oswaldo Cruz. 159-218.

CRUZ REYES A, Pickering López JM. 2006. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. México. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 101(4): 345-354.

ESPINOZA RA. 2003. Criterios de cura en la Enfermedad de Chagas: Interpretación de hallazgos parasicológicos, serológicos y clínicos. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. INHRR v.34 n.2 Caracas, Venezuela.

FABBRO D, Velazquez E, Mendoza N, Streiger M, Arias E, Denner S, Del Barco M, Amicone N, Pravia C, Malagrino N y Ruiz AM. 2007. Evaluación de ELISA F29 como marcador de eficacia del tratamiento etiológico en la enfermedad de Chagas. *Parasitol Latinoam* 62: 103 - 111, FLAP.

FESCINA RH, Simini F, Belitzky R. 1985. Evaluación de los procedimientos diagnósticos. Aspectos metodológicos. *Salud Perinatal*. 2:39-43.

GALVAO LM, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA, Andrade AL. 2003. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. *J Clin Microbiol*;41(11):5066-70.

GAZZINELLI RT, Talvani A, Camargo MM, Santiago HC, Oliveira MA, Vieira LO, Martins GA, Aliberti JC and Silva JS. 1998. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31: 89-104.

GOLDSMITH RS, Kagan IG, Zárate CR. 1978. Epidemiological studies of Chagas disease in Oaxaca. *Bol. Ofic. Sanit. Panam*. 12:236–250.

GOLDSMITH RS, Kagan IG, Zárate CR. 1978. El potencial de transmisión en la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea: Hallazgos serológicos entre donadores en el Estado de Oaxaca. *Salud Pú. Méx*. 22:439–444.

GONZÁLEZ FERNÁNDEZ JA, Urbina Fuentes M, Tapia Conyer R. 2000. Manual para la vigilancia epidemiológica de la tripanosomiasis americana. Secretaría de Salud, México DF.

GRUPO DE TRABAJO CIENTÍFICO. 2005. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Organización Mundial de la Salud (OMS). Buenos Aires, Argentina.

GUZMÁN BRACHO C, Floriani Verdugo J, Pastén Sánchez S y col. 2000. Manual de procedimientos para laboratorios de diagnóstico de enfermedad de Chagas o tripanosomosis americana. Secretaria de Salud, InDRE. México.

GUZMÁN BRACHO C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico:an update. *TRENDS in Parasitology*. 17(8):372-376.

GUZMÁN M, Zavala CJ, Acosta VK, Rosado BM. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Biomedic*. 10(3):177–184.

HULSEBOS LH. 1989. "The effect of interleukin-2 on parasitemia and myocarditis in experimental Chagas' disease". *Journal of Protozoology* 36 (3): 293-298.

KIRCHHOFF LV. 1993. American trypanosomiasis (Chagas disease)—a tropical disease now in the United States. *N Engl J Med*. 29(9):639-44.

LASSO P, Cuellar A, Rosas F, Velasco V, Puerta C. 2009. Células dendríticas y linfocitos T reguladores naturales en pacientes con enfermedad crónica de Chagas. Asociación Colombiana de Infectología. *Revista INFECTIO*. Vol 13 No 4. Pág. 246-253.

LÓPEZ ANTUÑANO FJ. 1997. Quimioterapia de las infecciones producidas por *Trypanosoma cruzi*. *Salud Pública de México*. Vol. 39, número 005. pp. 463-471.

LÓPEZ ANTUÑANO FJ, Rangel Flores H, Ramos C. 2000. Diagnosis of Chagas' Disease. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42:121-129.

LUQUETTI AO. 2007. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas: Diagnóstico serológico, xenodiagnóstico, hemocultivo, reacción en cadena de la polimerasa y examen directo. En: *Enfermedad de Chagas*. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. 1ª Edición.

LUQUETTI AO, Rassi A. 2007. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. *Experiencia en Brasil*. En: *Enfermedad de Chagas*. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. 1ª Edición, Pág. 145-148.

MARCIPAR IS, Risso MG, Silber AM, Revelli S, Marcipar AJ. 2001. Antibody Maturation in *Trypanosoma cruzi*-Infected Rats. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol. 8, No. 4. Pág. 802–805.

MC GHEE RB, Cosgrove WB. 1980. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. Microb. Rev. 44:140-173.

MOMEN H. 1999. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 181– 184.

NORMA OFICIAL MEXICANA. PROY-NOM-032-SSA2-2000. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector.

OPS/OMS. 1999. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. Conclusiones de una consulta técnica. Río de Janeiro, Brasil. OPS/HCP/HCT/140/99.

OPS/OMS. 2003. Taller del cono sur sobre enfermedad de Chagas. Conceptualización de la vigilancia epidemiológica. Buenos Aires, Argentina. OPS/DPC/CD/290/04.

ORTIZ B. 2009. Galectina-1: regulador negativo de la respuesta inmune inflamatoria y posible agente terapéutico. REV INST NAL ENF RESP MEX. Vol 22 No 3. Pág 206-216.

PASTÉN SANCHEZ S. 2003. Manual de Técnicas de Laboratorio. Laboratorio de Enfermedad de Chagas. InDRE. SSa.

PÉREZ CLÍMACO J, Orjuela A, Venegas D, Montenegro JJ. 2007. Etiología, fisiopatología e inmunología de la enfermedad de Chagas. En: Enfermedad de Chagas. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. 1ª Edición.

PINTO DIAS JC. 2003. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. Xlla. Reunión Intergubernamental INCOSUR/Chagas, Santiago, Chile, pp129-134.

REDHEAD SA, Cushion MT, Frenkel JK, Stringer JR. 2006. "*Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications". J Eukaryot Microbiol. 53 (1): 2–11.

RODRIGUEZ MORALES AJ. 2005. Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas. Rev Perú Med Exp Salud Pública 22(2).

ROJAS LOAYZA D. 2002. Curso Virtual sobre el Control de Vectores, Reservorios y Agentes en la Vivienda y el peridomicilio; OPS/OMS; La Paz, Bolivia.

ROSALES BORJAS D, Ortiz Ortiz L. 2008. Infecciones parasitarias: Mecanismos de evasión de la respuesta inmune. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa*. Vol 2/Num2.

SINGH REDHU N, Dey A, Balooni V, Singh S. 2006. Use of Immunoglobulin G Avidity To Determine the Course of Disease in Visceral and Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis Patients. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol. 13, No. 8. Pág. 969–971.

SOSA ESTANI S, Segura E, Ruiz AM, Velásquez E. 1998. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 59 (4): 526-9.

SOSA ESTANI S, SEGURA E. 1999. Tratamiento de la infección por *Trypanosoma cruzi* en fase indeterminada: Experiencia y normatización en la Argentina. *MEDICINA (Buenos Aires)*; 59 (Supl. II): 166-170.

STORINO R. 2002. El tratamiento antiparasitario en la enfermedad de Chagas, debe darse a todos o no? En contra. *Revista Argentina de Cardiología*. Vol. 70; Número 5. pp. 391-398.

SSA. Información Epidemiológica de Morbilidad. Dirección General de Epidemiología. México, 1990-1998.

TAY J, Salazar PM. 1979. Estudio epidemiológico de la enfermedad de Chagas en Jalisco, Rep. Mex. *Rev. Salud Públ.* 20:145149.

TROPICAL DISEASES RESEARCH PROGRESS. 1991-1992. Eleventh Programme Report of the UN DP/World Bol. Special Program for Research and Training in Tropical Disease (TDR) Who. Geneve. 1993.

UNE C, ANDERSSON J and ÖRN A. 2003. Role of IFN α/β and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon- γ production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. Clin Exp Immunol; 134:195–201.

VEGA CHIRINOS S, Náquira Velarde C. 2006. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas). 2ª. Ed. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.

VELASCO CASTREJÓN O. 1991. La enfermedad de Chagas. Publicación técnica del INDRE Núm. 8. México.

VELASCO CASTREJÓN O, Valdespino JL, Tapia Conyer R. 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. Salud Pública de México. 34(2):186-195.

VERA DE BILBAO N, Elías E, Martínez J, Carpinelli M, Torres S, Sosa L, Díaz V. 2006. Evolución serológica y parasitológica post-tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas crónica reciente. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, Vol. 2(1); 5-10.

VIDAL ACOSTA V, Ibáñez Bernal S, Martinez Campos C. 2002. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. Salud Pública de México 42: 496-503.

WENDEL S, Brener Z, Camargo ME. 1992. Chagas' disease (American Tripanosomiasis): Its impact on transfusions and clinical medicine. A ISBT Brazil, 49-80.

WHO. 2000. Expert Committee on the Control of Chagas Disease. Brazil. Control of Chagas diseases: second report of the WHO expert committee.

URL (Uniform Resource Locators)

URL¹. HISTORIA. <http://www.fac.org.ar/fec/chagas/fatala/historia.htm>

URL². SSA DEL ESTADO DE MÉXICO. <http://salud.edomex.gob.mx/html/article.pnp>

URL³. WHO. <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/>

URL⁴. CARLIER Y. <http://www.emedicine.com/med/topic327.htm>

URL⁵. OPS/MSF. http://www.msf.es/curso_chagas/iframe/titular.htm

URL⁶. OLIVEIRA PINTO L. <http://www.fiocruz.br/chagas.esp/cgi/cgilua.exe/sys/stara.htm>

11. ANEXOS

Preparación de reactivos y soluciones:

Extracto crudo: *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes)

- ✓ **Epimastigotes:** masa húmeda de parásitos en fase logarítmica cosechados y lavados 2 veces con solución salina.
- ✓ **TBS, Tris base salina 100 mM, NaCl 0.15M:** 1.211g de Tris base (Roche, Lot. 93401120) se agregan a 80 mL de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.5 con HCl fumante 37% (Merck, Cat. 821) y se agrega 0.88g de NaCl (Omnichem, Lot. 15304078) y se aforar a 100 mL.
- ✓ **Tioglicolato de sodio 1:20,000:** 10 mg de Tioglicolato de sodio (Bioxon, Cat. 164-2) se agregan a 10 mL de TBS (concentración final 1:1000), de esta solución se toma 1 mL y se agrega a 19 de TBS, (concentración final 1:20,000).

Soluciones: Inhibidores de proteasas

- ✓ **EDTA 1M pH 8.** A 10 mL de agua bidestilada se agrega 3.72g de EDTA (Bio-Rad, Cat. 210000996). Almacenar a -20°C en fracciones de 1 mL.
- ✓ **PMSF 0.333M.** A 10 mL etanol grado reactivo se agrega 581mg de PMSF (SIGMA, Cat. P7626-25G). Almacenar a -20°C en fracciones de 1 mL.
- ✓ **Aprotinina 1mM.** A 10 mL de agua se agrega 6.5 mg de aprotinina (ROCHE, Cat. 10981532001)
- ✓ **PI-A 200x.** 1 mL de EDTA 1M pH 8.0 se lleva a un volumen final de 5 mL con agua bidestilada y se almacenar a -20°C en fracciones de 1 mL.
- ✓ **PI-B 200x.** A 2 mL de etanol grado reactivo se agregan 3 mL de PMSF 0.333M (si es necesario calentar en baño de agua a 65°C para su disolución). Fraccionar y almacenar a -20°C.
- ✓ **Aprotinina.** A 3 mL de aprotinina 1 mM se agrega 2 mL de agua bidestilada, se fracciona y se almacena a -20°C.

Cuantificación de proteínas: Método de Lowry

Solución A: (Mezcla de A1, A2 y A3)

A1: Tartrato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2 g, aforar a 100 mL.

A2: Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 1 g, aforar a 100 mL con agua destilada.

A3: Carbonato de sodio (NaCO_3) 20 g, aforar a 1000 mL con NaOH 0.1N.

Se prepara la siguiente mezcla de trabajo: A1: 0.5 mL, A2: 0.5 mL, A3: 50 mL

Solución B: Reactivo de Folin (Fenol-Ciocalteu) (SIGMA, Cat. F9252) 1N. Diluir volumen a volumen con agua destilada.

Electroforesis PAGE-SDS 10%, Glicerol 10%

1. Solución de acrilamida para el gel separador (30.0% T 0.8% C_{bis})

Acrilamida (Bio-Rad, Cat. 161-0107).....30.0 g

Bisacrilamida (Bio-Rad, Cat. 161-0201).....0.8 g

Agua destilada.....100 mL

Disolver en aproximadamente 80 mL y aforar a 100 mL, filtrar por papel Wathman No. 1 y conservar a 4 °C en frasco ámbar.

2. Regulador para gel separador (4x Tris 1.5 M, pH 8.8 + SDS)

Tris-base (Roche, Lot. 93401120).....18.5 g

Disolver en aproximadamente 80 mL y ajustar pH con ácido clorhídrico concentrado, agregar 0.4g de SDS, aforar a 100 mL, filtrar por papel Watman No. 1 y conservar a 4 °C en frasco ámbar.

3. Regulador para gel concentrador (4x Tris 0.5 M, pH 6.8 + SDS)

Tris-base (Roche, Lot. 93401120).....6.05 g

Disolver en aproximadamente 60 mL y ajustar pH con ácido clorhídrico concentrado, agregar 0.4g de SDS, aforar a 100 mL, filtrar por papel Watman No. 1 y conservar a 4 °C en frasco ámbar.

4. Persulfato de amonio (Psa) al 10%

Psa (Sigma, Cat. A9164-25G).....100 mg
Agua destilada.....1.0 mL

Se recomienda sólo preparar la cantidad suficiente a utilizar, pues el reactivo es inestable.

5. TEMED (Bio-Rad, Cat. 161-0801). Agregar de 10 a 15 µL por volumen de gel, ver preparación de geles.

6. Azul de bromofenol (0.5% p/v en etanol al 10%)

Azul de bromofenol (Sigma, Lot. 34H35181)..... 50 mg
Etanol (PQF, Cat. RA20100) al 10%..... 10 mL

7. Regulador de corrimiento 5x

Glicina (Bio-Rad, Cat. 161-0718)..... 72 g
Tris-base (Bio-Rad, Lot. 93401120)..... 15 g
SDS (Sigma, Cat. L-5750)..... 5 g
Agua destilada..... 1 litro

Diluir 200 mL a 1 L, no es necesario medir el pH (aproximado a 8.3) y se debe conservar en refrigeración. El tanque interior de la cámara debe ser llenado con regulador nuevo en cada corrimiento mientras que el regulador del tanque exterior puede ser reciclado por no más de 3 ó 4 veces.

8. Regulador de muestra 2x

4x Tris 0.5 M, pH 6.8 + SDS..... 2.5 mL
SDS (Sigma, Cat. L-5750)..... 0.4 g
Glicerol (Sigma, Cat. G-2025)..... 2.0 mL
Ditiotreitol, DTT (Promega, Cat. V3151)..... 0.31 g
Azul de bromofenol 0.5%..... 0.2 mL

Agua destilada.....4.7 mL

Mezclar un volumen de muestra con un volumen de regulador de muestra 2x. Se recomienda fraccionar en volúmenes de 1 mL y congelar a -20°C hasta su uso.

9. Gel separador al 10%

Solución de monómeros..... 5 mL
4x TRIS 1.5 M pH 8.8 + SDS..... 3.75 mL
Agua bidestilada..... 4.75 mL
Glicerol 10% v/v..... 1.5 mL
Persulfato de amonio al 10%..... 0.05 mL
TEMED..... 0.01 mL

NOTA: Cantidad suficiente para preparar 2 geles de 7x10 cm.

10. Gel Concentrador

Solución de monómeros..... 0.95 mL
4x TRIS 0.5 M pH 6.8 + SDS..... 1.25 mL
Agua bidestilada..... 2.3 mL
Glicerol 10% v/v..... 0.5 mL
Persulfato de amonio al 10%..... 0.05 mL
TEMED..... 0.01 mL

Tinción azul de Coomassie

1. Solución madre para tinción de proteínas con azul de Coomassie

Azul de Coomassie (Sigma, Cat. B-0149).....2 g
Agua bidestilada.....200 mL

Disolver en agua caliente, filtrar en papel Watman No.1 y conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

2. Solución de trabajo azul de Coomassie

Solución madre de azul de Coomassie.....31.3 mL

Metanol.....	125 mL
Ácido acético glacial (PQM, Cat. 03012).....	25 mL
Agua bidestilada.....	68.7 mL

Mezclar, llevar a 250 mL, y filtrar por papel Watman No.1, conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

3. Solución decolorante para gel teñido con azul de Coomassie

Metanol.....	500 mL
Ácido acético glacial.....	100 mL
Agua bidestilada.....	400 mL

Electrotransferencia

1. Regulador de transferencia

Tris-base (Bio-Rad, Lot. 93401120).....	3.02 g
Glicina (Bio-Rad, Cat. 161-0718).....	14.4 g
Metanol (J. T. Baker, Cat. 9070-02).....	200 mL
Agua bidestilada.....	800 mL

A 500 mL de agua destilada agregar 3.02 de tris base hasta su disolución, 14.4 gramos de glicina hasta su disolución y 200 mL de metanol, si no ocurre precipitación ajusta el pH a 8.3 con hidróxido de sodio 1 M y llevar a 1000 mL, se almacena en refrigeración, puede ser usado 3 veces.

2. Regulados salino de fosfatos (PBS) 0.01 M pH 7.4

NaCl (Omnichem, Lot. 15304078).....	0.6 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (Merck, Lot. A957546).....	3.0 g
12.8 g Na ₂ HPO ₄ (Merck, Cat. F323786) si Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O (J. T. Baker, Cat. 3824-01) se requiere 24.12 g.	

Si es necesario con las mismas sales se ajusta el pH a 7.4, llevar a 1000 mL.

3. PBS-Tween 0.1% (Sigma Cat. P-1379)

PBS 0.01M pH 7.4.....1000 mL

Tween 20 (Bio-Rad, Cat. 170-6531).....1 mL

4. Solución de Bloqueo: PBS-Tween 20-0.1%-albúmina sérica bovina 1%

PBS-Tween 0.1%.....50 ml

Albúmina sérica bovina (Roche, Lot. 70153825).....0.5 g

5. Colorante rojo de Ponceau S

Ácido tricloroacético (Sigma, Lot. 113H02551).....3 g

Rojo de Ponceau S (Sigma, Lot. 110H3737).....20 mg

Agua bidestilada.....100 mL

6. Sueros de referencia y testigos

Diluidos en solución PBS-Tween 0.1%-albúmina sérica bovina al 1%

7. Conjugado Anti-IgG humana - Biotina (Zymed, Lot. 01062583)

Conjugado Estreptavidina - Fosfatasa Alcalina (Jackson ImmunoResearch, Lot. 59994)