



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Identificación de componentes inmunodominantes de una
cepa de *Trypanosoma cruzi* por Western blot**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Dalia Barrios Palacios



**DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. Elia Torres Gutiérrez
2012**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
Barrios
Palacios
Dalia
56 66 93 00
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias, UNAM
Biología
407074765
2. Datos del tutor
M en C
Elia
Torres
Gutiérrez
3. Datos del sinodal 1
Dra
Bertha Josefina
Espinoza
Gutiérrez
4. Datos del sinodal 2
M en C
Isabel Cristina
Cañeda
Guzmán
5. Datos del sinodal 3
Dra
Paz María Silvia
Salazar
Schettino
6. Datos del sinodal 4
Dr
Roberto José Rafael
Hernández
Fernández
7. Datos del trabajo escrito
Identificación de componentes inmunodominantes de una cepa de *Trypanosoma cruzi*
por Western blot
60 p
2012

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina, UNAM, con el apoyo de DGAPA-PAPIIT mediante el proyecto IN204710

Agradecimientos

A la Dra. Paz María Silvia Salazar Schettino por ser un ejemplo a seguir en el ámbito profesional y por inculcarnos el amor a la familia siempre, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por la confianza, las enseñanzas y el apoyo incondicional depositado en mi persona.

A la M. en C. Martha Irene Bucio Torres por el apoyo y la confianza que me ha brindado, por sus enseñanzas día a día y por creer en mí, de todo corazón muchas gracias.

A la M. en C. Margarita Cabrera Bravo por ser un ejemplo de crecimiento personal y profesional, por su carisma y por el conocimiento transmitido.

A la M. en C. Gloria Rojas Wastavino por la sus valiosas recomendaciones en el presente trabajo, por el conocimiento transmitido y por el apoyo que siempre me ha dado.

A la M. en C. Adela Ruíz Hernández por su carisma y por el apoyo que me ha brindado.

A la M. en C. Yolanda Guevara Gómez por el apoyo técnico en el cultivo de epimastigotes del aislado de *T. cruzi* utilizado en el presente trabajo y por sus enseñanzas.

A la M. en C. Elia Torres Gutiérrez por el desarrollo del presente trabajo bajo su dirección, por la asesoría en las técnicas empleadas, por el apoyo y el conocimiento transmitido a lo largo del proyecto.

Al Biólogo Aarón Rodríguez Caballero por sus valiosas aportaciones al presente trabajo.

Al Biólogo Mauro Vences Blanco por el conocimiento transmitido respecto del vector.

A la M. en C. Laura Flores Villegas y a la Bióloga Mariana Citlalli de Alba Alvarado por el conocimiento transmitido y el apoyo brindado.

A la técnico de Laboratorio Evangelina Anaya Gil por el apoyo en la preparación de los reactivos de las técnicas utilizadas en el presente trabajo.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser por los sueros proporcionados, muy valiosos en el presente trabajo.

A los sinodales por la revisión del presente trabajo, por sus valiosas recomendaciones y aportaciones.

Dedicatorias

A mi papá Santiago, porque el camino que he recorrido no hubiese sido posible sin el apoyo que siempre me ha brindado, por ser una persona que siempre me ha permitido crecer profesionalmente y por los valores inculcados desde pequeña.

A mi mamá Maura por el apoyo, la confianza y el amor que siempre ha depositado en mi persona, porque siempre está cuando la necesito a pesar de la distancia, porque es un ejemplo de fortaleza, amor y bondad.

A mi hermana Adriana por cuidarme desde siempre, porque tus palabras me han ayudado a ver las cosas de modo distinto y me han hecho crecer, por el amor y el apoyo que siempre me has dado.

A mi hermana Jacqueline por el tiempo compartido desde pequeñas, porque a pesar de las diferencias nos respetamos y seguimos adelante, y por el apoyo mutuo de siempre.

A mi hermano Luis Marcial por ayudarme a ser una mejor persona y por el apoyo que siempre me das.

A mis sobrinas Karla y Lupita por su sencillez y espontaneidad, por alegrarnos el día con su compañía y sus ocurrencias. Gracias por hacernos mejores personas con una sola sonrisa. Las quiero mucho muchote.

A Alejandro Pérez por el apoyo y el amor que me has dado por muchos años, por tu carisma de siempre y porque me impulsas a ser una mejor persona cada día.

A mis amigos Alejandra, Lili, Luz, Nataly, Nidia, Ana, Juan Luis, Fernando, Laurita, Bere, Miritoz, Diego, Gerardo, Mandy, Gus, Aarón y todos aquellos que siempre me han apoyado y me han brindado su amistad, gracias por los momentos compartidos y por su confianza.

ÍNDICE

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS	2
2.2. AGENTE ETIOLÓGICO	3
2.2.1. Clasificación taxonómica	3
2.2.2. Biología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
2.2.3. Ciclo de vida	5
2.3. VECTOR	7
2.3.1. Clasificación taxonómica	7
2.3.2. Biología del vector	7
2.4. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN Y DE INFECCIÓN	8
2.5. EPIDEMIOLOGÍA	9
2.6. CUADRO CLÍNICO	11
2.7. PATOGÉNESIS	13
2.7.1. Teoría de la Persistencia parasitaria	13
2.7.2. Teoría de la autoinmunidad	13
2.8. DIAGNÓSTICO	14
2.8.1. Métodos parasitológicos	14
2.8.2. Métodos inmunológicos	14
2.8.3. Métodos de diagnóstico molecular	15
2.9. TRATAMIENTO	15
3. ANTECEDENTES	17
3.1. WESTERN BLOT EN EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR <i>T. cruzi</i>	17
3.2. ANTÍGENOS DE <i>T. cruzi</i>	19
3.3. DESARROLLO DE HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS	20
3.3.1. Introducción a los anticuerpos policlonales	20
3.3.2. Producción de anticuerpos policlonales	21
3.3.3. El conejo como modelo en la producción de anticuerpos policlonales	22
4. JUSTIFICACIÓN	23
5. HIPÓTESIS	24
6. OBJETIVOS	25
6.3. Objetivo general	25
6.4. Objetivos particulares	25
7. METODOLOGÍA	26
7.1. Obtención del extracto parasitario	26
7.1.1. Parásitos	26
7.1.2. Expansión parasitaria	26
7.1.3. Extracción antigénica	26
7.1.4. Cuantificación de proteínas totales	27

7.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de Sodio (SDS-PAGE)	27
7.3. Obtención de pesos moleculares del extracto proteico	28
7.4. Inmunoblotting (Western blot)	28
7.5. Sueros humanos	29
7.6. Obtención de anticuerpos policlonales	29
7.6.1. Conejos	29
7.6.2. Elección de antígenos para la inmunización	30
7.6.3. Preparación del inóculo	30
7.6.4. Inmunización y obtención de suero de conejo	30
7.7. Western blot de sueros de conejo	31
8. RESULTADOS	32
8.1. SDS-PAGE del extracto proteico	32
8.2. Western blot de sueros humanos	34
8.3. Reactividad del Western blot de sueros humanos	37
8.4. Establecimiento de los criterios de positividad para el Western blot	39
8.5. Anticuerpos policlonales	40
8.5.1. Western blot de sueros de conejo	40
9. DISCUSIÓN	42
10. CONCLUSIONES	48
11. PERSPECTIVAS	49
12. REFERENCIAS	50

1. RESUMEN

La enfermedad de Chagas representa un importante problema de salud en nuestro país. En la fase aguda de la enfermedad, la infección puede diagnosticarse mediante métodos parasitológicos; sin embargo, en la fase crónica, los métodos serológicos son la principal herramienta de diagnóstico. Entre éstos métodos, el Western blot es una técnica que permite la identificación de proteínas parasitarias inmunogénicas en los hospederos infectados.

El objetivo del presente trabajo fue identificar las proteínas inmunogénicas del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *Trypanosoma cruzi* y producir anticuerpos policlonales afines a estas; para lo cual se utilizaron epimastigotes en medio de cultivo axénico y se obtuvo el extracto proteico. Los componentes fueron separados por electroforesis y luego transferidos a una membrana de nitrocelulosa para realizar el Western blot de 35 sueros de pacientes positivos a *T. cruzi*, 35 sueros de pacientes negativos y 12 con infección de *Leishmania spp.* Se identificaron 11 componentes (250, 140, 84, 75, 68, 40, 38, 34, 27, 26 y 25 kDa) reconocidos por más del 50% de sueros positivos, cuatro de los cuales (27, 34, 38 y 40 kDa) mostraron un reconocimiento de 97, 100, 100 y 100%, respectivamente. Los componentes de 27 y 34 kDa fueron aislados a partir de la membrana de nitrocelulosa y se inocularon por separado en conejos para producir anticuerpos policlonales. Los anticuerpos policlonales específicos contra componentes de *T. cruzi* tienen un empleo potencial en pruebas diagnósticas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, fue descubierto en 1909 por el Doctor Carlos Chagas, en Lassance, Minas Gerais, Brasil, quien describió la morfología y el ciclo de vida del parásito en huéspedes vertebrados e insectos transmisores y realizó observaciones del curso de la infección en animales de laboratorio y en personas infectadas (Chagas, 1909).

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana se encuentra ampliamente distribuida en el Continente Americano, desde el sur de los Estados Unidos hasta Chile y Argentina y, en algunos países de las Antillas (Guzmán-Marín et al., 1999).

Estimaciones de la Organización Panamericana de la Salud indican que cerca de 7.7 millones de personas están infectadas y el 20% de la población de América Latina (109 millones de personas) está en riesgo de contraer la infección. En México se estiman 1 100 000 personas infectadas y que el 28% de la población se encuentra en riesgo de infección (OPS, 2006). A partir de 1993, el Banco Mundial considera la Enfermedad de Chagas, como la enfermedad parasitaria más importante de América, en términos de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) que se pierden a causa de la infección (World Bank, 1993).

2.2. AGENTE ETIOLÓGICO

2.2.1. Clasificación taxonómica (Levine, 1989)

Reino Protista

Subreino Protozoa

Phylum Sarcomastigophora

Subphylum Mastigophora

Clase Zoomastigophorea

Orden Kinetoplastida

Familia Trypanosomatidae

Género *Trypanosoma*

Especie *Trypanosoma cruzi*

2.2.2. Biología de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un protozoo flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida, cuyos miembros se caracterizan por presentar un cinetoplasto constituido por material genético extranuclear, que se encuentra albergado dentro de su única gran mitocondria. Durante su ciclo de vida se pueden identificar tres estadios morfológicos principales (Fig. 1), que se diferencian entre sí por la posición del cinetoplasto en relación al núcleo (Souza, 2002):

- ◆ Amastigote: Forma semiesférica de 2-4 μm de diámetro, no presenta flagelo libre, su núcleo es muy aparente y el cinetoplasto tiene forma de bastoncillo. Es la forma replicativa intracelular en los vertebrados (De Haro, 1995).
- ◆ Epimastigote: Forma delgada de 20 μm de longitud y 2-5 μm de diámetro con el cinetoplasto anterior al núcleo. El flagelo emerge del cinetoplasto y forma una pequeña membrana ondulante antes de salir por la parte anterior del parásito. Se encuentran en el intestino del hospedero invertebrado y en la fase de crecimiento de cultivos axénicos (Souza, 2002; Alves y Colli, 2008).

- ◆ Tripomastigote: Tiene el cuerpo alargado en forma de “S” o “C”, mide 25 μm de longitud y 2 μm de diámetro. El cinetoplasto está localizado posterior al núcleo. A partir del cinetoplasto emerge la membrana ondulante que recorre lo largo del cuerpo del parásito saliendo libre en la porción anterior en forma de flagelo. No realizan división celular. Es la forma infectiva y se encuentra en la ámpula rectal y heces del hospedero invertebrado (tripomastigote metacíclico) y en la sangre del hospedero vertebrado (tripomastigote sanguíneo) (Souza, 2002).

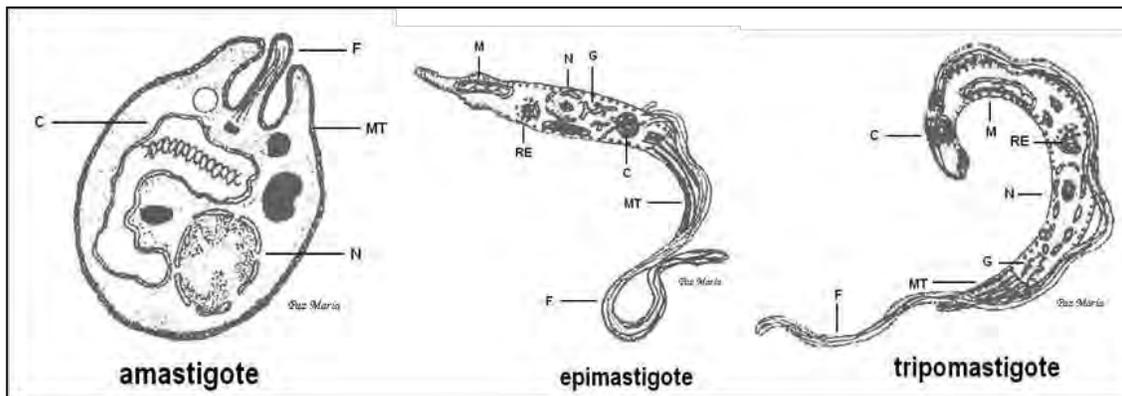


Figura 1. Principales estadios morfológicos de *T. cruzi*. Donde C-cinetoplasto, M-mitocondria, RE-retículo endoplásmico, N-núcleo, G-aparato de Golgi, MT-microtúbulos y F-flagelo. (Cortesía: Dra. Paz María Salazar Schettino)

T. cruzi comprende poblaciones de aislados que circulan entre insectos vectores, hombre y reservorios tanto domésticos como selváticos; su heterogeneidad ha sido ampliamente estudiada por métodos biológicos, bioquímicos y moleculares (Guzmán-Marín et al., 1999; Rassi et al., 2010). Estos estudios han agrupado poblacionales de *T. cruzi*, definiendo un número de subgrupos relevantes. Así, en la literatura encontramos subgrupos con distinta denominación, como zimodemos (Miles y cols, 1977), eschizodemas (Morel et al., 1980), biodemas (Andrade, 1974), clonets (Tibayrenc y Ayala, 1991), linajes

(Souto et al., 1996), clados (Kawashita et al., 2001) y unidades discretas de clasificación (DTUs) (Tibayrenc, 1998).

Actualmente se ha llegado a un consenso sobre la nomenclatura intraespecífica de los subgrupos genéticos de *T. cruzi* en el cual se clasifican seis unidades discretas de tipificación (DTU's, por sus siglas en inglés), *T. cruzi* I-VI, identificadas por un triple ensayo de rDNA PCR y PCR-RFLP de los loci HSP60 y GPI (Zingales et al., 2009).

2.2.3. Ciclo de vida

El protozoario *T. cruzi* tiene un ciclo de vida complejo, en el que están involucrados el hombre, el artrópodo transmisor y un gran número de reservorios mamíferos (Fig. 2).

En el ciclo de vida de *T. cruzi*, el triatomino se alimenta de sangre de un mamífero infectado, donde ingiere tripomastigotes sanguíneos. Una vez dentro del insecto, los tripomastigotes se transforman en epimastigotes y se multiplican en la luz del intestino donde se unen a la membrana perimicrovellosa, proceso que involucra la participación de glicoconjugados de superficie de las membranas, así como a los glicoinositolfosfolípidos (GIPSS) del parásito. En el transcurso de 15 a 30 días, los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos en la ampolla rectal, salen junto con las heces y al tener contacto con el vertebrado, pueden atravesar la piel, mucosas o ingresar por el sitio de picadura. Dentro del mamífero, los tripomastigotes se internalizan en las células nucleadas, formando una vacuola parasitófora. En el ambiente ácido de la vacuola, el parásito secreta la proteína lítica TcTox, que junto con la actividad de la trans-sialidasa del parásito, ocasionan la ruptura de la vacuola. Una vez libre en el citoplasma, los tripomastigotes se transforman en amastigotes, que se multiplican por fisión binaria longitudinal y después de nueve ciclos de división, se diferencian en tripomastigotes sanguíneos, que lisan la célula huésped y se diseminan a través

del torrente circulatorio, donde pueden alcanzar nuevas células o ser ingeridos por otro artrópodo transmisor (UNAM/SS, 2006; Lima et al., 2010; Souza, 2010).

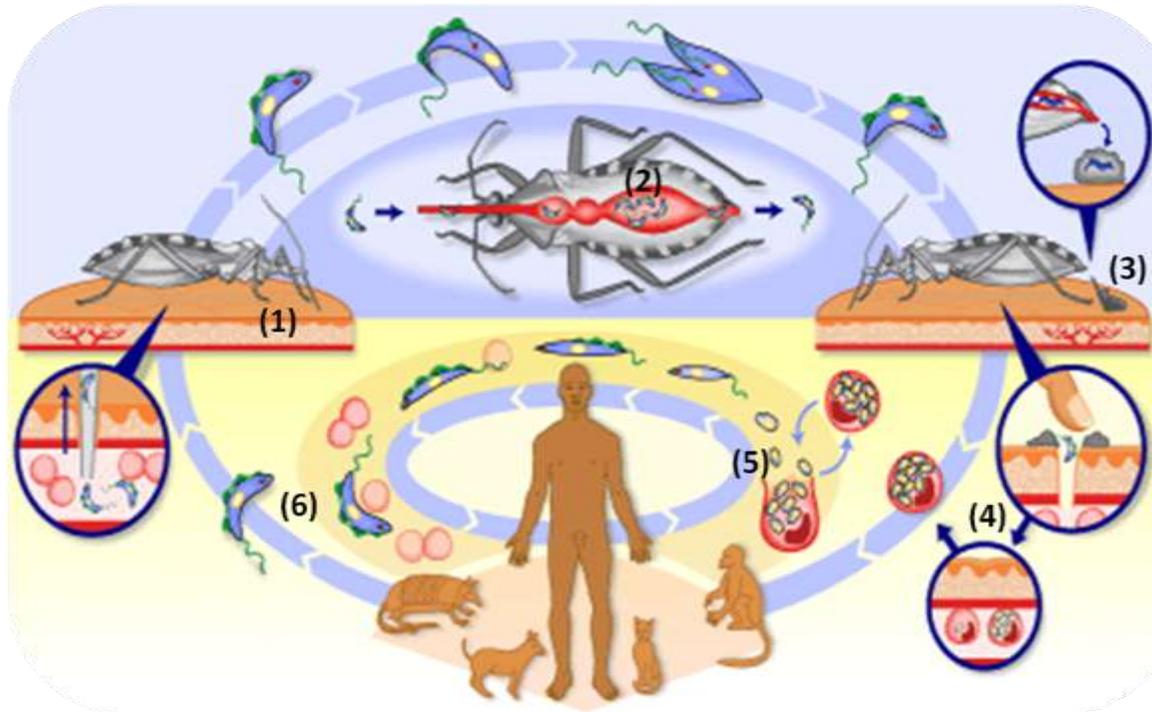


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el vector al alimentarse de mamíferos infectados (1). Los parásitos se transforman en epimastigotes y se multiplican en el intestino del invertebrado (2). En la ampolla rectal, los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos, que salen junto con las heces del vector y al estar en contacto con el vertebrado, pueden atravesar la piel, mucosas o ingresar por el sitio de picadura (3). Dentro del mamífero, los tripomastigotes invaden las células nucleadas, donde se transforman en amastigotes (4). Los amastigotes se multiplican y después de varios ciclos, se diferencian en tripomastigotes sanguíneos, lisan la célula huésped (5) y se diseminan en el organismo a través del torrente circulatorio, por el cual pueden alcanzar nuevas células o ser ingeridos por otro artrópodo transmisor (6) (UNAM/SS, 2006; Guzmán-Marín et al., 1999). Imagen tomada de: <http://www.who.int/tdr/diseases/Chagas/lifecycle.htm>

2.3. VECTOR

2.3.1. Clasificación taxonómica (Schofield, 1994)

Reino Animalia
Phylum Arthropoda
Clase Insecta
Orden Hemiptera
Familia Reduviidae
Subfamilia Triatominae

2.3.2. Biología del vector

T. cruzi es transmitido de forma natural a los seres humanos y a más de 150 especies de animales domésticos y silvestres, por los reduvidos hematófagos de la subfamilia Triatominae, que cuenta con 18 géneros y 138 especies reportadas.

Los triatominos al igual que todos los hemípteros, son hemimetábolos. Su desarrollo contempla las fases de huevo, 5 estadios ninfales y adulto. Los estadios ninfales se diferencian del adulto en que carecen de alas y son sexualmente inmaduros. El tamaño del adulto varía dependiendo de la especie en un rango de 5 a 45 mm. Son de origen silvestre; la invasión del hábitat de estos insectos por el ser humano ha favorecido la adaptación de algunas especies a las áreas donde el hombre realiza sus actividades. A pesar de que más de 130 especies han sido identificadas, no todos son vectores competentes de *T. cruzi*. Su eficacia como transmisores depende de diversos factores como son: grado de adaptación al domicilio humano, preferencias alimenticias, metaciclogenia y tiempo de defecación después de la alimentación (UNAM-SSA, 2006).

México tiene una gran diversidad de triatominos, con 32 especies transmisoras de *T. cruzi* reportadas, divididas en ocho géneros: *Triatoma*, *Meccus*, *Panstrongylus*, *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma* y *Rhodnius* (Salazar et al., 2010).

En la incidencia por transmisión vectorial en México, se estima que las especies del complejo phyllosoma (que incluye a las especies *Triatoma longipennis*, *T. picturata*, *T. mazzottii*, *T. phyllosoma* y *T. mexicana*) son responsables del 67%, *T. barberi* del 3%, *Triatoma dimidiata* del 21%, *T. gerstaeckeri* del 7% y el resto de las especies de 2% (Ramsey et al., 2003).

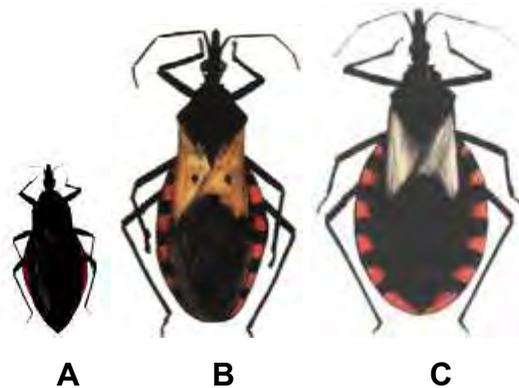


Figura 3. Algunos triatominos transmisores de *T. cruzi* en México:
A) *Triatoma barberi* B) *Triatoma dimidiata* C) *Meccus pallidipennis*
(Cortesía: Laboratorio de Biología de Parásitos, Fac. de Medicina, UNAM)

2.4. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN Y DE INFECCIÓN

La infección por *T. cruzi* en el humano puede ser adquirida por diversos mecanismos, el más importante en salud pública es la forma natural por las heces del triatomino infectado; sin embargo, el parásito también puede ser transmitido por otros mecanismos como: transfusión de sangre o sus componentes, trasplante de órganos o médula ósea (Rassi et al., 2010), transmisión vertical (Chagas connatal), que ocurre por vía transplacentaria, neonatal o por ingestión de leche materna. También ocurren brotes de la enfermedad de Chagas aguda debido a la transmisión por ingestión de alimentos o bebidas contaminadas con materia fecal de triatominos, ingesta de artrópodos infectados o consumo de carne cruda de reservorios o alimentos contaminados con secreciones de marsupiales

infectados (Wendel, 1992; Manoel-Caetano y Silva, 2007). Finalmente, la infección por accidentes de laboratorio también ha sido documentada. (OMS, 2000).

2.5. EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Chagas afecta de 8 a 12 millones de personas, se concentra principalmente en las áreas rurales y urbanas más pobres de América Latina, representando uno de los problemas de salud más serios en la región, donde más de 100 millones de personas están en riesgo de contraer la infección (OPS/OMS, 2006; Manoel-Caetano y Silva, 2007).

En los últimos 25 años se han implementado algunos programas para el control de la transmisión vectorial, como son la Iniciativa del Cono Sur, la Iniciativa de los países Andinos, la Iniciativa Centroamericana y la Iniciativa de los países Amazónicos. Como resultado de los programas mencionados, la transmisión por el vector *Triatoma infestans* ha sido erradicada en Uruguay (1997), Chile (1999), Brasil (2006) y en Guatemala (2009) (Lescure et al., 2010). Estos programas, aunados al tamizaje en los bancos de sangre, han reducido la carga de la enfermedad de Chagas en América Latina (Rassi et al., 2010).

La enfermedad de Chagas originalmente se encontraba confinada a las áreas rurales donde ocurre la transmisión a través del vector; sin embargo, actualmente la transmisión se ha extendido a países en los que la enfermedad no es endémica. La migración de personas infectadas plantea un problema de salud pública, incluso, en países, como Estados Unidos, Canadá y la Unión Europea, en los cuales se han reportado casos de transmisión de *T. cruzi* por productos sanguíneos y trasplante de órganos, lo que obliga a los países no endémicos a establecer medidas de prevención y control (Rassi et al., 2010; OMS, 2005). En la figura 4 se muestra el flujo migratorio de individuos de América Latina al resto del mundo.

Actualmente, en la mayoría de los países de América Latina se ha establecido por ley la obligatoriedad de que los bancos de sangre dispongan de sistemas de tamizaje para prevenir la transmisión de *T. cruzi* por medio de las transfusiones; sin embargo, algunos países aún no decretan la obligatoriedad para el diagnóstico y tamizaje a nivel nacional (OMS, 2005).

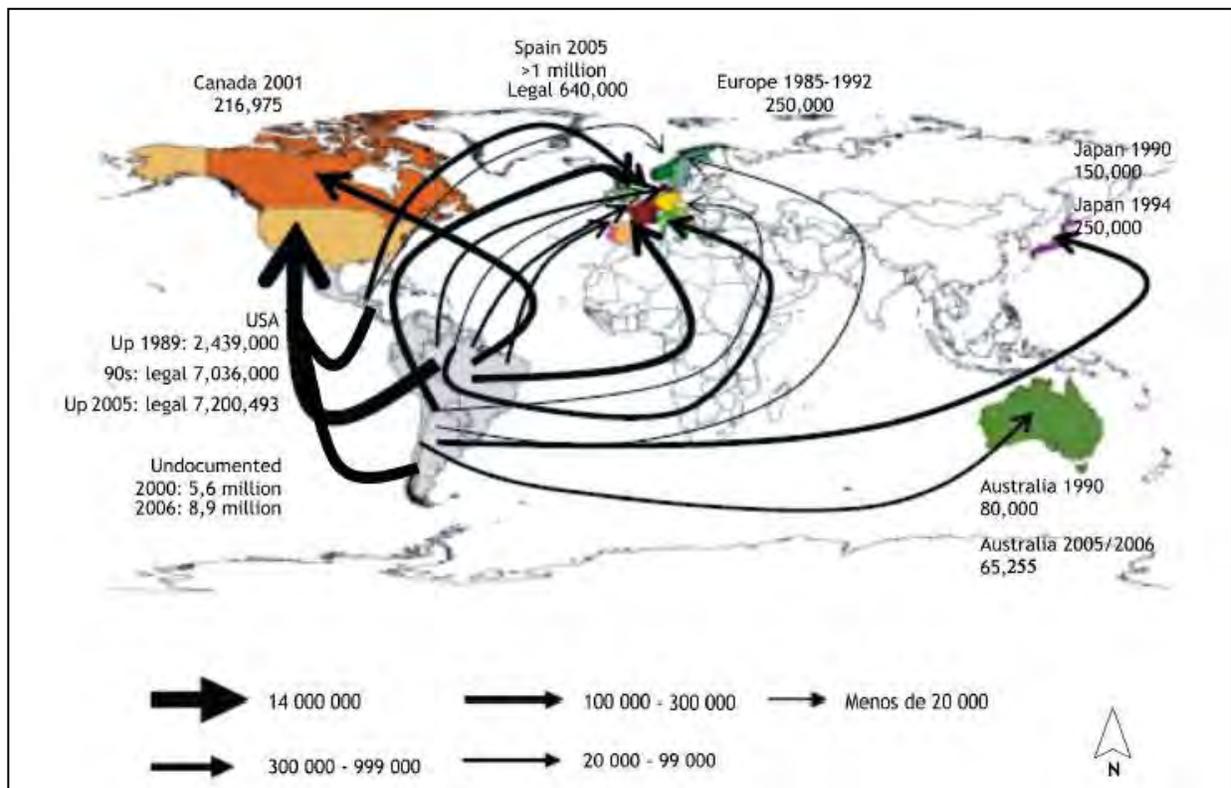


Figura 4. Flujo migratorio desde América Latina. El grosor de las flechas indican la cantidad de migrantes desde América Latina, donde la enfermedad de Chagas es endémica. Las cifras indican el número de inmigrantes calculado en cada país, mientras que la población infectada con *T. cruzi* se ha estimado con base en la prevalencia de la infección en el país de procedencia, y corresponde de 1067 casos en Australia (2005-2006), 1218 casos en Canadá (2001), 6823 casos en España (2005), de 38 777 a 339 954 casos de inmigrantes legales en Estados Unidos (1981-2005) y de 33 193 a 336 097 casos de inmigrantes ilegales en Estados Unidos (2000). Tomado de Schmunis, 2007.

2.6. CUADRO CLÍNICO

En la evolución de la enfermedad de Chagas se han descrito tres fases: aguda, crónica asintomática (indeterminada) y crónica sintomática.

La fase aguda comienza cuando *T. cruzi* entra en el organismo humano. En el caso particular de transmisión por el vector puede observarse una reacción local en el portal de entrada del parásito que produce malestar general, en ocasiones se observa en la piel (chagoma) o vía la membrana mucosa ocular (signo de Romaña) (Fig. 5) (OMS, 2002; Rassi et al., 2010). Esta fase es usualmente asintomática (solo 1-2% de los individuos presentan síntomas). Cuando los síntomas ocurren incluyen: fiebre, crecimiento de nódulos linfáticos, hepatomegalia, esplenomegalia, seguido de vómito, diarrea y anorexia. Las manifestaciones clínicas declinan después de 4-8 semanas (OMS, 2000).

Aproximadamente 60- 70% de las personas infectadas nunca desarrollarán la enfermedad. Estos pacientes tienen la forma crónica asintomática o indeterminada de la enfermedad de Chagas, la que se caracteriza por: examen serológico positivo y/o demostración parasitológica, electrocardiograma (ECG) normal y examen radiológico normal (Teixeira, 2006).

El resto de los pacientes (30-40%) subsecuentemente desarrollarán la forma crónica sintomática (Fig. 6), principalmente con manifestaciones cardiacas (Fig. 6-A), digestivas (Fig. 6-B,C) o cardiodigestivas, que ocurren usualmente 10-30 años después de la infección inicial (Rassi et al., 2010).



Figura 5. Signo de Romaña. Cuando la entrada del parásito ocurre por la mucosa ocular, en ocasiones se puede observar el edema bupalpebral unilateral de la fase aguda de la enfermedad de Chagas. (Cortesía: Laboratorio de Biología de Parásitos, Fac. Medicina, UNAM).



A



B



C

Figura 6. En la fase crónica sintomática de la enfermedad de Chagas las complicaciones son principalmente cardíacas y digestivas. En la imagen se muestra: A) Miocarditis, B) Megaesófago y C) Megacolon. (Cortesía: Dra. Paz María Salazar Schettino).

2.7. PATOGÉNESIS

Se han propuesto dos teorías para explicar la patogénesis de las lesiones en la enfermedad de Chagas:

2.7.1. Teoría de la Persistencia parasitaria

Esta hipótesis surge como un mecanismo que explica el daño tisular crónico al demostrar material genético del parásito en tejidos de animales infectados (Gutiérrez et al., 2009). La persistencia parasitaria y compuestos derivados de éste en el humano puede llevar a la ruptura mecánica de las células del hospedero parasitadas y la subsecuente inflamación (Teixeira et al., 2006).

2.7.2. Teoría de la Autoinmunidad

La teoría de la autoinmunidad deriva de la gran respuesta inflamatoria encontrada en estados avanzados de la enfermedad, aún en ausencia de parásitos (Gutiérrez, 2009). Así también, por la presencia de anticuerpos y células autorreactivas, y mimetismo molecular entre componentes del hospedero y del parásito (Dutra et al., 2005).

Las dos teorías no son mutuamente exclusivas y en particular, el perfil clínico de cada individuo es el resultado de un conjunto de interacciones complejas, entre las cuales se encuentran el fondo genético del hospedero, los factores ambientales y sociales y la composición genética del parásito, todo lo cual se complica en las infecciones mixtas y las re-infecciones.

2.8. DIAGNÓSTICO

La finalidad del diagnóstico es la detección de individuos infectados, lo cual permite establecer medidas terapéuticas y desde el punto de vista epidemiológico, el monitoreo de programas sanitarios para la detección, vigilancia y control del padecimiento (UNAM-SSA, 2006). Varios métodos han sido de utilidad en el diagnóstico de esta enfermedad.

2.8.1. Métodos parasitológicos

Estos métodos están basados en la detección del parásito completo y son de utilidad en la fase aguda de la enfermedad de Chagas, cuando la parasitemia es elevada y constante. Los más empleados son; examen directo, gota gruesa y frote sanguíneo, los cuales presentan una sensibilidad de 50% durante esta fase. Adicionalmente, se pueden utilizar métodos de concentración como el Strout y microhematocrito con lo que la sensibilidad puede aumentar hasta un 95% (UNAM-SSA, 2006).

2.8.2. Métodos inmunológicos

Durante la fase crónica (sintomática y asintomática) la parasitemia suele ser baja e incluso indetectable, por lo que la herramienta que permite demostrar la infección por este parásito es, principalmente, la detección de anticuerpos anti- *T. cruzi* específicos (Flores- Chávez et al., 2010).

Para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, la OPS/OMS, define para la confirmación del diagnóstico la demostración de resultados concordantes de al menos dos técnicas inmunológicas con principios distintos y recomienda especialmente el uso de las siguientes pruebas: inmunoensayo enzimático (ELISA indirecta) la cual detectan concentraciones muy bajas de anticuerpos y se consideran de más alta sensibilidad, además de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la hemaglutinación indirecta (HAI) de reactividad intermedia (OMS, 2002).

Una variedad de antígenos recombinantes se han propuesto para optimizar el tamizaje en la enfermedad de Chagas. Sin embargo, la variación en sensibilidad, especificidad, preparación antigénica y estandarización de los reactivos y procedimientos reportados por varios laboratorios da un porcentaje considerable de resultados insatisfactorios que requieren ser confirmados por otros métodos (Gomes et al., 2004). Estos antígenos presentan una alta especificidad, pero se recomienda que se utilicen en paralelo con pruebas que empleen antígenos crudos para evitar perder sensibilidad (Da Silveira y cols., 2001).

2.8.3. Métodos de diagnóstico molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la herramienta más usada como método de diagnóstico molecular para detectar la presencia del parásito, con la ventaja de que aún cuando se encuentre en pequeñas cantidades, el ADN del parásito se puede amplificar. Estos ensayos han utilizado gran variedad de iniciadores para amplificar diversos genes: desde el ADN del cinetoplasto, fragmentos de genes nucleares, como secuencias nucleares repetitivas, una secuencia que codifica a una proteína flagelar y combinaciones de secuencias en PCR multiplex. Esta metodología ha resultado efectiva en la detección de casos humanos agudos y crónicos, así como para determinar la infección de vectores. Sin embargo, las dificultades para establecer procedimientos estándares y asegurar la sensibilidad del diagnóstico parasitológico con PCR han propiciado el uso generalizado del diagnóstico serológico para detectar la infección humana (López-Ordóñez, et al., 2009).

2.9. TRATAMIENTO

Dos medicamentos han sido utilizados para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas: un nitrofurano, el Nifurtimox (Nfx) y un nitroimidazol, el Benznidazol (Bz).

El uso de estos medicamentos en la fase aguda de la enfermedad es ampliamente aceptada, ya que la efectividad de estos medicamentos es mejor para las formas extracelulares de *T. cruzi* que en las formas intracelulares del parásito (Castro et al., 2006). Ambos medicamentos tienen efectos secundarios que incluyen anorexia, pérdida de peso, náusea, vómito, excitación nerviosa, insomnio, depresión, convulsiones, vértigo desequilibrado, desorientación, olvido, parestesia, adinamia, fenómeno acústico e intolerancia al alcohol (Castro et al., 2006).

La dosis recomendada de Benznidazol es de 5-10 mg/kg/día y la de Nifurtimox 15 mg/kg/día, en una duración de 60 días (Rassi et al., 2010).

3. ANTECEDENTES

3.1. WESTERN BLOT EN EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *T. cruzi*

El Western blot (Wb), también conocido como inmunoblot, es un procedimiento descrito por Towbin et al., en 1979 para transferir las proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida, a una membrana adsorbente. Las proteínas transferidas representan una réplica exacta del gel y es el primer paso para una gran variedad de experimentos. El empleo subsecuente de pruebas con anticuerpos dirigidos contra las proteínas unidas a la nitrocelulosa ha revolucionado el campo de la inmunología. El Western blot ofrece las siguientes ventajas específicas: (a) la membrana es fácil de manipular, (b) las proteínas inmovilizadas en la membrana son accesibles a diferentes ligandos, (c) sólo una pequeña cantidad de reactivos se requieren para el análisis de la transferencia, (d) el almacenamiento de la membrana con la proteína unida puede ser por periodos largos de tiempo y (e) la misma proteína transferida puede ser usada para múltiples análisis (Kurien y Scofield, 2005).

El Wb ha sido utilizado para detectar anticuerpos específicos contra *T. cruzi* presentes en el suero de pacientes infectados. Esta técnica ha sido empleada por diversos grupos de investigación como prueba confirmatoria, especialmente en casos dudosos, por lo que el reto ha sido identificar antígenos de diagnóstico específicos, como a continuación se menciona:

O'Daly y cols., en 1994, encuentran que el extracto total de la cepa Y, revelado con sueros chagásicos reconoce 18-20 bandas, siendo los componentes de 42 y 50 kDa los más reconocidos con 100 y 64% de frecuencia, respectivamente. El patrón de bandeo no se repitió en dos sueros. Mientras que, al utilizar proteínas de superficie de la misma cepa, se observan cinco bandas de 115, 94, 88, 85 y 70 kDa, siendo las de 85 y 70 kDa las más frecuentes. En 1996, Umezawa y cols., utilizaron antígenos de excreción-secreción de tripomastigotes (TESA) de la cepa Y de *T. cruzi* en el Western blot (TESA blot), para evaluar la

técnica en las fases aguda y crónica de la enfermedad, así como en la forma congénita; los antígenos de 130-200 kDa fueron reconocidos por los sueros de pacientes infectados, con la banda de 150-160 kDa altamente reactiva por los sueros de pacientes crónicos y el criterio de positividad utilizado fue la reactividad con estos componentes. En otro estudio, utilizando un extracto semipurificado de la cepa Y, se realizó Wb con sueros de pacientes chagásicos, sueros de pacientes sanos, sueros de pacientes con resultados discordantes y sueros de pacientes con patologías distintas, los resultados reportaron una sensibilidad de 86.6% y una especificidad de 100%, considerando una reacción positiva la presencia de tres bandas de un grupo de siete (14, 19, 27, 30, 34, 37 and 75 kDa). Los autores proponen al Wb como un buen método de confirmación de la enfermedad de Chagas (Reiche y cols., 1998). De Lima y cols. (2001), utilizaron extractos de epimastigotes, tripomastigotes metacíclicos y amastigotes de la cepa EP, que al revelarse con sueros de pacientes chagásicos, identificaron cinco antígenos inmunodominantes en epimastigotes (66/64, 60/57, 53/51, 50/48 y 47/57 kDa.), tres en los metacíclicos (66, 62/58 y 53/51) y cinco en amastigotes (66, 60, 58, 53/51 y 47/45). En el 2006, Berrizbeitia y cols., utilizaron antígenos TESA, purificados por cromatografía de afinidad de las cepas Tulahuen y Brazil. En el resultado de Wb, en ambas cepas se reconocieron las bandas de 170, 120, 85 y 60 kDa, detectadas con sueros de pacientes chagásicos.

En México, también se han realizado distintos estudios serológicos empleando Wb para la identificación de antígenos de *T. cruzi* de importancia diagnóstica, utilizando extractos de cepas aisladas en México y sueros de pacientes mexicanos.

Monteón y cols., en 1993 utilizaron extractos proteicos preparados con epimastigotes de cuatro distintos aislados mexicanos de *T. cruzi* (Agridina, Fidelfa, Ninoa y Cocula) que fue evaluado en el Wb con sueros de pacientes chagásicos crónicos, con reconocimiento de las bandas de pesos moleculares 81 kDa, 54 kDa, 42 kDa, y 26 kDa. En 1999, Bucio y colaboradores caracterizaron extractos

de epimastigotes, tripomastigotes y esferomastigotes de las cepas Querétaro, Tequesquitengo y Yucatán, donde identificaron cinco componentes específicos de *T. cruzi*, de 74, 44, 31, 25 y 18 kDa, reconocidos por sueros de pacientes con la infección. Estos antígenos no presentaron reacción cruzada con *Leishmania mexicana*. En el 2001, Sánchez y cols. emplearon extractos de epimastigotes de las cepas Ninoa, Querétaro y Mor 10 e identificaron 12 proteínas reconocidas por sueros de pacientes chagásicos, siendo las de 30, 32, 40, 42, 65, 70 y 83 kDa los antígenos inmunodominantes y con buenos resultados en el diagnóstico de la infección en la fase crónica asintomática y sintomática de la enfermedad de Chagas. En el mismo año, Rangel-Flores y cols. identificaron dos proteínas de relevancia inmunogénica de 40 y 74 kDa en un extracto de epimastigotes de la cepa Ninoa, reconocidas por el 56 y 86% de sueros de pacientes infectados. Mientras que Lozano, en el 2009, mediante Wb y utilizando tripomastigotes de las cepas Ninoa y Querétaro (QRO) identificó 8 antígenos inmunodominantes compartidos por las dos cepas, de 110, 83, 74, 72, 70, 35, 32 y 26 kDa, además de 2 antígenos específicos para la cepa Ninoa, de 80 y 95 kDa y uno específico para la cepa QRO, de 34 kDa, los cuales fueron reconocidos por sueros de pacientes en fase crónica asintomática y sintomática de la enfermedad de Chagas.

3.2. ANTÍGENOS DE *T. cruzi*

T. cruzi es altamente inmunogénico y presenta una amplia oferta antigénica para el huésped vertebrado, con proteínas localizadas en su membrana celular, cuya presencia e inmunogenicidad pueden variar en los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito; sin embargo, ninguno de los estadios presenta antígenos fuertemente inmunodominantes y a diferencia de otros tripanosomátidos, *T. cruzi* no presenta mecanismos de variación antigénica (Bua et al., 1990; De Lima, 2001).

Dentro de las principales glicoproteínas que cubren la superficie de todos los estadios morfológicos de *T. cruzi*, se han identificado moléculas denominadas proteínas tipo mucina, que se encuentran unidas a glicosilfosfatidilinositol y ricas

en residuos Thr y Ser. Las mucinas en *T. cruzi* tienen un papel crucial en la protección del parásito, infectividad y modulación de la respuesta inmune del hospedero. Además, se ha observado la variación de las mucinas de superficie durante el ciclo de vida de *T. cruzi* (Buscaglia et al., 2004).

Otra de las principales proteínas de superficie de *T. cruzi* es la transialidasa, molécula que transfiere residuos de ácido siálico de los glicoconjugados del hospedero a las mucinas del parásito. Además, la transialidasa está involucrada en procesos de unión a receptores celulares de mamíferos, en mecanismos de invasión al hospedero y evasión de la respuesta inmune (Buscaglia et al., 2006).

3.3 DESARROLLO DE HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS

En *T. cruzi* se ha reportado la detección de antígenos circulantes libres o en complejos inmunes en muestras de suero y orina (Katzin et al., 1989; García-Escalante et al., 1996), por lo que la detección de antígenos de *T. cruzi* en fluidos corporales, haciendo uso de anticuerpos monoclonales o policlonales junto con la caracterización de antígenos de *T. cruzi* y el desarrollo de herramientas diagnósticas es un campo de interés (García-Escalante et al., 1996). Además, las aplicaciones de los anticuerpos policlonales en medicina humana o veterinaria representa una valiosa herramienta en la identificación, localización y purificación de moléculas biológicas de interés (Knudsen, 1985).

La obtención de anticuerpos policlonales específicos contra componentes inmunodominantes de *T. cruzi* puede permitir el desarrollo de pruebas diagnósticas.

3.3.1. Introducción a los anticuerpos policlonales

En una respuesta inmune típica se activan, proliferan y diferencian sólo las células B que poseen los receptores específicos para los determinantes

antigénicos, bajo la influencia de diversas citocinas producidas por células T cooperadoras. Parte de cada clon expandido madura hacia células plasmáticas, que producen inmunoglobulinas IgM, con baja afinidad. Durante la inmunización continua, parte de la población activa se convierte en células de memoria y producen inmunoglobulinas de tipo gamma, debido al cambio (“switch”) de clase y la mutación somática en los genes. Frente a un nuevo encuentro con el antígeno, se seleccionarán las células de memoria que confirieron una mayor afinidad al receptor; por lo tanto se activan subclones de la estirpe original que han sido favorecidos por las mutaciones ocurridas en las regiones V. La inmunización repetida actúa como ciclos progresivos de mutación somática de las células de memoria producidas por el inóculo anterior, con posterior selección de los subclones con receptores de mayor afinidad. La respuesta de anticuerpos frente a la inmunización con un antígeno complejo está formada por los subproductos de un número variable y siempre cambiante de clones de linfocitos B (respuesta policlonal) (Gavilondo-Coeley, 1995).

3.3.2. Producción de anticuerpos policlonales

Es difícil obtener anticuerpos específicos contra proteínas presentes en bajas cantidades, especialmente si se encuentran en mezclas complejas de proteínas; las principales razones son la baja cantidad de proteína disponible después de un proceso de purificación clásico y la baja pureza de éstas. Un método sencillo de inmunización consiste en la purificación de una proteína presente en un extracto crudo mediante electroforesis, corte del componente deseado y la inoculación en el animal (Boulard y Lecroisey, 1982); sin embargo, este método presenta algunos inconvenientes tanto en la purificación del componente antigénico, así como del daño tisular en los animales, atribuido a la presencia de SDS y acrilamida (Diano et al., 1998). Estos componentes pueden ser eliminados por electroelución de la muestra, sin embargo una gran cantidad de proteína se pierde en el proceso.

Otra alternativa de inmunización reportada en la literatura, consiste en transferir las proteínas separadas en el gel a una matriz de nitrocelulosa y escindir

de ahí el componente deseado. La nitrocelulosa con la proteína adherida es fácilmente disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO), para ser utilizada en la inmunización (Knudsen, 1985).

3.3.3. El conejo como modelo en la producción de anticuerpos policlonales

El conejo es una de las especies animales más utilizada para la producción de anticuerpos, debido a la conveniencia por su tamaño, fácil manipulación y sangrado, así como su tiempo de vida (5-8 años), que permite producir volúmenes de anticuerpos adecuados de alta titulación, gran afinidad y antisuero precipitante (Stills, 1991).

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia en salud pública que representa la enfermedad de Chagas en México, América Latina y actualmente en países no endémicos, su correcto diagnóstico resulta de gran valor. Las pruebas serológicas convencionales han sido ampliamente utilizadas para tamizaje con resultados de sensibilidad y especificidad variables por lo que se requiere optimizar pruebas confirmatorias con alta sensibilidad y especificidad, como señala la Organización Mundial de la Salud.

La técnica de Western-blot resulta una buena opción para la confirmación diagnóstica y permite identificar componentes inmunogénicos específicos de *T. cruzi* a partir del reconocimiento por sueros de pacientes infectados.

La obtención de anticuerpos contra componentes específicos resultaría una valiosa herramienta para el desarrollo de pruebas diagnósticas, así como en el estudio de la biología de *T. cruzi* y la interacción con sus hospederos.

5. HIPÓTESIS

Si a partir de un extracto antigénico de *T. cruzi* identificamos las principales proteínas inmunogénicas, la obtención de anticuerpos policlonales específicos contra éstas podrá ser de utilidad para detectar la infección por este parásito.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

A partir de un extracto antigénico del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi*, identificar las principales proteínas inmunogénicas y obtener anticuerpos policlonales específicos contra éstas.

6.2. Objetivos particulares

Identificar el patrón electroforético del extracto antigénico del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi*.

Discriminar de entre los diversos componentes aquellos que sean de utilidad diagnóstica en la infección por *T. cruzi*, mediante la técnica de Western blot.

Producir anticuerpos policlonales específicos contra algunos componentes en modelo de conejo.

7. METODOLOGÍA

7.1. Obtención del extracto parasitario

7.1.1. Parásitos

Se utilizó el aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi*, obtenido de *Triatoma pallidipennis* del estado de Morelos y que forma parte del cepario del Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

7.1.2. Expansión parasitaria

La expansión parasitaria se realizó en medio de cultivo Infusión de hígado y triptosa (LIT) suplementado al 5% con suero fetal bovino inactivado. Se realizaron pases semanales en medio LIT, incubados a 28°C durante todo el proceso. Para definir las fases de crecimiento, se realizó la cuantificación parasitaria cada cuatro días en cámara de Neubauer durante 19 días. La cosecha se realizó al inicio de la fase estacionaria de crecimiento.

7.1.3. Extracción antigénica

Para la obtención de los extractos antigénicos se siguió la siguiente metodología, descrita por Bucio en 1999:

- a) Cosecha, lavado y cuantificación de la masa parasitaria. Se realizaron 5 lavados con amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.2 (KCl 0.2 gr, KH₂PO₄ 0.2 gr, NaCl 8 g y Na₂HPO₄ 12H₂O 2.9 gr; para 1000 ml), se centrifugaron a 2500 g durante 20 min a 4°C; los sobrenadantes fueron desechados en cada paso.
- b) El concentrado parasitario se resuspendió en Tris HCl 50 mM pH 7.4 con CHAPS (3-[(3-colamidopropil) dimetil ammonio]-1-propansulfonato) 10 mM (Sigma).
- c) La lisis de los parásitos se realizó por sonicación mediante un procesador ultrasónico Vibra Cell- 7 pulsos de 1 min/ 40 watts, 70 de amplitud, y se centrifugó a 43 000 g.
- d) Se obtuvo la fracción soluble y se almacenó a -40°C hasta su uso.

7.1.4. Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas se realizó por el método del ácido bicinconínico, compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} previamente unidos a enlaces peptídicos en medio alcalino. Se empleó el reactivo comercial BCA Protein Assay Kit de Pierce. Se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina en un rango de 0 a 2000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, diluida en PBS pH 7.2. Tanto la curva patrón como las muestras se colocaron por triplicado en una microplaca de poliestireno de 96 pozos. La lectura de la densidad óptica se midió en un espectrofotómetro para microplaca con filtro de 580 nm y las concentraciones finales se calcularon por regresión lineal con base en los valores de densidad óptica obtenidos en la curva patrón de la Albúmina sérica bovina.

7.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

La separación por peso molecular de los componentes del extracto antigénico se realizó en condiciones reductoras por electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida con gel concentrador al 5% y gel separador con distintas concentraciones de poliacrilamida, que fueron de 7.5%, 10%, 12.5% y 15%, como se muestra en la tabla 1, agregando 50 μg de proteína del extracto proteico en cada carril, siguiendo en términos generales la metodología descrita por Laemmli en 1970, en un equipo de electroforesis Bio Rad® (Mini Protean III Cell) a una diferencia de potencial constante de 150 Volts por 60 min aproximadamente, con una fuente de poder Bio-Rad. Se usó amortiguador de corrimiento constituido por 0.025 M Trizma-base (Tris [hidroximetil] aminometano), 0.192 M glicina y dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 0.1%, pH 8.3. Las muestras fueron preparadas por separado en dilución 1:3 con un amortiguador comercial Bio Rad y β -mercaptoetanol y luego sometidas a ebullición en baño de agua por 5 minutos.

Se emplearon marcadores de peso molecular comerciales con rango de 10 a 250 kDa de Bio-Rad. Los geles obtenidos fueron teñidos con azul de Coomassie

Bio Rad durante 1 hora en agitación ligera y destañidos con agua destilada. Se seleccionó la concentración de poliacrilamida que permitiera la mejor separación de los componentes del extracto proteico.

Tabla 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Gel de separación					Gel concentrador	
[Gel]	7.5%	10%	12.5%	15%	5%	
Acrilamida/Bis (mL)	3.75	5	6.25	7.5	(μ L)	425
Agua (mL)	7.25	6	4.75	3.5	(mL)	2.275
Tris HCl 5M pH 8.8 (mL)	3.75	3.75	3.75	3.75	Tris HCl 1M pH 6.8 (μ L)	400
SDS 10% (μ L)	150	150	150	150	(μ L)	31.25

7.3. Obtención de pesos moleculares de los componentes del extracto proteico

Los pesos moleculares se obtuvieron mediante el análisis de un gel de poliacrilamida al 12.5%, con distintas cantidades del extracto proteico en cada carril, desde 5 μ g hasta 45 μ g, teñido con azul de Coomassie. Para el análisis se utilizó el software Quantity One de Bio Rad. Se seleccionó aquella concentración proteica en la cual las bandas del extracto proteico se observaran definidas.

7.4. Inmunoblotting (Western-blot)

Se siguió en términos generales los lineamientos descritos por Towbin en 1979. Después de realizar la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas del gel resultante a membranas de nitrocelulosa en un aparato Bio Rad (Semy-dry Transfer cell), a una diferencia de potencial constante de 15 volts durante 30 minutos. Una vez hecha la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con PBS pH 7.2/Tween 20 0.3%/leche semidescremada 5% durante 2 horas a temperatura ambiente (TA) en agitación ligera. Posteriormente se realizaron 3 lavados (PBS pH 7.2/Tween 20 0.3%) y se incubó el suero humano

control (+) en dilución 1:100, 1:200, 1:300 y 1:500, y el suero humano control (-) en dilución 1:100, a 4°C en agitación ligera durante toda la noche. Se realizaron 3 lavados y posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa (Invitrogen) en dilución 1:20000, durante 2 hrs en agitación ligera a TA. Se realizaron 5 lavados y la reacción se reveló agregando una solución de peróxido de hidrógeno y DAB (3,3' Diaminobenzidina) en PBS pH 7.2 y manteniéndola en oscuridad durante 15 minutos. La reacción se frenó con agua destilada. Las membranas fueron secadas y guardadas a temperatura ambiente. Se seleccionó la dilución de suero control (+) con reactividad apropiada para identificar los componentes inmunogénicos del extracto de *T. cruzi*, la cual se utilizó para los sueros humanos posteriores.

7.5. Sueros humanos

Se utilizaron 35 sueros positivos (+) y 35 sueros negativos (-) pertenecientes a la seroteca del Laboratorio de Biología de Parásitos, procedentes de diferentes áreas geográficas del país. Los sueros presentaron un serodiagnóstico concordante en pruebas realizadas por el Instituto “Dr. Mario Fatała Chabén” de Argentina (Centro de Referencia OPS/OMS) y por el Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM con las técnicas de ELISA, HAI, IFI y el reactivo comercial “CHAGATEK” ELISA.

Para evaluar la reacción inmunológica cruzada se utilizaron once sueros de pacientes con leishmaniasis, cinco con leishmaniasis cutánea localizada y seis con leishmaniasis cutánea diseminada, proporcionados por la Dra. Ingeborg Becker, del Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM.

7.6. Obtención de anticuerpos policlonales

7.6.1. Conejos

Se utilizaron 2 conejos hembra raza Nueva Zelanda, de 3 kg cada una, proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Medicina.

7.6.2. Elección de antígenos para la inmunización

Se eligieron dos de los principales componentes inmunodominantes del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi*, que corresponden a los componentes de 27 y 34 kDa, para el protocolo de inmunización. La selección de estos dos componentes se debe a que de los cuatro componentes con mayor reconocimiento por los sueros positivos, son los dos que mejor se observan en el Wb.

7.6.3. Preparación del inóculo

Se diseñó un protocolo de inmunización basado en la inoculación del antígeno unido en la membrana de nitrocelulosa (Knudsen,1985). Los márgenes de las membranas fueron revelados en Western blot con un suero humano positivo para identificar la posición de las bandas de interés (inmunodominantes), mientras que el resto de la membrana fue teñido con rojo de Ponceau. Las bandas se escindieron con ayuda de un bisturí y fueron diluidas en dimetil sulfóxido (DMSO). A esta solución, se agregó un volumen igual de adyuvante completo de Freund, para la primera inmunización y adyuvante incompleto en las inmunizaciones posteriores.

7.6.4. Inmunización y obtención de sueros de conejo

Los conejos Nueva Zelanda fueron inmunizados en 4 ocasiones a intervalos de 15 días vía subcutánea en 3 sitios distintos con el inóculo arriba descrito. La toma de sangre periférica se realizó por punción de la vena marginal de la oreja, siguiendo el mismo calendario que las inmunizaciones. La toma de sangre final se realizó por punción cardíaca y los conejos fueron sacrificados con anestésicos inhalables.

La sangre colectada se centrifugó a 1000 g durante 15 minutos y los sueros obtenidos se rotularon y guardaron a -40°C hasta su uso.

Como suero control (-) se utilizaron los sueros pre inmunes de cada conejo, mientras que el suero control (+) fue proporcionado por el Laboratorio de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina, UNAM y pertenece a un conejo inmunizado con parásitos completos del mismo aislado (ITRI/MX/1991/TQ).

El manejo de los conejos se apegó a las consideraciones éticas establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM- 062- ZOO- 1999.

7.7. Western blot de sueros de conejo

Se siguió el mismo procedimiento de electroforesis del extracto proteico, transferencia y bloqueo de sitios inespecíficos previamente descrito y se realizó el reto con los sueros de conejo, en dilución 1:100 y 1:200. Para revelar la unión Ag-Ac, se utilizó Proteína A unida a peroxidasa en dilución 1:5 000.

8. RESULTADOS

8.1. SDS-PAGE del extracto proteico

La separación de los componentes del extracto proteico en el gel de poliacrilamida al 7.5%, 10%, 12.5% y 15% se observa en la figura 7.

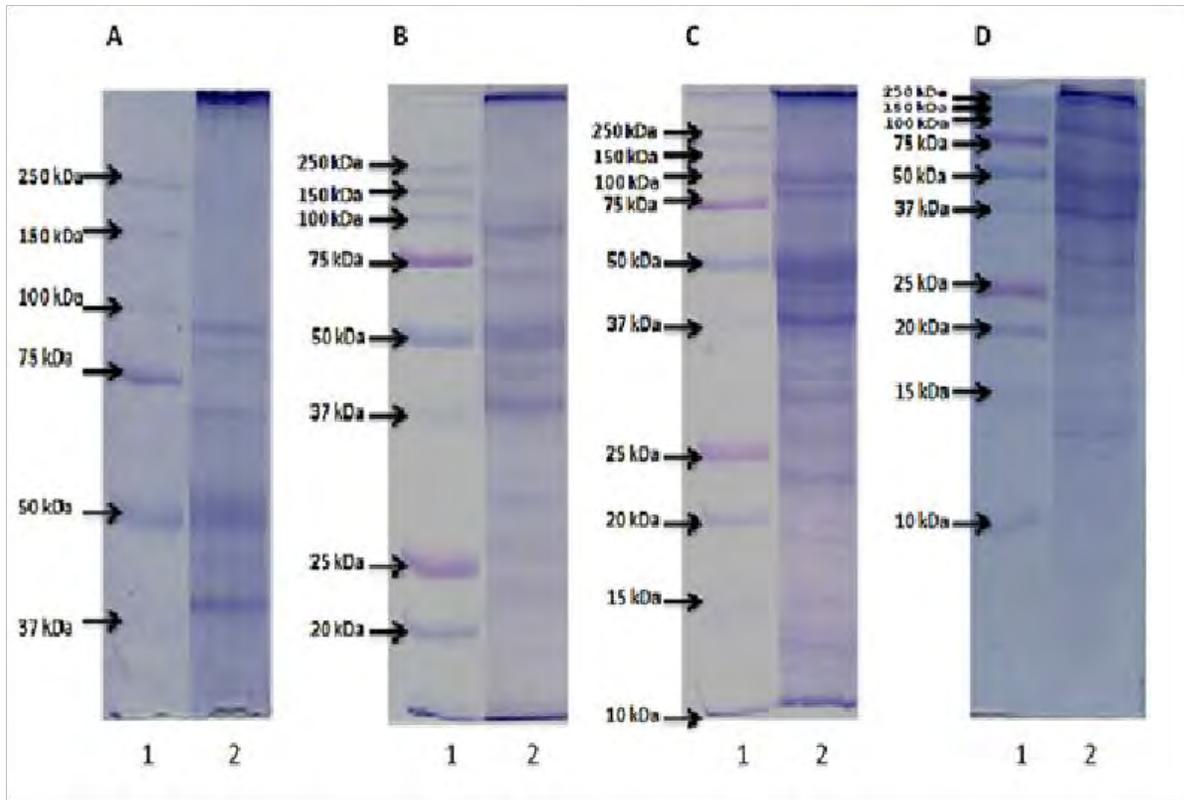


Figura 7. Separación de los componentes del extracto proteico del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi* en electroforesis en gel de poliacrilamida: A) al 7.5%, B) 10%, C) 12.5% y D) 15%, teñido con azul de Coomassie. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, mientras que el carril 2 al extracto proteico del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi*. Los marcadores de pesos moleculares se observan a la izquierda de cada gel.

Como se observa en la figura 7, el gel con concentración de poliacrilamida al 12.5% es el que presenta la mejor separación del marcador de peso molecular y del extracto proteico parasitario, ya que en los geles de menor concentración de acrilamida (7.5% y 10%, respectivamente) se pierden rápidamente los componentes de bajo peso molecular, mientras que en los geles de acrilamida al

15%, los marcadores de peso molecular y los componentes del extracto de *T. cruzi* no se separan lo suficiente a lo largo del gel.

Por lo anterior, el análisis del patrón electroforético del extracto proteico de *T. cruzi* (ITRI/MX/1991/TQ) se realizó en gel de poliacrilamida al 12.5%, el cual se muestra en la figura 8. La concentración en que las bandas proteicas se observan definidas es de 20 µg por carril.

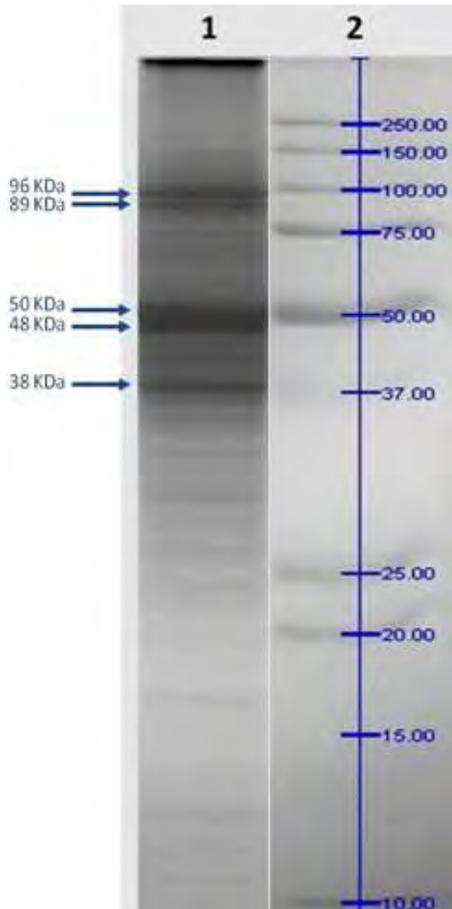


Figura 8. Análisis de los componentes proteicos del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi* por el software Quantity One (Bio Rad). Separación de los componentes mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5%, teñido con azul de Coomassie. El carril 1 corresponde a 20 µg del extracto proteico parasitario, mientras que el carril 2 corresponde al marcador de peso molecular. Las flechas en azul indican los pesos moleculares de las bandas más intensas.

Se registró un total de 33 bandas proteicas comprendidas en un rango de 10 a más de 250 kDa, donde destacaron las bandas de 48, 50, 38, 89 y 96 kDa.

En el patrón electroforético del extracto se observan diferencias en cuanto a la intensidad de las bandas detectadas, siendo las que más se observan las del rango de 38 a 100 kDa.

8.2. Western blot de sueros humanos

La reactividad en el Wb del suero humano control (+) en diferentes diluciones se observa en la figura 9.

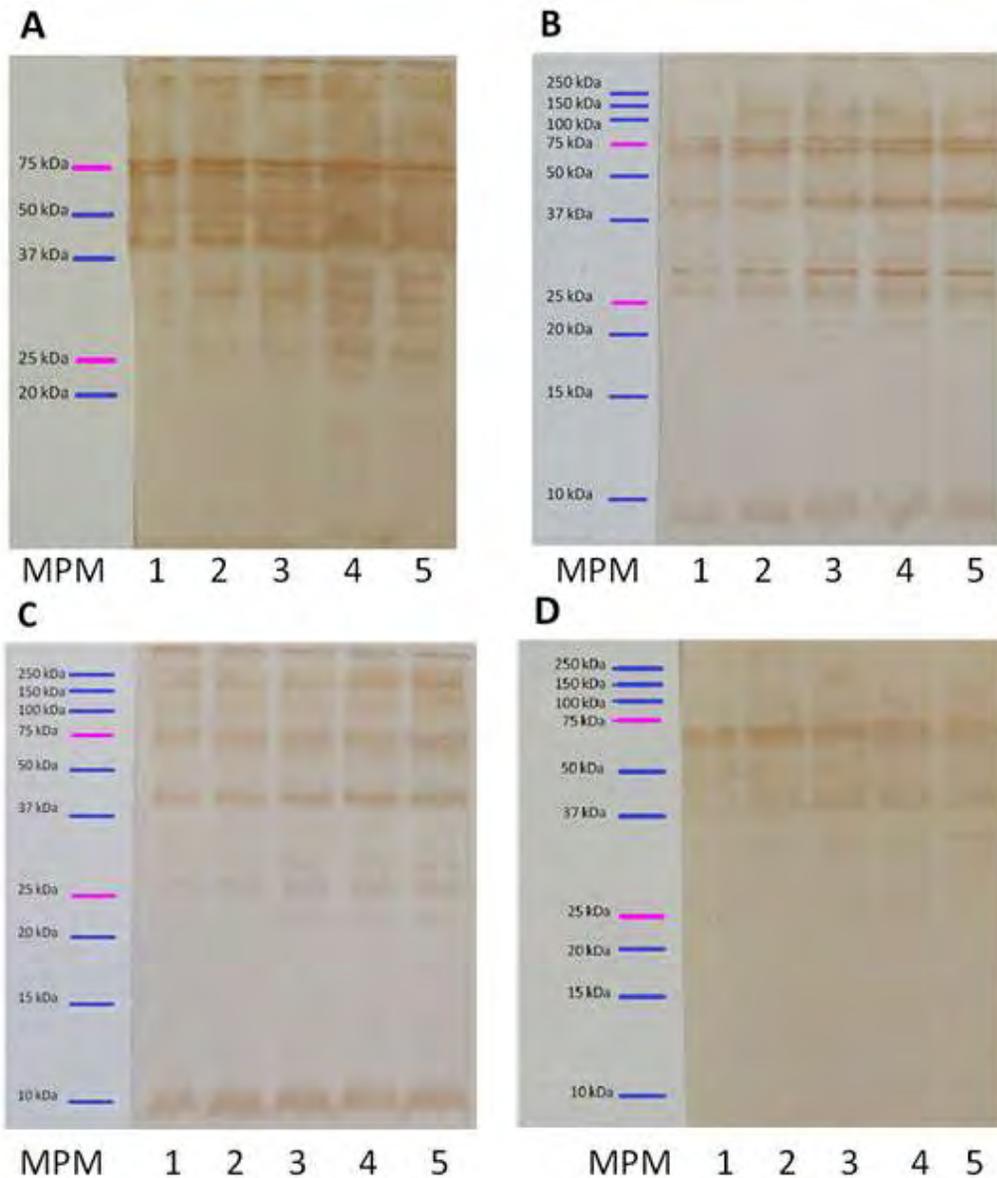


Figura 9. Western blot de los sueros humanos control (+). Suero control en dilución: A)1:100, B)1:200, C)1:300 y D)1:500. Los números indican las concentraciones proteicas por pozo donde: 1)5µg, 2)10 µg, 3)15 µg, 4)20 µg y 5)25 µg. Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de Sodio al 12.5%, del extracto proteico total de las formas epimastigotes del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi*. La prueba se reveló con un anticuerpo anti-IgG humana unida a peroxidasa. El cromógeno utilizado fue 3,3' Diaminobencidina (DAB), en PBS pH 7.2, en presencia de H₂O₂, MPM=Marcadores de peso molecular.

Reactividad de los 35 sueros de pacientes positivos en la prueba de Western blot (Figura 10).

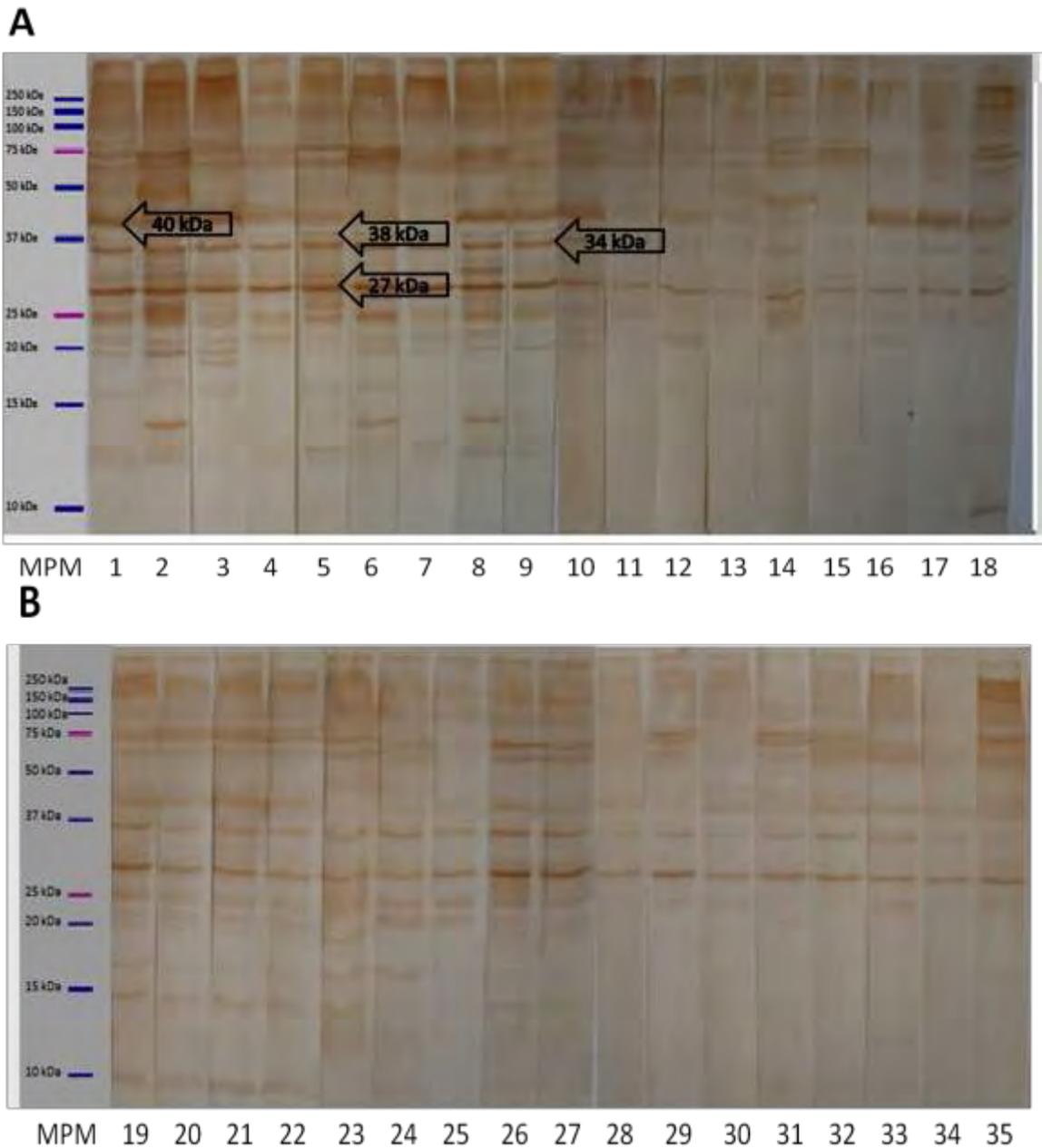


Figura 10. Western blot de los 35 sueros humanos positivos (numerados del 1-35). Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de Sodio al 12.5%, del extracto proteico total de las formas epimastigotes del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi*. La cantidad de proteína es de 20 µg/pozo, mientras que la dilución del suero es de 1:200. La prueba se reveló con un anticuerpo anti-IgG humana unida a peroxidasa. El cromógeno utilizado fue 3,3' Diaminobencidina (DAB), en PBS pH 7.2, en presencia de H₂O₂, MPM=Marcadores de peso molecular. Las flechas indican las principales bandas inmunogénicas.

Reactividad de los sueros de pacientes negativos en la prueba de Western blot (Figura 11).

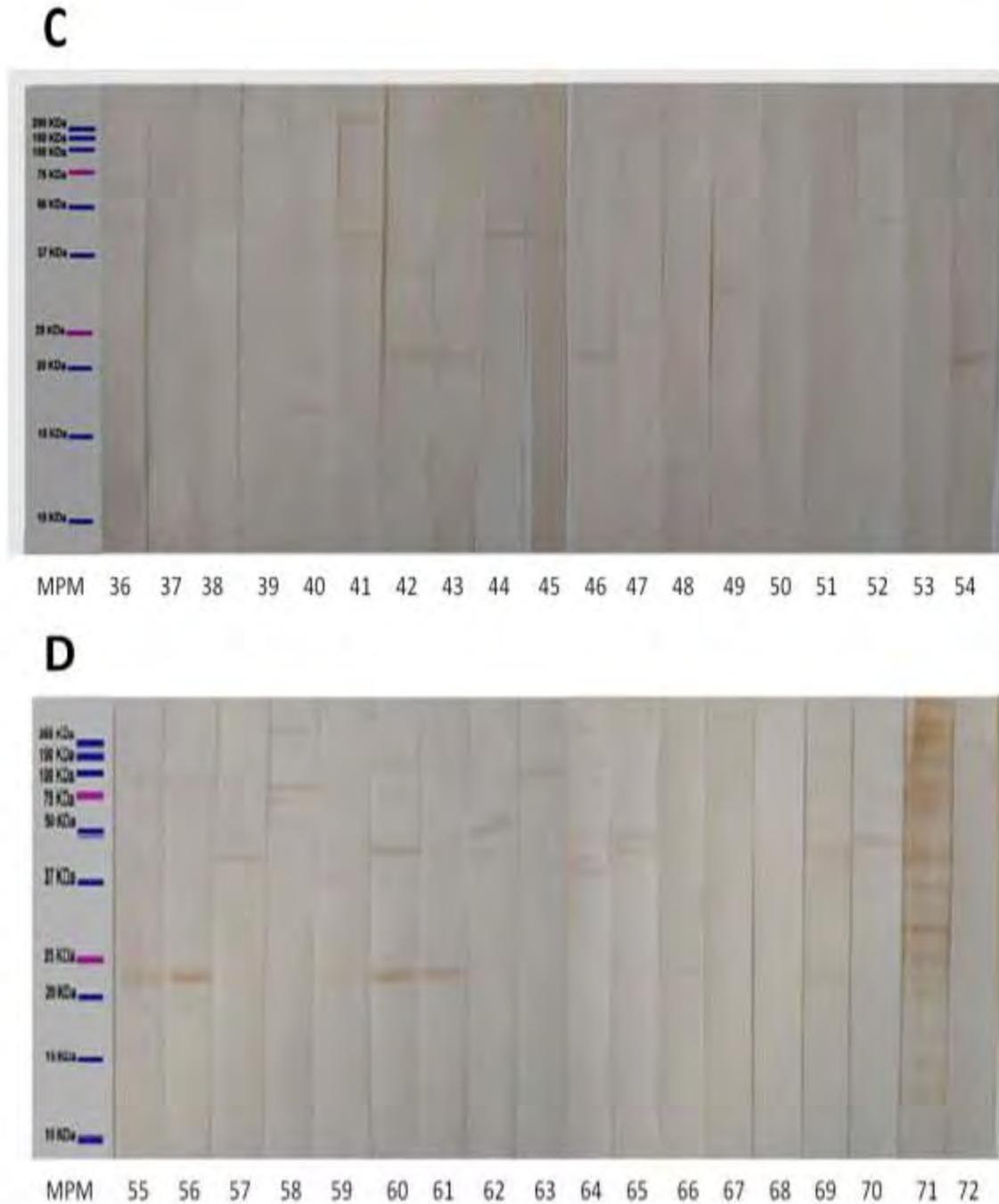


Figura 11. Western blot de sueros humanos negativos (C y D, sueros numerados 36-70) y sueros control positivo (suero 71) y control negativo (suero 72). Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de Sodio al 12.5%, del extracto proteico total de las formas epimastigotes del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi*. La cantidad de proteína es de 20 μ g/pozo, mientras que la dilución del suero es de 1:200. La prueba se reveló con un anticuerpo anti-IgG humana unida a peroxidasa. El cromógeno utilizado fue 3,3' Diaminobencidina (DAB), en PBS pH 7.2, en presencia de H₂O₂. MPM=Marcadores de peso molecular.

Reactividad de los sueros de pacientes con leishmaniasis en la prueba de Western blot (Figura 12).

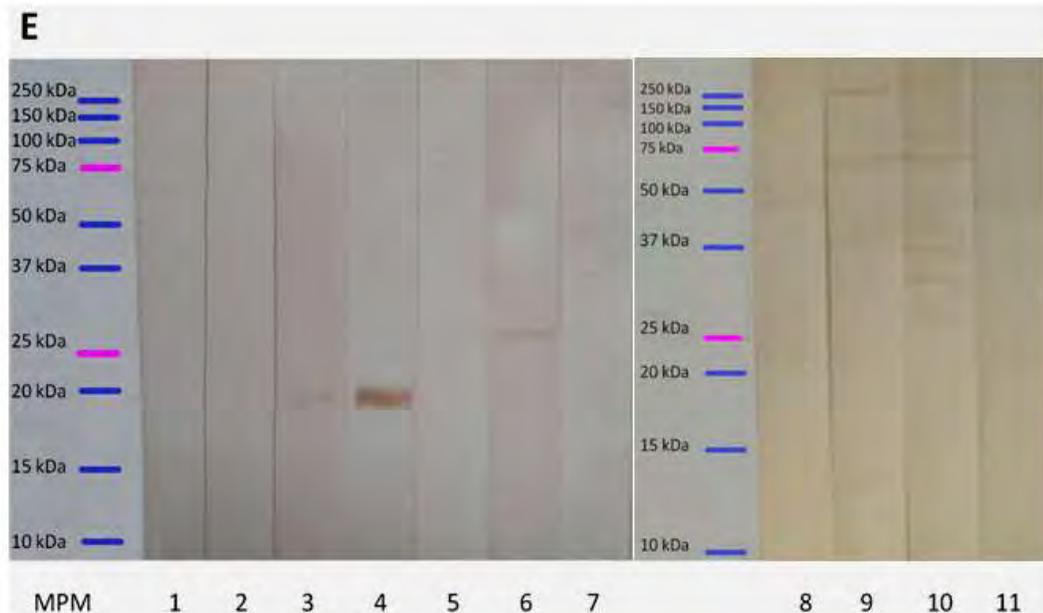


Figura 12. Western blot de sueros humanos con leishmaniasis (E, sueros numerados del 1-11). Los sueros de pacientes con Leishmaniasis cutánea localizada son los: 5,6,7,8 y 11, mientras que los de leishmaniasis cutánea diseminada con los de 1,2,3,4,9 y 11. Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de Sodio al 12.5%, del extracto proteico total de las formas epimastigotes del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi*. La cantidad de proteína es de 20 µg/pozo, mientras que la dilución del suero es de 1:200. La prueba se reveló con un anticuerpo anti-IgG humana unida a peroxidasa. El cromógeno utilizado fue 3,3' Diaminobencidina (DAB), en PBS pH 7.2, en presencia de H₂O₂. MPM=Marcadores de peso molecular.

8.3. Reactividad del Western blot de sueros humanos

La reactividad en la prueba de Western blot (Wb) contra las diversas bandas del extracto antigénico del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi* por el panel de sueros positivos se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Reactividad en el Western blot del extracto de *T. cruzi* (ITRI/MX/1991/TQ) por los 35 sueros de pacientes positivos a la infección. Las bandas que obtuvieron las frecuencias más altas se muestran en rojo.

Peso molecular	Frecuencia de cada banda	Porcentaje de cada banda (%)	Peso molecular	Frecuencia de cada banda	Porcentaje de cada banda (%)
250 kDa	26	74	34 kDa	35	100
192 kDa	1	3	31 kDa	1	3
166 kDa	1	3	30 KDa	4	11
140 kDa	28	80	29 KDa	1	3
128 kDa	12	34	28 kDa	17	49
100 kDa	2	6	27 KDa	35	100
95 kDa	2	6	26 kDa	22	63
90 kDa	2	6	25 kDa	28	80
89 kDa	1	3	24 kDa	1	3
84 kDa	20	57	23 kDa	4	11
75 kDa	32	91	22 kDa	14	40
71 kDa	10	29	21 kDa	17	49
68 kDa	28	80	20 kDa	17	49
62 kDa	4	11	19 kDa	3	9
56 kDa	2	6	18 kDa	13	37
50 kDa	1	3	17 kDa	1	3
46 kDa	2	6	15 kDa	12	34
44 kDa	1	3	14 kDa	5	14
43 kDa	9	26	13 kDa	2	6
42 kDa	2	6	12 kDa	5	14
40 kDa	34	97	11 kDa	7	20
38 kDa	35	100	10 kDa	1	3

En el Western blot, la dilución del pool de sueros positivos (suero control) que presentó el mayor reconocimiento de los antígenos del extracto parasitario fue la de 1:200 (Fig. 9, B). En prueba de Wb, los sueros de pacientes positivos a la infección por *T. cruzi* reconocen en promedio 15 componentes y presenta un patrón de reactividad muy diverso, que abarca un amplio rango de pesos moleculares desde 10 a más de 250 kDa. La intensidad y frecuencia de cada banda proteica individual es variable; sin embargo, se observa un patrón de

bandeo compartido en todos los sueros positivos (Fig. 10). En estos sueros, los componentes de pesos moleculares de 250, 140, 84, 75, 68, 40, 38, 34, 27, 26 y 25 kDa presentan una frecuencia de reconocimiento superior al 50%, dentro de los cuales, los polipéptidos de 27, 34, 38 y 40 kDa, tuvieron las frecuencias más altas, con 100, 100, 100 y 97%, respectivamente (Tabla 2), por lo que constituyen los componentes inmunogénicos más relevantes del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi*.

En el panel de sueros negativos (Fig. 11, tiras 36-70), se observó una reactividad inespecífica contra algunos componentes (5 componentes por suero en promedio) de *T. cruzi*, destacando los de 95, 73, 39 y 21 kDa, con frecuencias de reconocimiento de 37, 37, 37 y 40%, respectivamente.

Los sueros de pacientes con leishmaniasis tuvieron reacción cruzada con algunos componentes del extracto de *T. cruzi* (Fig.12). El 90% de estos sueros fue reactivo a algún componente, de los cuales, 40% reconoció más de cinco antígenos, el 30% dos antígenos y el 30% restante un solo antígeno.

Se identificaron un total de 24 bandas antigénicas que reaccionaron con los sueros de pacientes con leishmaniasis. De las proteínas que presentaron reacción cruzada, las de 20, 22, 24, 25, 26, 28, 31, 44, 46 y 100 kDa presentaron los mismos pesos moleculares reconocidos por sueros de pacientes chagásicos.

8.4. Establecimiento de los criterios de positividad para el Western blot

Basándonos en los resultados obtenidos en el Western blot de los 35 sueros de los pacientes positivos, 35 sueros de pacientes negativos y los 11 sueros de pacientes con leishmaniasis, se estableció que un suero será considerado positivo cuando reconozca al menos tres componentes de los que presentaron una frecuencia de reconocimiento superior al 50% por los sueros de pacientes positivos, que corresponden a los de 250, 140, 84, 75, 68, 40, 38, 34, 27, 26 y 25 kDa, exceptuando las de 25 y 26 kDa, ya que presentaron cruce inmunológico con sueros de pacientes con infección de *Leishmania spp.*

8.5. Anticuerpos policlonales

8.5.1. Western blot de sueros de conejo

Se realizó la prueba de Western blot con el extracto del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi*, utilizando los sueros obtenidos de los conejos para monitorear la producción de anticuerpos contra el componente inoculado. La reactividad serológica de los sueros policlonales de conejo contra los componentes de *T. cruzi* se observa en la Figura 13. La dilución de suero es de 1:100

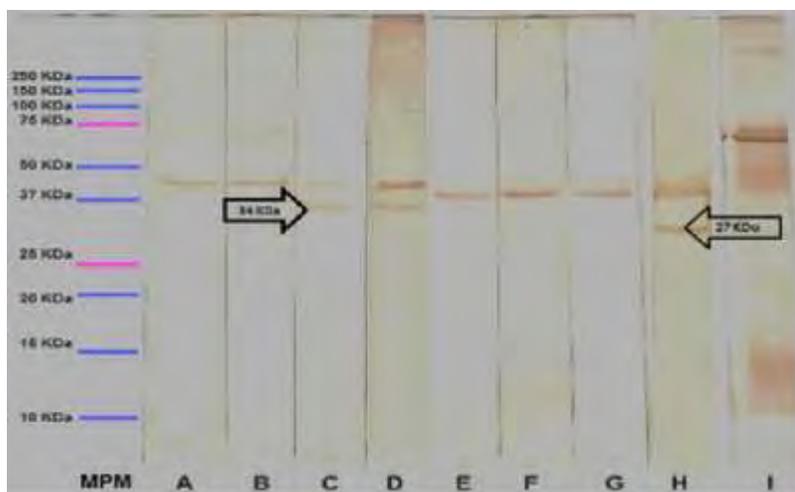


Figura 13. Western blot de los sueros de los conejos. Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de Sodio al 12.5%, del extracto proteico de las formas de epimastigotes del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi*. Sueros del conejo 1 (A-D), del conejo 2 (E-H) y Control positivo (I). Las tiras A y E son los sueros preinmunes de cada conejo, mientras que B,C,y D, así como F, G y H son los sueros obtenidos cada 15 días para monitorear la producción de anticuerpos contra el componente inoculado. La prueba se reveló con Proteína A unida a peroxidasa. Como cromógeno se utilizó 3,3' Diaminobencidina (DAB), en PBS pH 7.2, en presencia de H₂O₂. MPM=Marcador de peso molecular. Las flechas indican el peso molecular de las bandas obtenidas en la inmunización de los conejos.

En la prueba de Wb de los sueros de conejo con el extracto proteico de *T. cruzi*, el suero del conejo 1 reconoció un componente de 34 kDa (Fig. 13, tira C), mientras que el suero del conejo 2 reconoció uno de 27 kDa (Fig. 13, tira H), componentes con peso molecular equivalente al de las bandas con que fueron inmunizados. Sin embargo, en la prueba de Wb también se observa la reacción

cruzada de los sueros preinmunes de los conejos contra algunas bandas del extracto parasitario. El suero preinmune del conejo 1 (Fig. 13, tira A) tuvo reacción cruzada con los componentes de 90, 76, 66, 58 y 44 kDa, mientras que el suero preinmune del conejo 2 (Fig. 13, tira E) reaccionó con una banda de 38 kDa.

9. DISCUSIÓN

Los componentes del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi* han mostrado una buena reactividad en ensayos inmunoenzimáticos, por lo cual fue utilizado en el presente trabajo (Bucio et al., 1999).

El patrón electroforético del extracto se realizó en el gel de poliacrilamida al 12.5% (Fig. 7, C), ya que permite observar la distribución de la mayor parte de los componentes, a diferencia de concentraciones de acrilamida menores, como la de 7.5% y 10% (Fig. 7, A y B), donde no se observan los componentes de bajo peso molecular. Por otro lado, al utilizar concentraciones de acrilamida al 15% (Fig. 7, D), los componentes del extracto no se separan lo suficiente para ser analizados.

La cantidad de proteínas del extracto parasitario que se decidió utilizar fue la de 20 µg/pozo (Fig. 8), ya que es la que permitió la visualización de mayor cantidad de componentes definidos.

En el análisis proteico en SDS-PAGE (Fig. 8), se observaron 33 bandas proteicas en un rango de 10 a más de 250 kDa, destacando las de 38,48, 50, 89 y 96 kDa, lo cual concuerda con los trabajos de O'Daly y cols. (1994) y Bucio, en 1999. Así también, se observan tenues bandas de bajo peso molecular, que concuerda con De Lima y cols. (2001), quienes reportan un bandeo polipeptídico de epimastigotes entre 205 y 14 kDa.

La dilución de suero utilizado para la prueba de Wb se definió realizando diferentes diluciones de un pool de sueros positivos (Fig. 9) y un suero negativo. Se seleccionó la dilución en la cual se observaron la mayor cantidad de componentes (Fig. 9, B), correspondiente a 1:200. El suero control (-) no presentó reactividad contra algún componente. Finalmente, la dilución del segundo anticuerpo (anti-IgG humana conjugada a peroxidasa) se utilizó en una dilución

previamente estandarizada en el laboratorio de Biología de Parásitos, de la Facultad de Medicina.

En los resultados del Wb de los sueros humanos, el panel de sueros positivos a *T. cruzi* presentó reactividad con 48 componentes distintos, de los cuales, once presentaron una frecuencia de reconocimiento superior al 50%. En este análisis, resulta interesante la presencia de tres componentes con un reconocimiento del 100% y uno con el 97%, que son los de 27, 34, 38 y 40 kDa, respectivamente. Algunos de los componentes encontrados coinciden con algunas proteínas reportadas en la literatura. Uno de estos es el de 75 kDa reportada por Nogueira y cols. como la principal glicoproteína en epimastigotes y tripomastigotes de cultivo axénico (Nogueira y cols., en 1981; Nogueira y cols., 1982). Starfstein y cols. encontraron una proteína de 25 kDa en la superficie de epimastigotes y la proponen como candidata en el serodiagnóstico de esta enfermedad (Scharfstein et al.,1983; Scharfstein et al.,1985). O'Daly y cols. (1994) reportaron una proteína de membrana de 85 kDa frecuentemente detectada en la cepa Y con sueros de pacientes infectados. Reiche y cols, (1998), consideran de relevancia diagnóstica a los componentes de 27, 34 y 75 kDa. Bucio y cols, en 1999, reportaron cinco componentes de importancia diagnóstica, entre ellos los de 25 kDa y otro de 74 kDa. Un componente de 40 kDa es reportado en epimastigotes la cepa Querétaro (Sánchez y cols., 2001) y en epimastigotes de la cepa Ninoa (Rangel-Flores y cols., 2001). También, Silber y cols, en 2002 reportaron una proteína de 67 kDa (llamada LLGP-67), la cual ha sido ligada al proceso de invasión de epimastigotes a células endoteliales. En el mismo año, De Lima y cols., identificaron varios componentes de los tripomastigotes que reaccionan con sueros de pacientes chagásicos, entre éstos, los de 42/40, 38/36 y 34/32 kDa.

Debido a la cercanía de los pesos moleculares reportados en trabajos previos con los que aquí reportamos, podría tratarse de los mismos componentes en el casos de los antígenos de 25, 27, 34, 38, 40, 68, 75 y 84 kDa. Sin embargo,

distintos perfiles antigénicos se han obtenido de los aislados de *T. cruzi*, que varían respecto de la metodología de extracción antigénica, por lo cual, es difícil establecer a los principales antígenos de *T. cruzi*.

Por otro lado, en el Western blot de los sueros de pacientes chagásicos, el patrón inmunogénico obtenido abarca el mismo rango de pesos moleculares al observado en el SDS-PAGE, siendo los componentes inmunogénicos principales los de 27, 34, 38 y 40 kDa. En el gel de poliacrilamida, el componente de 34 kDa es detectado como una banda muy delgada, patrón que también se observa en el Wb, mientras que el componente de 38 kDa se presenta como una banda definida con buena intensidad en ambos sistemas. Sin embargo, los componentes de 27 y 40 kDa, que en el Western blot aparecen como bandas altamente reconocidas por la mayoría de los sueros positivos, en el patrón electroforético no se observan. En el análisis comparativo de los dos perfiles, se sugiere que la presencia de bandas en el gel teñido, pero ausentes en la membrana de nitrocelulosa revelada pueda deberse a la incapacidad inmunogénica de los componentes del parásito en los pacientes con la infección. Así también, las bandas obtenidas en el Wb, pero ausentes en el gel teñido, puede deberse a que los componentes se encuentren en cantidades tan bajas que escapan del límite de su detección en geles teñidos con azul de Coomassie, técnica con menor sensibilidad que el Wb.

Puesto que uno de los objetivos del presente trabajo fue reconocer la mayor cantidad de componentes inmunogénicos, la cantidad de proteínas empleada por pozo fue alta. Además, la cantidad de suero utilizado también puede estar en una concentración mayor a la adecuada. A esto puede deberse que el Wb de los sueros de individuos sanos presentaron reactividad cruzada contra algunos componentes del extracto. Estos sueros pertenecen a un panel en el que han sido caracterizados como seronegativos hasta por cinco pruebas serológicas distintas. No obstante, existe la posibilidad de que algunos anticuerpos reaccionaran contra epítopes de proteínas altamente conservadas, como pueden ser: miembros de la familia de las proteínas de choque térmico (HSPs, por sus siglas en inglés) o la

ubiquitina, que están presentes en muchos patógenos, como helmintos, protozoarios y bacterias (Kaufman, 1990; O'Daly et al., 1994).

Por otro lado, la reactividad observada en los sueros de pacientes con infección de *Leishmania spp.* contra componentes de *T. cruzi* es esperada debido a la cercanía filogenética entre las dos especies de tripanosomátidos, además de que esta reactividad ha sido reportada en trabajos previos. En 1994, O'Daly y cols. utilizaron el extracto total de epimastigotes de la cepa Y en la prueba de Wb, donde varios antígenos de *T. cruzi* fueron reconocidos por los sueros de pacientes sanos, que reaccionaron contra bandas de 30-170 kDa, de pacientes con leishmaniasis, que reconocieron bandas de 30 a más de 100 kDa y pacientes con cardiomiopatías no chagásicas que reaccionaron contra bandas en un rango de 50 a 120 kDa. En otro estudio en 1998, Reiche y cols. evaluaron el Wb como método de confirmación de la enfermedad de Chagas, utilizando un extracto de epimastigotes de la cepa Y. Muestras de suero de pacientes con otras enfermedades (toxoplasmosis, factor reumatoide, mononucleosis infecciosa, salmonelosis, citomegalovirus, entre otras) reaccionaron con algunos componentes de *T. cruzi* de 16 a 160 kDa, los sueros de pacientes con leishmaniasis reaccionaron contra algunas de 18 a 82 kDa, y los sueros negativos también reaccionaron contra bandas de 18 a 97 kDa. Sin embargo, de acuerdo al criterio de positividad utilizado en este trabajo, el número de bandas no fue suficiente para considerar a las muestras positivas, ya que la interpretación de los resultados se basó en el número de bandas reconocidas por los todos los sueros utilizados y en la frecuencia de reactividad de las proteínas, por lo que una muestra se consideró positiva cuando reconoció al menos cinco bandas de un grupo de 10, que fueron las que presentaron la mayor frecuencia de reconocimiento. En el 2001, Sánchez y cols., estandarizaron la técnica de Western blot con extracto de epimastigotes de la Querétaro de *T. cruzi* y utilizaron 22 sueros de pacientes chagásicos crónicos sintomáticos y 35 sueros negativos. En la tira de nitrocelulosa se observó que algunos sueros negativos presentaron reacción cruzada con uno o dos componentes del extracto parasitario, los cuales

fueron excluidos de la lectura de la tira y la prueba se consideró positiva cuando al menos una banda específica fuera detectada, mientras que los sueros de pacientes con leishmaniasis también tuvieron reacción cruzada, en este caso, con una banda de 40 kDa y otras mayores de 100 kDa. Estos resultados nos muestra la reacción inmunológica cruzada entre los tripanosomátidos y en ocasiones, el reconocimiento inespecífico de sueros de personas sanas hacia componentes de *T. cruzi*, tal como ocurrió en la prueba de Wb en el presente trabajo.

Debido a la reactividad incrementada en la prueba de Western blot arriba mencionada, el criterio de positividad está basado en el número y peso molecular de las bandas reconocidas por los sueros de pacientes positivos, negativos y que no presentan cruce con sueros de pacientes con leishmaniasis. En el presente trabajo, los sueros de pacientes positivos reconocieron 11 bandas con una frecuencia superior al 50%, todos estos sueros reconocieron al menos siete de estas bandas inmunogénicas y el 17% de los sueros reaccionó con las 11. Por otro lado, ninguno de los sueros de pacientes negativos reconoció tres de estas bandas inmunogénicas, por lo que, a pesar de su reactividad, de acuerdo al criterio de positividad utilizado, se consideran negativos a la infección.

Ninguna prueba inmunológica convencional ni no convencional puede por sí sola establecer el diagnóstico de esta infección. La sensibilidad de la ELISA es superior respecto de otras pruebas serológicas, por lo que esta técnica es la más adecuada para realizar el tamizaje serológico de la infección por *T. cruzi* (Flores-Chávez et al., 2009) y una combinación con una prueba confirmatoria no convencional con alta especificidad, como el Western blot, podrían ser una alternativa para el diagnóstico de rutina.

Por otro lado, el protocolo de inmunización empleado en este trabajo para la producción de anticuerpos policlonales, a través del antígeno unido en la membrana de nitrocelulosa, es una alternativa ventajosa respecto de la inmunización realizada con poliacrilamida, cuya principal desventaja radica en que

esta sustancia puede causar granulomas y abscesos en el sitio de inoculación de los animales. Asimismo, la técnica con acrilamida no siempre es exitosa debido a factores tales como la dificultad de disgregación de la acrilamida, dificultad de la proteína antigénica para difundirse en el gel y la presencia de SDS en grandes cantidades, que puede resultar en daño tisular y celular grave (Diano et al., 1998; Asai; 1993). Aunado a lo anteriormente descrito, durante el proceso de desteñimiento del gel de acrilamida puede ocurrir la contaminación del antígeno de interés con otras proteínas del extracto, induciendo reacciones inmunes indeseadas en el suero final (Boulard y Lecroised, 1982). Por otro lado, la inmunización con el antígeno contenido en la membrana de nitrocelulosa permite ser localizado y aislado fácilmente, lo que permite un alto grado de pureza de la muestra, que es solubilizada rápidamente con DMSO, donde además, el antígeno puede ser recuperado e inyectado en su totalidad (Diano et al., 1998).

Los resultados obtenidos en la inmunización demuestran una buena respuesta inmune en conejos inducida por la inoculación del componente parasitario unido a la membrana de nitrocelulosa. Además, se muestra un alto grado de pureza en el aislamiento de los componentes a partir de la membrana, lo cual permitió obtener anticuerpos contra los componentes parasitarios empleados en la inmunización. Esto se evidencia en el Wb, donde el último suero de cada conejo reconoce una banda parasitaria que presentan un peso molecular correspondiente con la banda con la que fueron inmunizados (Fig. 13, tiras D y H). Sin embargo, en el Wb también se observa la respuesta inmunológica cruzada de los sueros preinmunes de los conejos contra algunos componentes del extracto parasitario. Esto podría deberse a que el Wb es una técnica que presenta mayor sensibilidad respecto de otras pruebas de diagnóstico serológico, debido a que implica la desnaturalización de las proteínas, por lo que los determinantes antigénicos ocultos son expuestos en la prueba y pueden ser reconocido por algunos anticuerpos.

10. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se establecieron los criterios de positividad para la técnica de Western blot con el aislado mexicano ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi* para ser usada como prueba de diagnóstico confirmatorio de la enfermedad de Chagas.

Se identificaron los componentes del extracto proteico de *T. cruzi* con mayor frecuencia de reconocimiento por el panel de sueros de pacientes con la infección: 27, 34, 38 (100%) y 40 kDa (97%).

Se obtuvieron anticuerpos policlonales contra las proteínas de pesos moleculares de 27 y 34 kDa del extracto, los cuales presentan potencial para su empleo en pruebas diagnósticas.

11. PERSPECTIVAS

La estandarización de la técnica de Western blot realizada en el laboratorio de Biología de Parásitos, de la Facultad de Medicina de la UNAM, todavía requiere ser validada con una mayor cantidad de sueros y calcular los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor pronóstico positivo y valor pronóstico negativo. De igual manera, sería recomendable para trabajos futuros probar diferentes diluciones del antígeno y sueros que permitan disminuir las reacciones cruzadas de sueros de individuos sanos y con leishmaniasis.

Debido a que las proteínas de 27, 34, 38 y 40 kDa fueron reconocidas por sueros de pacientes con la infección, resulta de interés realizar un reto con el parásito vivo a conejos inmunizados con las proteínas individuales o mezcladas, para conocer si alguna presenta actividad inmunoprotectora.

De igual manera es necesario aislar y caracterizar estos componentes para conocer su identidad, profundizar en cuanto a la función que desempeñan y su importancia en la interacción con los hospederos.

Resulta importante continuar identificando proteínas inmunogénicas específicas de *T. cruzi* que no presenten cruce *Leishmania spp*, con el propósito de obtener herramientas de mayor precisión en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

12. REFERENCIAS

Alves MJ and Colli W 2008. **Role of the gp85/Trans-Sialidase Superfamily of Glycoproteins in the Interaction of *Trypanosoma cruzi* with Host Structures.** Subcell Biochem **47**:58-69.

Andrade SG 1974. **Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano.** *Rev Patol Trop* **3**: 65-121.

Asai DJ 1993. **Antibodies in Cell Biology.** Methods in Cell Biology, Vol. 37, Academic Press, 452 pp.

Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Ache A, Lacouture S, Medina M and Ward BJ 2006. **Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease.** J Clin Microbiol **44**(2): 291–296.

Buscaglia CA, Campo VA, Frash AC y Di Noia JM 2006. ***Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity.** Nat Rev Microbiol **4** (3): 229-236

Buscaglia CA, Campo VA, Di Noia JM, Torrecilhas AC, De Marchi CR, Ferguson MA, Frach AC y Almeida IC 2004. **The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins.** J Biol Chem **279**(16): 15860-15869

Bua JE, Bontempi EJ, Ruiz AM, Segura EL 1990. **Antígenos en *Trypanosoma cruzi*.** Rev Argent Microbiol **22**(1):37-55.

Bucio MI, Cabrera M, Segura EL, Zenteno E, Salazar-Schettino PM 1999. **Identification of Immunodominant antigens in mexican strains of *Trypanosoma cruzi***. Immunol Invest **28**(4): 257-268.

Boulard C and Lecroisey A 1982. **Specific antisera produced by direct immunization with slices of polyacrylamide gel containing small amounts of protein**. J Immunol Methods **50**(2):221-6.

Castro JA, Montalto de Mecca M and Bartel LC 2006. **Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis)** Hum Exp Toxicol **25** (8): 471-479.

Chagas C 1909. **Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem**. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909; **1**:159-218.

Da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO 2001. **Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis**. Trends Parasitol **17**: 286-91.

De Haro I, Salazar SPM y Cabrera M 1995. **Diagnóstico morfológico de las parasitosis**. 2° edición. Mendez Editores. México, 289 págs.

De Lima Rivero AR, Farias Tamoy MN, Tortolero Leal E, Navarro Aguilera MC, Contreras Alvarez VT 2001. **Partial purification and use of *Trypanosoma cruzi* glycosidic fractions for Chagas disease diagnosis**. Acta Cient Venez **52**: 235-47.

Diano M, Le Bivic A, Hirn M 1998. **Raising polyclonal antibodies using nitrocelulose-bound antigen**. Methods in Molecular Biology, Vol. 80; immunochemical Protocols, 2nd ed. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Dutra W, Rocha MOC, Teixeira M 2005. **The clinical Immunology of human Chagas Disease**. Trends parasitol **21** (12):581-587.

Epting CL, Coates BM, Engman DM 2010. **Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi***. Exp Parasitol **126**: 283–291.

Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T y Cañavate C 2010. **Comparación de técnicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España**. Enferm Infecc Microbiol Clin **28** (5):284-93.

García-Escalante MG, Ehrenberg-Enríquez J, Puerto FI 1996. **Estudio del perfil antigénico de *Trypanosoma cruzi* a través de la reactividad de sueros hiperinmunes obtenidos de conejos**. Rev Biomed **7**:133-145.

Gavilondo-Coeley J 1995. **Anticuerpos policlonales y monoclonales**. Anticuerpos monoclonales, ed. Gavilondo-Coeley (Elfos scientiae, La habana), pp. 25-29.

Giovanni De-Simone S, Pontes De Carvalho LC, Oliva OF, Andrade SG, Galvao-Castro B 1987. ***Trypanosoma cruzi* strain-specific monoclonal antibodies: identification of Colombian strain flagellates in the insect vector**. Trans R Soc Trop Med Hyg **81**(5):750-4.

Gomes A, Silveira-Lacerda EP, Pereira Cunha-Junior J, De Souza MA, Favotelo-Junior S 2004. **Immunoblotting analyses using two-dimensional gel electrophoresis of *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens**. Rev Soc Bras Med Trop **37**(6):454-459.

Gutiérrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS 2009. **The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease.** *Parasite Immunol* **31**: 673-85.

Guzmán-Marín E, Zavala-Castro JE, Acosta-Viana KY, Rosado-Barrera ME 1999. **Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*.** *Rev. Biomed* **10**: 177-184.

Kahn SJ, Nguyen D, Norsen J, Wleklinski M, Granston T, Kahn M 1999. ***Trypanosoma cruzi*: monoclonal antibodies to the surface glycoprotein superfamily differentiate subsets of the 85-kDa surface glycoproteins and confirm simultaneous expression of variant 85-kDa surface glycoproteins.** *Exp Parasitol* **92**(1):48-56.

Katzin A, Manso A, Abuin G, Colli W 1989. **Antigenuria in chronic chagasic patients detected by monoclonal antibody raised against *Trypanosoma cruzi*.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* **83**: 341-343.

Kaufman, SHE 1990. **Heat shock proteins and the immune response.** *Immunol Today* **11**: 129-136.

Kawashita SY, Sanson GFO, Fernandes O, Zingales B, Briones MRS 2001. **Maximum-likelihood divergence data estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution.** *Mol Biol Evol* **18**: 2250-2259.

Knudsen KA 1985. **Proteins Transferred to Nitrocellulose for Use as Immunogens.** *Anal Biochem* **147**:285-288.

Kurien BT, Scofield RH 2006. **Western blotting.** *Methods* **38**: 283–293.

Laemmli UK 1970. **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** Nature **227**:680-685.

Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L and Pialoux G 2010. **Chagas disease: changes in knowledge and management.** Lancet Infect Dis 2010; **10**: 556–70.

Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J., Lynn, D. H., Merinfeld, D., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F. G. 1980. **A newly revised classification of the Protozoa.** *J. Protozool.*, **27**: 37–58.

Lima FM, Oliveira P, Mortara RA, Silveira JF y Bahia D 2010. **The challenge of Chagas´disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to survert host cells?** N Biotechnol **27**(6): 837-843.

López-Ordóñez T, Panzera F, Tun-Ku E, Ferrandis I y Ramsey JM 2009. **Contribuciones de la genética y la proteómica al estudio de la enfermedad de Chagas.** Salud Pública Mex **51**(supl. 3): S410-S423.

Lozano HN. **Identificación de antígenos inmunodominantes en distintas fases de la enfermedad de Chagas, utilizando un extracto de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*** [Tesis]. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.

Manoel-Caetano FS and Silva AE 2007. **Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas Disease.** Cad Saúde Pública **23**(10):2263-2274.

Miles MA, Toyé PJ, Oswald SC and Godfrey DG 1977. **The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil.** Trans R Soc Trop Med Hyg **71**:217-25.

Monteón VM, Ramos A, Reyes PA 1993. **Reactivity of sera from Chagas patients to extracts of Mexican *Trypanosoma cruzi* isolates.** Rev Biol Trop **41**: 861-865.

Morel CM, Chiari E, Plesmann Camargo E, Mattei DM, Romanha AJ and Simpson L 1980. **Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles.** Proc Natl Acad Sci USA **77**:6810-6814.

Nogueira N, Chaplan S, Tydings JD, Unkeless J and Cohn Z 1981. ***Trypanosoma cruzi* surface antigens of blood and culture forms.** J Exp Med **153**: 629-639.

Nogueira N, Unkeless J and Cohn Z 1982. **Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*.** Proc NATL Acad Sci **79**: 1259- 1263.

O'Daly JA, Carrasco H, Fernandez V and Rodriguez MB 1994. **Comparison of chagasic and non-chagasic myocardiopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*.** Acta Trop **56**: 265-87.

Organización Mundial de la Salud 2005. **Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales(TDR).** Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas, TDR/GTC/06.

Organización Mundial de la Salud 2002. Comité experto en el control de la enfermedad de Chagas. **Control de la enfermedad de Chagas : Segundo reporte del comité experto de la OMS.** Geneva. 117 pp.

Organización Mundial de la Salud 2000. Comité Experto en el Control de la Enfermedad de Chagas. **Control de la Enfermedad de Chagas: Segundo reporte del comité experto de la OMS.** Serie de reporte técnico de la OMS; 905:I- VI:1-109 Brasilia, Brazil.

Organización Panamericana de la Salud 2006. OMS Departamento de control de Enfermedades Tropicales Olvidadas. **Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas.** Montevideo, Uruguay, OPS/HDM/CD/22506.

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

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA 2010. **Chagas disease.** Lancet **375**: 1388–402.

Ramsey J. M., Ordoñez R., Tello Lopez A., Pohls J.L., Sanchez V. y Peterson A. T. 2003. **Actualidades sobre la Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en México.** In: Iniciativa para la vigilancia y el control de la Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, México.

Reiche EM, Cavazzana M, Jr., Okamura H, Tagata EC, Jankevicius SI and Jankevicius JV 1998. **Evaluation of the Western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease.** Am J Trop Med Hyg **59**: 750-6.

Ruiz AM, Esteva M, Subias E, Moreno M, Rosenstein de Campanini A, Velazquez E, Segura EL 1990. **Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*: immunoprotection against metacyclic trypomastigotes obtained by immunization of mice with an affinity-purified antigen.** Mol Biochem Parasitol **39**(1): 117-125.

Salazar-Schettino PM, Rojas-Wastavino GE, Cabrera-Bravo M, Bucio-Torres MI, Martínez-Ibarra JA, Monroy-Escobar MC, Rodas-Retana A, Guevara-Gómez Y, Vences-Blanco MO, Ruíz-Hernández AL, Torres-Gutiérrez E 2010. **Revisión de trece especies de la familia *Triatominae* (*Hemiptera:Reduviidae*) vectores de la enfermedad de Chagas en México.** J Selva Andina Res Soc **1** (1):58-80.

Sánchez B, Monteón V, Reyes PA and Espinoza B 2001. **Standardization of Micro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western Blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from mexican strains as antigens.** Arch Med Res **32**(5): 382-388.

Scharfstein J, Rodríguez MM, Alves CA, Souza W, Previato JO and Mendoza-Previato L 1983. ***Trypanosoma cruzi*: Description of a Highly Purified Surface Antigen Defined by Human Antibodies.** J Immunol **131**: 972- 976.

Scharfstein J, Luquetti J, Murta A, Senna M, Rezende J, Rassi A and Mendoza-Previato L 1985. **Chagas´disease: Serosiagnosis with Purified Gp25 antigen.** Am J Trop Med Hyg **34**: 1153- 1160.

Schmunis GA 2007. **The globalization of Chagas disease.** ISBT Science Series **2**(1):6–11.

Schofield CJ and Dias JCP 1996. **Introduction and historical overview.** En: Schofield CJ, Dujardin JP, Jurberg J, Ed. Taller Internacional sobre Genética Poblacional y Control de Triatomos, México, D.F. INDRE,11-16.

Schofield CJ (1994) **Triatominae: biology & control**. Eurocommunica Publications. West Sussex. UK 80 pp.

Silber AM, Marcipar IS, Roodveldt C, Cabeza Meckert P, Laguens R and Marcipar AJ 2002. ***Trypanosoma cruzi*: identification of a galactose-binding protein that binds to cell surface of human erythrocytes and is involved in cell invasion by the parasite**. Exp Parasitol **100**: 217-25.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA and Zingales B 1996. **DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi***. Mol Biochem Parasitol **83**:141-52.

Souza W, Carvalho TM, Barrias ES 2010. **Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction**. Int J Cell Biol: 1-18.

Souza W 2002. **Basic cell Biology of *Trypanosoma cruzi***. Curr Pharm Des **8**:269-285.

Stills HF and Bailey MQ 1991. **The use of Freund's complete adjuvant**. Lab Anim (US) **20**:25-30.

Tachibana H, Nagakura K and Kaneda Y 1988. **Source Serodiagnosis of Chagas' disease using monoclonal antibody against *Trypanosoma cruzi*-specific Mr 25,000 antigen**. Parasitol Res **74**(5):409-14.

Teixeira ARL, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C and Santos-Buch CA 2006. **Chagas disease**. Postgrad Med J **82**:788-798.

Tibayrenc M, Ayala FJ 1991. **Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa.** Parasitol Today 7: 228-232.

Tibayrenc M 1998. **Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach.** Int J Parasitol 28: 85-104.

Towbin H, Staehelin T and Gordon J 1979. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Proc Natl Acad Sci. 76:4350-4354.

Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N, Jr., Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC and Camargo ME 1996. **Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease.** J Clin Microbiol 34: 2143-7.

UNAM, Secretaria de Salud 2006. **Manual de laboratorio para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*.** México. 46 pp.

Reiche EM, Cavazzana M, Jr., Okamura H, Tagata EC, Jankevicius SI, Jankevicius JV 1998. **Evaluation of the Western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease.** Am J Trop Med Hyg 59: 750-6.

Wendel S, Brener ME, Camargo A, Rassi A 1992. **Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine.** ISBT Brazil. 256 pp.

World Bank 1993. **World Development Report 1993 Investing in Health.** Oxford University Press, New York. 329 pp.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG 2009. **A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(7): 1051-1054.