



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Producción de anticuerpos policlonales contra
componentes inmunodominantes de *Trypanosoma cruzi*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

MARICRUZ BECERRA LOBATO



DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. ELIA TORRES GUTIERREZ
(2017)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



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.

1. Datos del alumno.
Becerra
Lobato
Maricruz
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306149171
2. Datos del Asesor.
M. en C.
Elia
Torres
Gutiérrez
3. Datos del sinodal 1
Dra
Paz María Silvia
Salazar
Schettino
4. Datos del sinodal 2
Dra
Rosario
Mata
López
5. Datos del sinodal 3
M. en C.
Elia
Torres
Gutiérrez
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Aarón
Rodríguez
Caballero
7. Datos del sinodal 5
M. en C.
Isabel Cristina
Cañeda
Guzmán
8. Datos del trabajo escrito
Becerra-Lobato, M. 2017. Producción de anticuerpos policlonales contra componentes inmunodominantes de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 51 p

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica y los conocimientos adquiridos en sus aulas, los cuales permitieron realizar el presente trabajo.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico bajo el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica por las becas otorgadas bajo el proyecto IT200913 “Validación de métodos para la confirmación del diagnóstico de la infección de *Trypanosoma cruzi* mediante el uso de marcadores biológicos específicos” y el proyecto IN211613 “Estudio clínico y cardiológico en niños seropositivos a *Trypanosoma cruzi* en dos poblaciones endémicas de México.

A los miembros de mi jurado

A la Dra. Paz María Salazar Schettino, por todo el apoyo que me brindó, por ser fundamental en mi formación en parasitología y por ser un gran ejemplo como Investigadora y una persona admirable.

A la M. en C. Elia Torres Gutiérrez, por la dirección de tesis, apoyo y tiempo que destinó en mi formación.

A la Dra. Rosario Mata López, por los conocimientos de parasitología que me brindó, por cada aprendizaje dentro del aula y cada uno de sus comentarios.

M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán, por su apoyo e interés brindados durante las revisiones de este trabajo y por cada una de sus críticas que me ayudaron a mejorar notablemente.

M. en C. Aarón Rodríguez Caballero, por interés y disposición para aclarar conceptos básicos, por sus comentarios y por el apoyo que tuve en todo momento.

A cada uno de ustedes les agradezco por destinar parte de su tiempo en la revisión de mi trabajo y por cada uno de sus comentarios que me ayudaron a mejorar, infinitas gracias.

Agradecimientos técnicos

Al M. en C. Aarón Rodríguez Caballero, por sus recomendaciones para la obtención de anticuerpos policlonales, su asesoría en los fundamentos inmunológicos y la revisión del trabajo escrito.

A la Dra. Yolanda Guevara Gómez, por el conocimiento transmitido, por su confianza y apoyo con los medios de cultivo para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Carlos Josué Solorzano Mata, Profesor Investigador de la Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, por su asesoría en la parte experimental de inmunofluorescencia.

Al Biólogo Mauro Omar Vences Blanco por la ayuda otorgada en la inmunización de animales y por su apoyo dentro del laboratorio.

A la C. a Dr. Mariana De Alva Alvarado por su apoyo, disposición de ayuda en el laboratorio y por sus asesorías.

Al Biólogo Santiago Rosales Piña por su apoyo en el manejo general de los animales.

Agradecimientos técnicos

A la C. a Dr. Any Laura Flores Villegas por su ayuda dentro del laboratorio y por compartirme recursos fotográficos para la elaboración de este trabajo.

A la laboratorista Evita Anaya Gil, por el apoyo con los reactivos utilizados durante los experimentos.

A la Dra. Margarita Cabrera Bravo, por el apoyo que me brindó durante la realización de este trabajo, por su confianza, por los consejos y tiempo dedicados.

A la Dra. Martha Irene Bucio Torres, por su apoyo en la parte experimental animal, por sus críticas y recomendaciones para mejorar el trabajo experimental y escrito.

Agradecimientos personales

A la Dra. Martha Ponce Macotela, M. en C. Yadira Rufino González y Biol. Mario Noé Martínez Gordillo por alentarme y transmitir gran parte de sus conocimientos en el área de parasitología.

A Karen y Pepe, por brindarme su amistad y apoyo que me han dado en todo momento, por sus consejos y por todos los momentos compartidos.

A Angeles, Paulina e Ismael por la convivencia.

A Ricardo, Elsa, Jonathan, Toño, Rogelio, Arge, Nataly, Mony, Orlando, por todas las experiencias que compartimos durante la licenciatura.

A Viri, Kary, Isela, Andrea, Marianita, Lupita por el apoyo brindado en el laboratorio y por las convivencias.

Al Profesor Raúl Suárez por su apoyo y aprendizaje de otro idioma, a Liz León por las experiencias juntas, los momentos compartidos, consejos, por el aprendizaje, entusiasmo y porras.

Y a todas aquellas personas que siempre están conmigo.

Dedicatoria

A mi mamá por ser el mejor ejemplo de vida, por demostrarme tu amor cada día, por todos tus consejos, apoyo y por compartir muchos momentos juntas. Aun no encuentro tantas palabras para decirte lo grandiosa y admirable que eres. Gracias por estar en todo momento. Te amo infinitamente.

A mis hermanos Alfredo y Noé por el apoyo, cariño, enseñanzas, consejos y por tantos momentos y experiencias juntos, gracias.

A Myriam por los momentos compartidos.

A Valeria y Yaretzi por todo el cariño, enseñanzas, aprendizaje y momentos compartidos.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Epidemiología.....	4
Clasificación Taxonómica de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	8
Vectores.....	10
Mecanismos de transmisión.....	12
Fases de la enfermedad y manifestaciones clínicas	
Fase Aguda.....	13
Fase Crónica asintomática.....	14
Fase Crónica sintomática.....	14
Diagnóstico de la enfermedad	
Fase Aguda.....	15
Fase Crónica.....	15
Confirmación del diagnóstico.....	16
Tratamiento de la enfermedad.....	16
Antecedentes	
Variedad genotípica de <i>T. cruzi</i>	17
Biomarcadores.....	18
Proteínas de <i>T. cruzi</i> en el diagnóstico.....	18
Anticuerpos como biomarcadores de <i>T. cruzi</i>	21
Justificación	23
Hipótesis	24
Objetivo general	24
Objetivos particulares	24

Materiales y métodos

Cultivo de <i>T. cruzi</i>	25
Obtención del extracto antigénico de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	25
Cuantificación de proteínas.....	25
SDS-PAGE.....	26
Electroinmunotransferencia y selección de componentes inmunodominantes.....	26
Inmunización de conejos hembra Nueva Zelanda.....	26
Obtención de sueros de conejo.....	27
Inmunoblot con sueros de conejo (Western-blot).....	27
Purificación de anticuerpos de conejo.....	27
Fijación de parásitos.....	28
Inmunocitoquímica	
Estandarización de anticuerpos policlonales Anti-TC27 y Anti-TC34.....	28

Resultados

Electroforesis de proteínas.....	30
Inmunizaciones y Western-blot.....	31
Estandarización de anticuerpos policlonales Anti-TC27 y Anti-TC34.....	33

Discusión.....38

Conclusiones.....43

Perspectivas.....44

Referencias.....46

Resumen

La enfermedad de Chagas es producida por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* y constituye un problema de salud pública, afecta principalmente áreas rurales de Latinoamérica. Durante la fase crónica, cerca del 30% de los pacientes infectados presentan afecciones cardiacas o digestivas que originan una morbilidad considerable e incluso la muerte. El diagnóstico de la infección se realiza principalmente por serología.

En el estudio de *T. cruzi* y su interacción con sus huéspedes, es necesario el desarrollo de herramientas que permitan identificar y evidenciar la presencia de los parásitos y sus componentes de forma específica. Un recurso importante en el reconocimiento específico de proteínas y glicoproteínas son los anticuerpos y su uso en técnicas de inmunohistoquímica representan una poderosa herramienta, ya que combinan alta precisión y alta sensibilidad en localización celular e incluso escala subcelular.

El objetivo del presente trabajo fue producir anticuerpos policlonales contra componentes proteicos del aislado de *T. cruzi* ITRI/MX/1991/TQ previamente identificados como inmunodominantes.

Los componentes inmunodominantes de *T. cruzi* fueron identificados por peso molecular en el patrón electroforético y transferidos a membranas de nitrocelulosa de donde se escindieron para realizar las inmunizaciones subcutáneas en conejos hembra Nueva Zelanda.

Los sueros obtenidos de los conejos inmunizados presentaron reactividad contra los componentes de 27 y 34 kDa y los anticuerpos fueron purificados por afinidad a la proteína A. En la técnica de inmunofluorescencia, ambos anticuerpos policlonales presentaron reconocimiento hacia los epimastigotes de *T. cruzi*. Los anticuerpos anti-TC27 reconocieron la región del cinetoplasto mientras que los anti-TC34 el reconocimiento se distribuía en el citoplasma. Esto nos sugiere su potencial de uso como marcadores de *T. cruzi* en técnicas de inmunocitoquímica y en el estudio de organelos específicos.

Abstract

Chagas disease is caused by the protozoan parasite *T. cruzi* and it makes a public health problem mainly in rural areas of Latinoamerica. During the chronic phase, about 30% of infected patients present cardiac or digestive diseases which cause an important morbidity and even death. Diagnostics of this infection is carried out mainly by serology.

For the understanding of *T. cruzi* and it's interaction with their hosts, it is necessary the development of tools that allow to identify and demonstrate the presence of parasites and their parts specifically. An important resource in the specific recognition of proteins and glycoproteins are the antibodies, and their use in immunohistochemistry techniques represent a powerful tool, because they combine high accuracy and high sensivity in cellular location and even subcellular scale

The aim of this work was to produce polyclonal antibodies against protein components of *T. cruzi* strain ITRI/MX/1991 previously identified as immunodominant.

T. cruzi immunodominant components were identified by molecular weight in the electrophoretic pattern and transferred to nitrocellulose membranes and split to make subcutaneous immunizations in New Zealand female rabbits.

Serum obtained from the immunized rabbits presented reactivity against components from 27 and 34 kDa and the antibodies were purified by affinity to A protein. In the immunofluorescence technique, both polyclonal antibodies presented recognition for epimastigotes of *T. cruzi*. Surprisingly, antibodies anti-TC27 recognized kinetoplast region while antibodies anti- TC34 recognition was distributed in the cytoplasm. This suggests us their potential use as markers of *T. cruzi* in immunocytochemistry and in the study of their specific organelles.

Introducción

La Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana fue descrita en 1909 por Carlos Chagas, quien identificó al protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* como el agente etiológico y al triatomino como vector del parásito, además detalló elementos clínicos, anatómico-patológicos y epidemiológicos ¹.

La mayor parte de las infecciones por *T. cruzi* en el ambiente rural, se observa en niños ², ya que, el vector infectado habita en las casas rústicas de madera, adobe y piedra.

Además esta infección constituye un problema de salud pública, afecta principalmente áreas de México, así como Centroamérica y Sudamérica, sin embargo, su frecuencia se desconoce, en parte por el sub-registro de su prevalencia en el medio rural debido a la ausencia de técnicas de bajo costo y fácil ejecución ³.

Para el diagnóstico de esta enfermedad se realizan diversas técnicas parasitológicas e inmunológicas. Sin embargo, hasta ahora no se ha reportado el uso de anticuerpos policlonales producidos a partir de componentes inmunodominantes en técnicas de inmunohistoquímica, esto podría representar una herramienta poderosa debido a que combinan alta sensibilidad y precisión respecto a la localización celular o incluso escala subcelular ⁴.

Epidemiología

La tripanosomiasis americana es una enfermedad endémica en Latinoamérica, se ha convertido en un problema de salud a nivel internacional para países no endémicos, debido principalmente a la migración ⁵. Se estima que mundialmente existen de 7 a 8 millones de personas infectadas por *T. cruzi* ⁶, especialmente en América Latina se considera en riesgo de infección a un mínimo de 110 millones de individuos en 21 países: Argentina, Brasil, Chile, Uruguay, Paraguay, Perú, Ecuador, Bolivia, Venezuela, Colombia, Guyana francesa, Guyana, Surinam, Costa Rica, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Belice, Guatemala y México ⁷.

Los movimientos poblacionales han modificado el perfil epidemiológico de esta enfermedad, convirtiéndola en un riesgo mundial, principalmente en bancos de sangre variando entre el 3 y 53% y está considerada como emergente en países no endémicos: Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón, Francia, España, Bélgica, Portugal, Suiza, Gran Bretaña, Irlanda del Norte, Italia, Alemania, Australia, Croacia, Dinamarca, Luxemburgo, Noruega, Países Bajos, Rumania y Suecia ⁷ (fig. 1).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS), en 2006, estimó que en México existían aproximadamente 1'100,000 individuos infectados y 29'500,000 en riesgo de contraer la infección; de 2000 a 2012, la Secretaría de Salud (SS) registró 5,559 casos, principalmente entre los 25 y 44 años, los estados con mayor incidencia fueron: Veracruz, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Chiapas, Guerrero y Jalisco, en 2013 con 762 nuevos casos y 729 en 2014, mientras que las defunciones registradas fueron 371, la mayoría en los estados de Oaxaca (54.7%) y Guerrero (15.4%) ⁷.

En 2010, en la 63^{ra} Asamblea Mundial de Salud, se aprobó la resolución WHA63.20, destacando la gravedad de la enfermedad de Chagas, en la cual se hizo un llamado para hacer frente a la transmisión por transfusión de sangre y trasplante de órganos tanto en países endémicos como en países no endémicos. El resurgimiento de la enfermedad, ha sido el principal foco de atención en los últimos años ⁸.

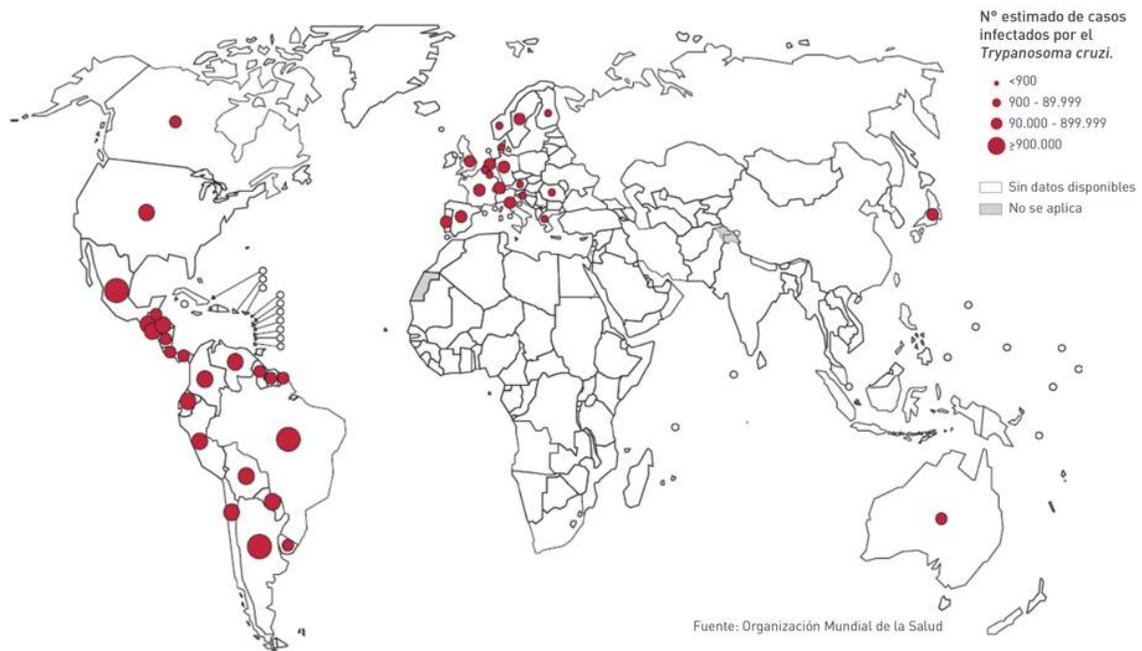


Figura 1. Distribución global de los casos de Chagas, según estimaciones oficiales y situación de la transmisión vectorial, 2006- 2010. Imagen recuperada de <http://www.hablamosdechagas.com.ar/info-chagas/que-es-el-chagas/dimension-epidemiologica/> ⁹

Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi es un protozooario hemoflagelado perteneciente a la Clase Kinetoplastea y Orden Trypanosomatida ¹⁰, que se caracteriza por ser protozooario flagelado que posee un cinetoplasto en una gran mitocondria que contiene DNA ¹¹. La reproducción es asexual, por fisión binaria. De acuerdo a Ruggiero et al., (2015), *T. cruzi* se encuentra en la siguiente clasificación:

Superreino Eukaryota
Reino Protozoa
Subreino Eozoa
Infrareino Euglenozoa
Phyllum Euglenozoa
Clase Kinetoplastea
Orden Trypanosomatida
Familia Trypanosomatidae
Género y especie Trypanosoma cruzi

Los estadios morfológicos principales de *T. cruzi* son: epimastigote, amastigote y tripomastigote (fig. 2).

Epimastigote (epi= anterior): es fusiforme, mide de 18 a 20 μm de largo. El cinetoplasto se encuentra cercano a la parte anterior del núcleo que se encuentra en posición central, de donde emerge el flagelo. Este estadio se reproduce por fisión binaria longitudinal en el vector ^{12, 13} (fig. 2A).

Amastigote (a= sin, mastis=látigo / flagelo): es de forma redondeada, mide de 2 a 4 μm , su flagelo es corto. A la tinción de ácidos nucleicos se observa un gran núcleo y el cinetoplasto. Tiene la capacidad de replicación, por división binaria ^{12, 13} (fig. 2B).

Tripomastigote (tripo= perforar): Es la forma infectiva. Mide de 18 a 21 μm de largo por 1 a 4 de ancho; alargado con un gran núcleo central, cinetoplasto de gran tamaño y el blefaroplasto posterior de donde surge un flagelo que contornea una membrana ondulante, que le confiere movimiento. Este estadio carece de capacidad de reproducción y es la forma infectante. La forma metacíclica se encuentra en las heces de los triatomíneos y la forma sanguínea se encuentra en el torrente sanguíneo de los mamíferos ^{12, 13} (figs 2C, 2D).

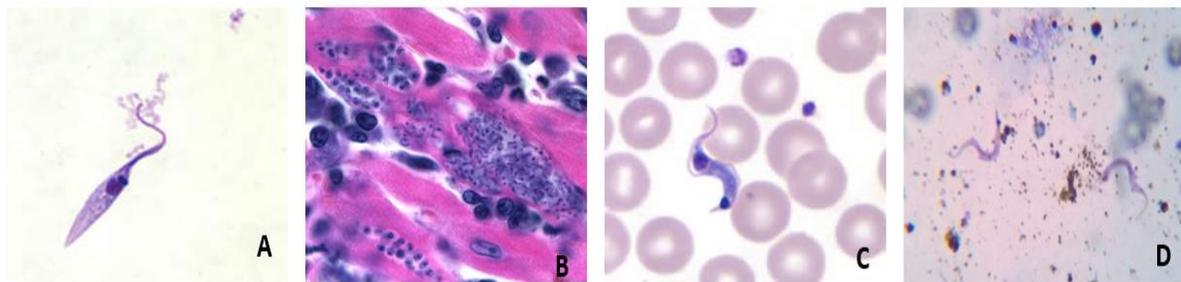


Figura 2. Estadios de *Trypanosoma cruzi*. A) Epimastigote de un cultivo. B) Amastigote en tejido cardíaco teñido con H&E C) Tripomastigote sanguíneo teñido con Giemsa. Imágenes recuperadas de <http://www.cdc.gov> D) Tripomastigote metacíclico teñido con Giemsa, obtenidos del vector. Imagen tomada por Flores Villegas Laura 2015.

Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi tiene un ciclo de vida que alterna entre un huésped vertebrado, el cual comprende a un amplio rango de mamíferos incluyendo al humano y un hospedero invertebrado, que se denomina “vector” donde esta involucrada la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, conocidas también como chinches besuconas¹⁴.

El ciclo biológico de *T. cruzi* (fig. 3) comienza cuando el vector triatomo ingiere sangre con tripomastigotes de los vertebrados infectados. Dentro del triatomo los tripomastigotes sanguíneos ingeridos pasan y se alojan en el sistema digestivo, multiplicándose por fisión binaria longitudinal y diferenciándose en epimastigotes en el intestino medio del vector, algunos de los éstos son conducidos hacia la ampolla rectal diferenciándose en tripomastigotes metacíclicos. En el momento en que el triatomo se alimenta nuevamente, libera tripomastigotes metacíclicos en sus heces. Éstos entran en el huésped a través de la laceración de la piel, las mucosas o conjuntiva. Dentro del huésped vertebrado, el tripomastigote metacíclico infecta las células nucleadas cercanas al sitio de inoculación y se diferencian en amastigotes intracelulares. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria, después de varios ciclos de división, se lisa la célula liberando a los parásitos y diferenciándose en tripomastigotes sanguíneos. Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar las células de diferentes tejidos a través de la circulación periférica o ser ingeridos por otro triatomo^{2, 15}.

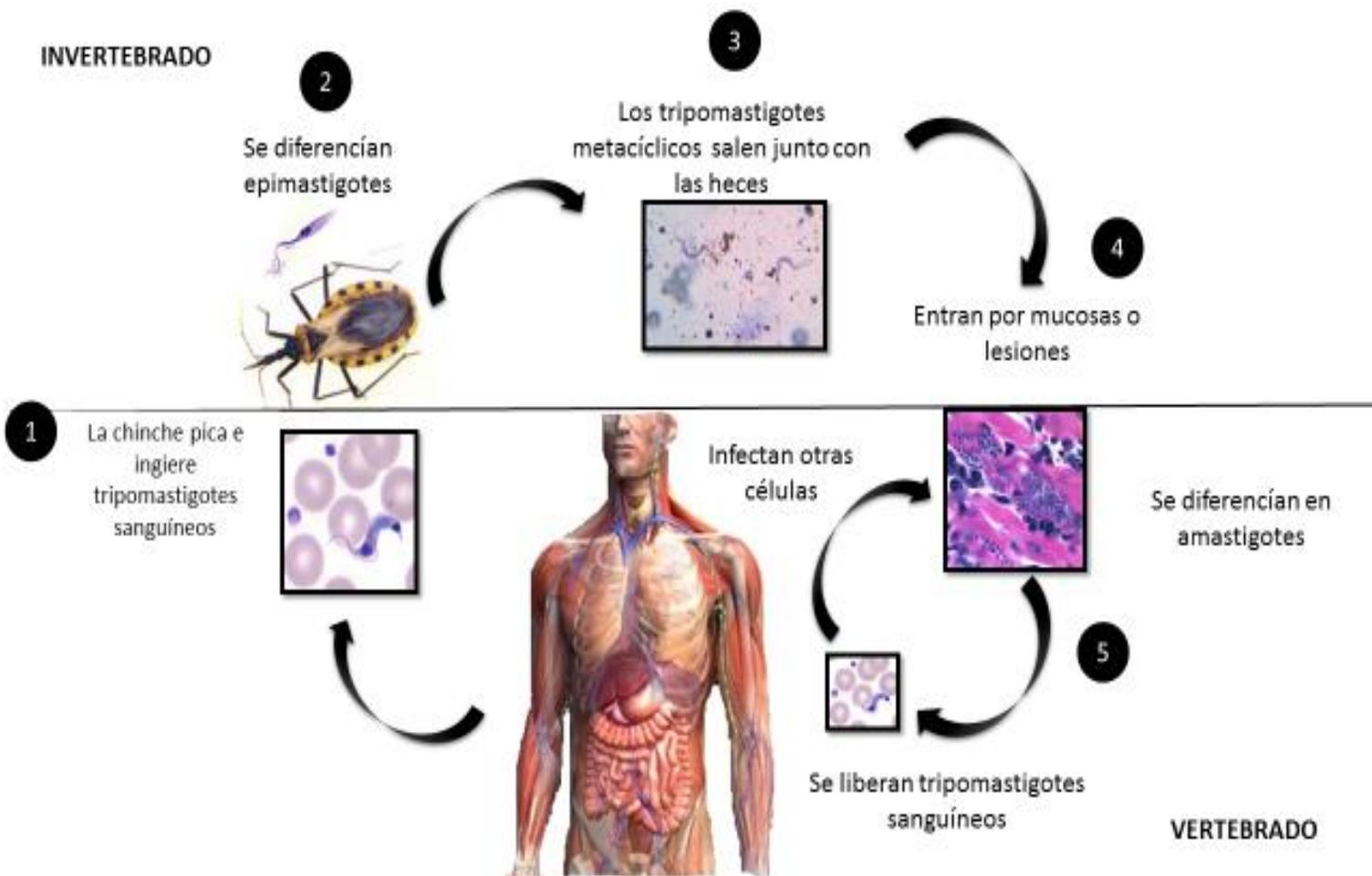


Figura 3. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. 1) Los tripomastigotes sanguíneos son las formas en el huésped mamífero succionadas por el vector, éstos pasan a través de su sistema digestivo y se diferencian su intestino medio como 2) epimastigotes replicativos 3) después de 3- 4 semanas se liberan tripomastigotes metacíclicos junto con las heces del vector 4) entran a través de la picadura, lesiones o mucosas del mamífero e infectan diferentes tipos celulares: fibroblastos, macrófagos y células epiteliales 5) dentro de la célula se diferencian en amastigotes y después de nueve ciclos de división binaria en el citosol, la célula se lisa y los amastigotes se diferencian en el torrente sanguíneo como tripomastigotes sanguíneos para infectar nuevas células y/o infectar al vector e iniciar el ciclo.

Vectores

La enfermedad de Chagas es transmitida a los humanos y a más de 150 especies de mamíferos domésticos y silvestres por insectos hematófagos ¹⁶. Éstos se encuentran dentro de la familia Reduviidae que es al menos de las familias de insectos más diversa, con más de 6,000 especies. Y la subfamilia Triatominae es notable no sólo porque es la única subfamilia de Reduviidae que se alimenta de sangre de vertebrados además se conoce que todos los miembros de esta subfamilia son potenciales vectores de la enfermedad de Chagas ¹⁷. De acuerdo con Ruggiero et al., (2015), estos vectores se encuentran en la siguiente clasificación:

Reino Animalia
Superreino Bilateria
Infrareino Protostomia
Superphyllum Ecdizoa
Phyllum Arthropoda
Subphyllum Hexapoda
Clase Insecta
Subclase Pterigota
Orden Hemiptera
Familia Reduviidae
Subfamilia Triatominae

En México se han reportado 32 especies de diferentes géneros de transmisores de *T. cruzi*, 19 pertenecen al género *Triatoma* y 6 al género *Meccus*, dos especies al género *Panstrogylus* y una especie para cada uno de los siguientes géneros: *Belminus*, *Diplogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma* y *Rhodnius* ¹⁸.

El ciclo de vida de los triatominos incluye las fases: huevo, cinco estadios ninfales y adulto (fig. 4). La duración de cada fase es variable dependiendo de la especie y de la disponibilidad de su alimento. La mayoría de las especies completan su ciclo entre 5 y 12 meses en condiciones óptimas ¹⁹.

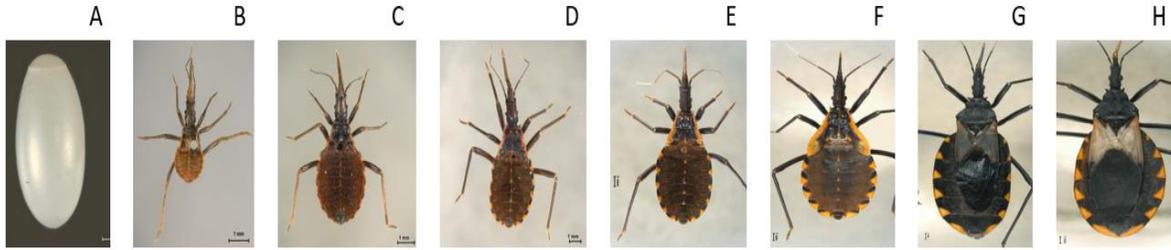


Figura 4. Ciclo de vida de un triatomino de la especie *Meccus pallidipennis*. Se muestran los estadios morfológicos A) huevo B – F) Estadios ninfales del 1 al 5 respectivamente G) Hembra Adulta y H) Macho Adulto. Imágenes tomadas por Guzmán Gómez Susana. Autor: Salazar Schettino Paz María. Contribuidores: Flores Villegas A. Laura, Vences Blanco Mauro O., Cabrera Bravo Margarita. 2011. Recuperado de Repositorio Institucional RAD- UNAM. <http://www.rad.unam.mx/>

Los vectores introdomiciliados estudiados principalmente son: *Triatoma barberi* y *Triatoma dimidiata*, estas especies representan un alto riesgo para la salud entre la población mexicana. Las especies que se han registrado en el peridomicilio son: *Meccus longipennis*, *M. mazzottii*, *M. pallidipennis*, *M. phyllosomus*, *M. picturatus*, *Triatoma gerstaeckeri*, *T. mexicana*, *T. rubida*, *Dipetalogaster máxima*, *Panstrongylus rufotuberculatus* y *Rhodnius prolixus*¹⁸.

En nuestro país los vectores no solo se localizan en zonas tropicales y subtropicales, sino en zonas con alturas por encima de 1800 msnm como es el caso de *Triatoma barberi*¹⁸ y es importante porque es un vector intradomiciliado.

Mecanismos de transmisión

Más del 85% de la transmisión de la enfermedad de Chagas ocurre por vía vectorial. Sin embargo, también puede ser transmitida al humano por mecanismos como: transfusión sanguínea, trasplante de órganos, de manera vertical de la madre al infante, por vía oral y eventualmente por accidentes de laboratorio ¹⁶.

El riesgo de adquirir la enfermedad de Chagas después de la transfusión de una unidad de sangre de un donador infectado es menor del 10- 20 % y depende de muchos factores, incluyendo la concentración de parásitos en la sangre del donador, los componentes de la sangre transfundida y la cepa del parásito ^{15, 16}. El riesgo de transmisión parece ser más alto por la transfusión de plaquetas que de otros componentes en sangre ¹⁶.

La transmisión de la infección a partir de un donador infectado en etapa crónica de órganos y médula ósea han sido documentados principalmente en América Latina ¹⁶.

Los mecanismos de transmisión por transfusiones y congénita son los principales en zonas urbanas y en países no endémicos ^{16, 20}.

Otro mecanismo de infección es por vía oral a través de la ingestión de alimentos o líquidos contaminados con *T. cruzi*. Aunque en México este mecanismo rara vez se presenta, es frecuente en Brasil, Argentina, Chile y Bolivia. Las microepidemias han sido reportadas en la región del Amazonas y son asociadas con el consumo de acaí contaminada (*Euterpe oleracea*), frutos de las palmas (usualmente encontradas cerca de las casas o cerca de lugares tropicales o subtropicales) y el consumo de jugo de caña de azúcar. Estudios recientes han determinado el consumo de acaí contaminado como una de las principales causas de los brotes de Chagas agudo en la región del Amazonas y alta mortalidad ^{21, 22, 23}.

Fases de la enfermedad y manifestaciones clínicas

Fase aguda

La incubación es de 14 días aproximadamente y la duración oscila entre 6 – 8 semanas ²⁴. Los primeros signos de la enfermedad aguda de Chagas aparecen por lo menos una semana después de la invasión parasitaria. Cuando el parásito penetra a través de una laceración de la piel, se forma un área dura de eritema y edema denominada Chagoma de inoculación que se acompaña de linfadenopatía local ².

El Signo de Romaña (fig. 5) aparece cuando la conjuntiva constituye la vía de entrada de heces depositadas por el vector. Este es un dato clásico de la enfermedad aguda de Chagas y que consiste en la presencia de edema indoloro unilateral bipalpebral y periocular. Después de estos primeros signos locales el paciente puede manifestar fiebre, malestar general, anorexia, edema de cara y/o extremidades inferiores. Muchas veces se acompaña de linfadenopatía generalizada y hepatoesplenomegalia. Rara vez existe miocarditis grave; la mayor parte de las muertes en la fase aguda es consecutiva a insuficiencia cardíaca. Los signos neurológicos son poco frecuentes, pero en ocasiones se observa meningoencefalitis en niños menores de dos años de edad (casi siempre después de cuatro a ocho semanas) ^{2, 25}.



Figura 5. Signo de Romaña. Fase aguda de la enfermedad de Chagas, producida por la inoculación accidental de heces del vector infectado con *T. cruzi*. Imagen recuperada de <http://www.cdc.gov>

Fase crónica asintomática

La duración es variable (puede durar de 10 a 30 años o incluso en algunos casos de por vida) ^{24, 26}. Los signos y los síntomas agudos desaparecen de manera espontánea y la parasitemia en sangre periférica se reduce. Los pacientes entran a la fase crónica asintomática después de 2 a 4 meses ²⁷, en la cual la producción de anticuerpos contra *T. cruzi* aumenta ².

Fase crónica sintomática

Alrededor del 30% de las personas infectadas desarrollan la forma crónica de la enfermedad ²⁴. Las lesiones patológicas encontradas en los pacientes crónicos se clasifican de acuerdo al órgano afectado. Las manifestaciones crónicas que se presentan son: 94.5% presenta problemas cardíacos: 38.5% de estos pacientes mueren repentinamente (muerte súbita) y 56% presenta insuficiencia cardíaca, el 5.5% desarrolla síndromes en sistema digestivo como megaesófago o megacolon ²⁸ (fig 6).

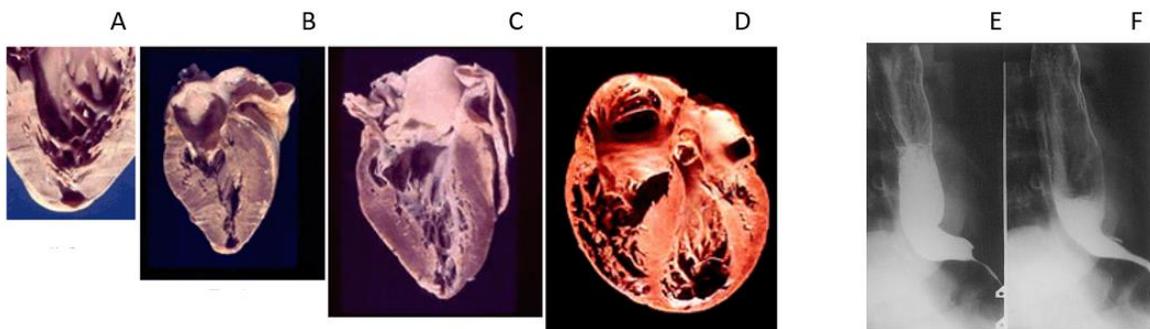


Figura 6. Patología de la cardiopatía chagásica crónica en humanos. A) Corazón de tamaño normal B, C y D) Corazones con peso aumentado y lisis celular. Suárez C, Mota et al. Gac Med Caracas 1999; 107:517-530. Figura E) Esófago normal y F) Megaesófago. Recuperado de <http://www.fac.org.ar/fec/chagas/c11mitel/c11mitel.htm>

Diagnóstico

Fase aguda

Durante la fase aguda, la parasitemia es elevada en circulación periférica. El método más sencillo es la identificación de tripomastigotes por análisis microscópico de una muestra de sangre fresca anticoagulada o de la capa leucocítica. También las extensiones de sangre en gota fina y gota gruesa con tinción de Giemsa permiten la visualización de parásito; sin embargo, cuando la parasitemia es baja, es necesario utilizar métodos de concentración, como el Strout y el microhematocrito con naranja acridina como colorante ^{2, 29}, que es un método utilizado para identificar la infección congénita debido a la alta sensibilidad y la poca cantidad de sangre que se necesita para realizar el estudio, otra opción es la amplificación de DNA de *T. cruzi* ³⁰.

Fase crónica

La fase crónica de la enfermedad de Chagas se diagnostica al identificar la presencia de anticuerpos IgG específicos que reconocen a los antígenos de *T. cruzi* ². Las pruebas convencionalmente incluyen: hemaglutinación indirecta (IHA), inmunoensayos enzimáticos (ELISA) y pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) ³⁰.

También se usan pruebas no convencionales como: tiras reactivas y técnicas de inmunotransferencia (Western blot) para la fase crónica. Estas pruebas se basan en la detección de anticuerpos y en la utilización de nuevas matrices para inmovilizar los antígenos ²⁹.

Confirmación del diagnóstico

En Latinoamérica existen más de 30 pruebas comerciales, incluidas varias que utilizan antígenos recombinantes. Estas pruebas son bastante sensibles y específicas; sin embargo en algunos casos se ha registrado resultados falsos positivos. Es por ello que la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda realizar por lo menos dos análisis en las muestras con diferentes técnicas, la obtención de resultados seroreactivos en ambas equivale a un diagnóstico positivo de la infección por *Trypanosoma cruzi*. En caso de que no haya concordancia en los resultados, se debe realizar una tercera prueba, convencional o no convencional^{2, 29}.

Tratamiento

Los medicamentos tripanocidas, nifurtimox y benznidazol son recomendados para el tratamiento de casos en fase aguda y fase crónica temprana (menores de 15 años) y para pacientes quienes presentan riesgo de reactivación de la infección latente con *T. cruzi*, debido a la inmunosupresión. Sin embargo están contraindicados durante el embarazo¹⁶.

Antecedentes

Variedad genotípica de *T. cruzi*

En diversos estudios, ha sido reconocida la variedad genotípica, fenotípica y de comportamiento biológico que presenta *T. cruzi*. Actualmente existe un consenso por el cual las cepas y los aislados pueden ser clasificados genéticamente en seis unidades discretas tipificadoras (DTU's) referidas como: TcI – TcVI. Algunos de estos grupos se han asociado a ciertas manifestaciones clínicas y de distribución geográfica ³¹.

Las cepas causantes de casos humanos, se han reportado principalmente como: el grupo TcII en el Cono Sur y TcI en Colombia, Venezuela y América Central ^{32, 33, 34}. En México, la mayoría de las cepas de *T. cruzi* que han sido analizadas genéticamente se han reportado como TcI ^{35, 36}.

El aislado TQ de *T. cruzi* utilizado en el presente trabajo se clasifica dentro del grupo TcI ³⁷. Éste aislado fue obtenido en 1991, del vector *Triatoma pallidipennis* en el estado de Morelos, México latitud 18.953, longitud -99.223 región norte centro.

Trypanosoma cruzi es altamente inmunogénico y representa una oferta amplia para el hospedador vertebrado, con proteínas periféricas localizadas en su membrana celular y cuya presencia e inmunogenicidad pueden variar en los diferentes estadios del ciclo biológico del parásito ^{38, 39}, es decir, presentan variaciones en los patrones de expresión de proteínas. Algunas pueden intervenir en la infectividad y sobrevivencia del parásito ⁴⁰.

Biomarcadores

El programa Internacional en seguridad química dirigido por la OMS, ha definido como biomarcador a cualquier sustancia, estructura o proceso que pueda ser medido en el cuerpo o sus productos e influencia o predice la incidencia o resultados de alguna enfermedad ^{41, 42}.

Es por ello que para favorecer y optimizar los resultados respecto a la infección por *T. cruzi* y mejorar la sensibilidad y especificidad de dichas pruebas, minimizando los resultados falsos – positivos y/o falsos- negativos, se recomienda el desarrollo de pruebas con antígenos de cepas locales como biomarcadores específicos, ya que la diversidad de las cepas del parásito ha sido incriminada por este hecho ⁹.

Proteínas de *T. cruzi* en el diagnóstico

Los biomarcadores de *T. cruzi* incluyen diversas proteínas y glicoproteínas aisladas del parásito, así como grupos de proteínas recombinantes, proteínas purificadas de diferentes estadios del parásito así como neoglicoconjugados ⁴³. A partir de éstas se han identificado y desarrollado diversos marcadores de infección, pronóstico y progresión de la enfermedad ⁴⁴ (tabla 1).

Tabla 1. Proteínas de *T. cruzi* con potenciales usos clínicos y epidemiológicos.
Modificada de Marcipar & Lagier (2012) ⁴⁴ y Pinazo (2015) ⁴³

Nombre del antígeno	Peso Molecular en kDa	Observado	Uso
CRA	225	Citoplasma	Infección crónica
FRA	>300	Asociada a citoesqueleto	Infección crónica
F29	29	Flagelo	Monitor de cura
SAPA	----	Familia de las transialidasas	Infecciones agudas y congénitas
rTc24	24	Proteína recombinante	Monitor de cura
Cy-HSP 70	70	Proteína heat shock	Infección crónica/ Marcador de cura

En México diversos grupos de investigación se han enfocado en el estudio de proteínas inmunogénicas e inmunodominantes de aislados mexicanos de *T. cruzi* que puedan ser utilizados como biomarcadores.

Entre ellos, Bucio y colaboradores en 1999, emplearon un extracto antigénico de epimastigotes, tripomastigotes y esferomastigotes de tres cepas mexicanas: Querétaro obtenida de *T. barberi*, Tequesquitengo obtenida de *T. pallidipennis* y Yucatán proveniente de paciente humano, identificaron el reconocimiento específico de sueros de pacientes infectados con *T. cruzi* hacia cinco componentes proteicos con pesos de: 74, 44, 31, 25 y 18 kDa ⁴⁵.

En 2001, Sánchez y colaboradores identificaron siete componentes inmunodominantes con un extracto total de epimastigotes de las cepas mexicanas: Ninoa, Querétaro, Mor 10 y cepa Y de pesos aproximados de: 30, 32, 40, 42, 65 y 70 kDa ⁴⁶.

Otros biomarcadores del parásito, son las proteínas con pesos moleculares entre 30 y 34 kDa, las cuales han mostrado una fuerte reactividad con los

anticuerpos en muestras de suero de pacientes chagásicos y han mostrado una alta sensibilidad y especificidad respecto a los extractos totales del parásito en análisis de Western blot ^{47, 48, 49, 50}.

En 2013, da Costa y colaboradores reportaron una alta sensibilidad, especificidad y reactividad con proteínas de un rango de 30-34 kDa de *T. cruzi* y sueros de pacientes chagásicos ⁴⁷.

Así mismo en nuestro grupo de investigación, Torres y colaboradores al evaluar la reactividad en un panel de 35 sueros positivos a *T. cruzi* identificaron cuatro proteínas inmunodominantes con pesos moleculares de: 27, 32, 34 y 38 kDa, las cuales fueron reconocidas por el 100% y una con el 97% respectivamente. Estas proteínas no son reconocidas por los pacientes sanos y tampoco por pacientes con leishmaniosis, lo que indica que estas proteínas podrían intervenir significativamente en el proceso de infección ⁵¹. Sin embargo, en la actualidad aún se desconoce: la identidad y las propiedades bioquímicas de dichas proteínas.

Anticuerpos como biomarcadores de *T. cruzi*

Uno de las deficiencias en el estudio de la biología humana y las enfermedades, es la carencia de anticuerpos bien validados y caracterizados para muchas proteínas humanas. Esto ha llevado a diversas iniciativas para generarlos ⁵².

En su mayoría, los anticuerpos se han generado contra proteínas, péptidos o epítopes específicos, además han demostrado ser versátiles y una herramienta poderosa para demostrar la identidad molecular en las células y tejidos ⁴.

Actualmente éstos reactivos representan una de las fracciones más grandes dentro de los marcadores biológicos y en algunos casos se encuentran disponibles comercialmente para el diagnóstico de enfermedades como: cáncer, enfermedades inflamatorias e infecciosas ⁵³, sin embargo, el desarrollo de anticuerpos contra proteínas de *T. cruzi* es limitado y existen muy pocos disponibles comercialmente.

En 2014, Cassiano Martin y colaboradores, reportaron la caracterización de un anticuerpo monoclonal de ratón (mAB CZP-315.D9) contra cruzipaina recombinante de *T. cruzi* (TcCruzipain) que específicamente reconoce los reservosomas. Proponiendo su uso como marcador molecular para estudios en la función de este organelo ⁵⁴. Sin embargo, este marcador no se encuentra disponible comercialmente.

Por otra parte, LifeSpan BioSciences Inc., comercialmente dispone de un anticuerpo monoclonal Anti- *Trypanosoma cruzi* LPG (clona Tcr7D3), validado a través de diferentes técnicas: inmunofluorescencia, Western Blot y ELISA, el cual reconoce lipofosfoglicanos (LPG) que migra como una banda homogénea de 42 kDa ⁵⁵. Este anticuerpo fue utilizado por Henao Martínez y colaboradores en cortes histológicos de corazones de ratones para la detección de antígenos de *T. cruzi* ⁵⁶.

Finalmente, es necesario enfatizar algunas de las características ventajosas que presentan los anticuerpos policlonales como: ser dirigidos hacia diferentes sitios de unión de una proteína (epítopes) ⁵⁷ reduciendo así el no reconocimiento hacia un determinante antigénico en caso de un cambio en su estructura química ⁵⁸. Además cabe resaltar que en técnicas de inmunohistoquímica, los anticuerpos

representan una herramienta poderosa ya que combinan alta precisión para la identificación a nivel de proteína, con una alta sensibilidad, además localización celular o incluso a escala subcelular⁴.

Justificación

Trypanosoma cruzi es altamente inmunogénico y presenta una amplia oferta antigénica para el huésped vertebrado, con proteínas localizadas principalmente en la membrana celular³.

En *T. cruzi* se han identificado componentes proteicos inmunodominantes que son reconocidos por hasta el 100% de los sueros de pacientes infectados.

En el avance del conocimiento de *T. cruzi* y su interacción con sus huéspedes, es necesario el desarrollo de herramientas que permitan identificar y evidenciar visualmente a los parásitos y sus componentes específicos. Un recurso importante en el reconocimiento específico de fracciones proteicas y glucoproteicas son los anticuerpos, cuyo desarrollo puede ser inducido a través de inmunizaciones en modelos animales de laboratorio.

La identificación específica de parásitos por técnicas como: la inmunocitoquímica, podría facilitar la elucidación de posibles roles o interacciones entre *T. cruzi* y sus huéspedes, además de servir como base para determinar la importancia de ciertas proteínas como posibles blancos terapéuticos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas utilizando fracciones de proteínas inmunodominantes de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*.

En el presente trabajo se ha propuesto el desarrollo de anticuerpos policlonales contra proteínas inmunodominantes de pesos moleculares de: 27, 34 y 38 kDa de *T. cruzi* del aislado ITRI/MX/1991/TQ y su uso en la técnica de inmunocitoquímica como un primer reporte de inmunoafinidad, para mostrar el reconocimiento en la fase de epimastigote.

Hipótesis

La inmunización en animales con componentes proteicos de *Trypanosoma cruzi*, permitirá la producción de anticuerpos policlonales contra el parásito que podrán ser verificados por Western blot e inmunocitoquímica.

Objetivo general

Obtener anticuerpos policlonales contra componentes inmunodominantes del aislado de *Trypanosoma cruzi* ITRI/MX/1991/TQ.

Objetivos particulares

- I. Seleccionar los componentes inmunodominantes.
- II. Obtener anticuerpos policlonales contra cada componente.
- III. Verificar la detección del componente inmunizado por Western blot.
- IV. Emplear los anticuerpos para la detección del parásito mediante la técnica de inmunohistoquímica.

Materiales y métodos

Cultivo de *T. cruzi*

La expansión parasitaria del aislado de *Trypanosoma cruzi* ITRI/MX/1991/TQ proveniente de *Meccus pallidipennis* (Tequesquitengo, Morelos), se realizó en medio de cultivo Infusión de hígado y triptosa (LIT) suplementado al 5% con suero fetal bovino inactivado. Se monitoreo su crecimiento por siete días hasta observar la fase estacionaria.

Obtención del extracto antigénico de epimastigotes de *T. cruzi*

La extracción proteica se realizó siguiendo la metodología, descrita por Bucio en 1999. El cultivo y cinco lavados se realizaron por centrifugación a 2500 x g por 20 min a 4°C 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); los sobrenadantes fueron desechados en cada paso. El pellet se resuspendió en Tris HCl 50 mM pH 7.4. La lisis celular se realizó por sonicación utilizando un procesador ultrasónico Vibra Cell-7 pulsos de 1 min y se centrifugó a 43 000 g. Se recuperó la fracción soluble y se almacenó en congelación hasta su uso.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de ácido biciconínico, empleando el kit comercial BCA Protein Assay Kit de Pearce. Se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina en un rango de 0 a 2000 µg/mL en diferentes diluciones con PBS pH 7.2. La curva patrón y las muestras problema (extracto proteico) se colocaron por triplicado en una microplaca de poliestireno de 96 pozos, se colocaron 200 µl por pozo de la mezcla de reactivos del kit, se incubó durante 30 minutos y se realizó la lectura a 562nm en un espectrofotómetro para microplacas Epoch de Biotek. Las concentraciones finales se obtuvieron al aplicar a los valores obtenidos la ecuación de la recta.

SDS- PAGE

La separación de los componentes antigénicos del extracto de epimastigotes de *T. cruzi* se realizó por electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida: gel concentrador al 5% y gel separador al 10%. Se utilizó Precision Plus Protein Standards Dual Color de Bio-Rad como marcador de peso molecular (10- 250 kDa). Se agregaron 180 µg de proteína por gel (9 pozos con 20 µg cada uno) en dilución 1:1 con buffer de muestra (trizima-base 0.5M pH 6.8, Glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 0.5%, β-mercaptoetanol 1:100) por carril y se corrió en una cámara de electroforesis Bio Rad® (Mini Protean III) a 100 volts por aproximadamente 90 minutos.

Electroinmunotransferencia y selección de componentes inmunodominantes

La técnica de electroinmunotransferencia se realizó siguiendo la metodología, descrita por Towbin en 1979. La transferencia de las proteínas del gel de acrilamida a la membrana de nitrocelulosa de 0,2µm se realizó con buffer de transferencia (Tris base 25mM, Glicina 192mM, 20% de Metanol y agua destilada) en el Trans Blot Turbo de Bio Rad a 15 V por 30 minutos. Se verificó la presencia de proteínas con colorante rojo de Ponceau y se escindieron las bandas de los componentes inmunodominantes previamente seleccionadas por Torres en 2015 ⁵¹.

Inmunización de conejos hembra Nueva Zelanda

Cuatro conejos hembra Nueva Zelanda proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM con un rango de peso de 3.200 a 3.700 kg fueron inmunizados subcutáneamente con:

- 1) Extracto total del parásito
- 2) Componente *T. cruzi* de 27 kDa
- 3) Componente *T. cruzi* de 34 kDa
- 4) Componente *T. cruzi* de 38 kDa

El protocolo de inmunización se realizó en 6 ocasiones consecutivas cada 15 días. La primer inmunización se realizó en proporción 1:1 con DMSO y Adyuvante completo de Freund, las posteriores inmunizaciones se realizaron con Adyuvante incompleto de Freund. Los conejos fueron mantenidos con alimento y agua *ad libitum*.

Obtención de sueros de conejo

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de la vena marginal de la oreja previamente rasurada y desinfectada antes de cada inmunización, los conejos fueron anestesiados en cada caso. Al finalizar el protocolo de inmunización se realizó punción cardiaca. En ambos casos el suero se separó por centrifugación a 3,500 rpm por 15 minutos. Los sueros se almacenaron en congelación hasta su uso. Esto se realizó apegándose a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

Inmunoblot con sueros de conejo (Western- blot)

El corrimiento electroforético y electrotransferencia se realizaron de acuerdo a los procedimientos previamente descritos. Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con PBS pH 7.2/ Tween 20 0.03%/ Leche semidescremada 5% durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación ligera. En seguida se agregó el suero de los conejos experimentales en dilución 1:100 incubando a 4°C toda la noche. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 0.03% y se agregó Proteína A conjugada a peroxidasa (BioRad) en dilución 1:20,000 por 2 horas en agitación ligera a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 0.03% y se reveló con 3- 3' Diaminobenzidina, en oscuridad por aproximadamente 5 minutos. Se detuvo la reacción con agua destilada.

Purificación de anticuerpos de conejo

La purificación de anticuerpos de conejo se realizó con el kit PROSEP-A Media Plug de Millipore Montagé siguiendo las instrucciones del proveedor.

Fijación de parásitos

Los epimastigotes de *T. cruzi* se cultivaron en medio LIT suplementado al 5% con suero fetal bovino inactivado, Se monitoreó su crecimiento por siete días hasta observar la fase exponencial. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS 1X pH 7.2, se repitió el procedimiento, posteriormente se cuantificó la masa húmeda y se agregaron 9ml de PBS pH 7.2-formol al 1% por cada gramo de masa húmeda, se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas y se agregaron 2 volúmenes de PBS (1:1000), se dejó estabilizar a 4°C por 48 horas.

Para la microscopía confocal se fijaron portaobjetos para inmunofluorescencia de 12 pozos con 10 µl de la solución con epimastigotes (en cada uno de los pozos), se dejó secar a 37°C por 90 minutos, cada uno de los portaobjetos se pasó tres veces consecutivas sobre la flama, enseguida se colocaron en un vaso Coplin y se lavaron con agua destilada durante 5 minutos en agitación rotatoria, se secaron a temperatura ambiente y almacenaron a 4°C hasta su uso.

Inmunocitoquímica

Estandarización de anticuerpos policlonales (27 y 34 kDa)

Se utilizaron las laminillas previamente fijadas con epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Se dejaron a temperatura ambiente por 5 minutos y se realizaron seis lavados con PBS 1X pH 7.4. El bloqueo se realizó con 5 µl/pozo de solución de albúmina libre de IgG al 2% en PBS, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se realizaron seis lavados con PBS y posteriormente tres lavados con solución de Tritón X-100 al 0.2% y nuevamente seis lavados con PBS. Los anticuerpos primarios se incubaron en diferentes diluciones con PBS 1:0, 1:5 y 1:10 laminilla 1 con anticuerpos de 34 kDa y laminilla 2 con anticuerpos de 27 kDa, toda la noche a 4°C en cámara húmeda y en oscuridad.

Se enjuagó seis veces con PBS 1X y se incubó por 1 hora a 4°C en cámara húmeda y en oscuridad con el anticuerpo secundario anti- conejo- FITC en dilución 1:200 en PBS- albúmina al 1%. Se enjuagó seis veces con PBS 1X, una vez con Triton X-100 al 0.1%, seis veces con PBS 1X y una vez con agua destilada, se dejaron secar y se colocaron 2.5 µl/pozo de VectaShield- DAPI, se colocó el cubreobjetos y se selló con barniz. Las laminillas se almacenaron a 4°C en cámara húmeda y oscuridad hasta su observación en el microscopio confocal.

Resultados

Electroforesis de proteínas

Se obtuvieron 4 mL de un extracto de epimasigotes de *Trypanosoma cruzi* del aislado TQ con una concentración proteica total de 2441.295 µg/mL.

Para la determinación del perfil proteico se cargaron 20 µg de proteína en dilución 1:1 con buffer de muestra en un gel discontinuo de acrilamida. Posteriormente mediante la tinción con azul de Comassie se identificaron 13 bandas distinguibles entre un rango de 10 a 250 kDa (Fig. 8).

Se identificaron principalmente las bandas de los componentes inmunodominantes de 27, 34 y 38 kDa de *T. cruzi*, para generar anticuerpos policlonales. Estas proteínas son de interés porque son reconocidas por pacientes chagásicos con sensibilidad y especificidad cercanas al 100%.

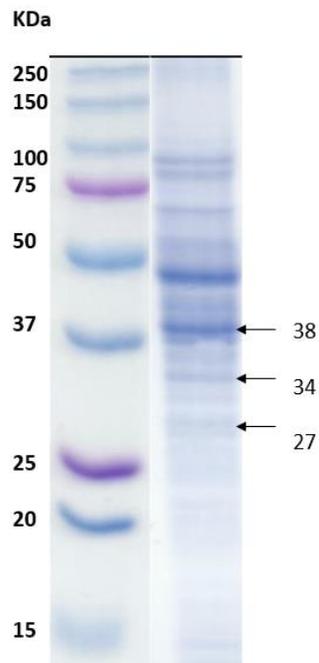


Figura 8. Perfil proteico de *T. cruzi* con 20 µg de proteína en gel de 1D en un gel discontinuo de acrilamida (5% separador; 10% concentrador). El marcador de peso molecular se muestra a la izquierda y se expresa en kDa. Las flechas indican las bandas seleccionadas para la inmunización.

Inmunizaciones y Western blot

Previo a realizar las inmunizaciones con los componentes inmunodominantes de *T. cruzi*, se realizó la prueba de Western blot para el análisis de sueros pre-inmunes de conejo, con el fin de demostrar la ausencia del reconocimiento hacia alguna proteína perteneciente al extracto proteico de *T. cruzi*. En la fig. 9 se muestra un inmuno blot con proteínas de *T. cruzi*, en donde se muestra el reconocimiento de suero positivo de conejo a *T. cruzi*, así como la ausencia en el reconocimiento con los sueros de los conejos proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Medicina.

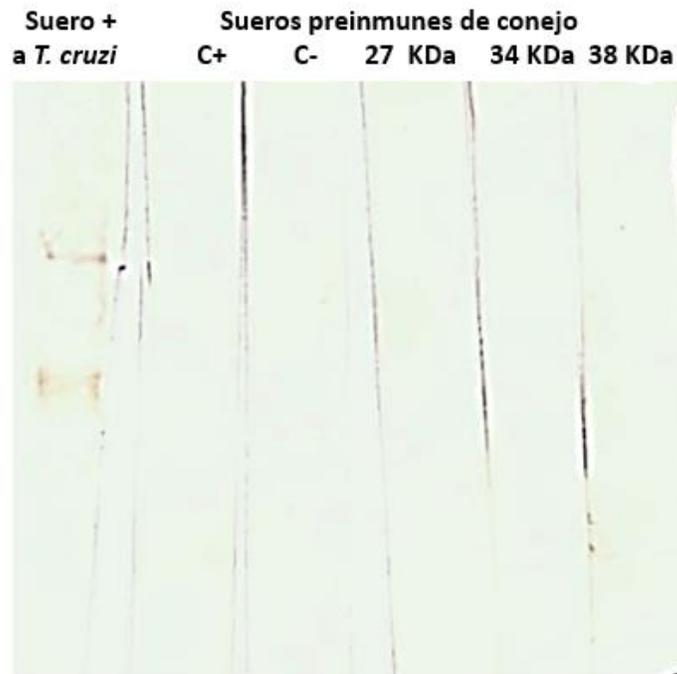


Figura 9. Western blot análisis del extracto proteico de *T. cruzi* con los sueros preinmunes de conejos. 1) Incubación con suero positivo a *T. cruzi*, muestra el reconocimiento de proteínas de epimastigotes de *T. cruzi*. Sueros de conejos preinmunes, en donde se demuestra la ausencia de reconocimiento contra las proteínas de *T. cruzi*.

Posterior a cada inmunización se realizaron nuevamente los ensayos de Western blot para mostrar la progresión del reconocimiento hacia los componentes de 27, 34 y 38 kDa de *T. cruzi*. En la fig. 10 se muestra la producción de los anticuerpos de 27 y 34 kDa y el control positivo (proteínas totales del parásito).

Sin embargo, el conejo inmunizado con la proteína de 38 kDa no produjo los anticuerpos, ya que en la prueba de Western blot no se observó algún reconocimiento hacia los componentes de estos pesos moleculares.

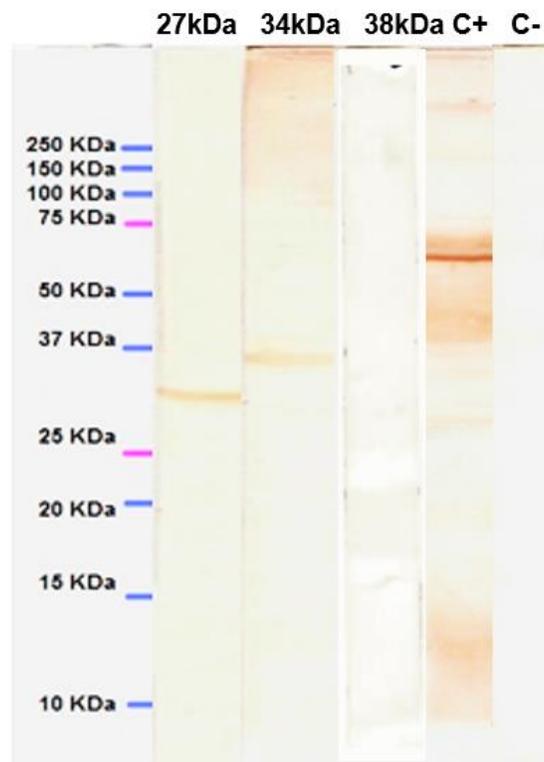


Figura 10. Análisis de sueros de conejos inmunizados con el extracto total proteico de epimastigotes de *T. cruzi* y componentes inmunodominantes de: 27, 34 y 38 kDa. Transferencia a partir de un gel discontinuo de acrilamida al 12.5% cargado con 20 μ g de proteína por pozo e incubado con sueros en concentración 1:100.

A continuación se realizó la cuantificación proteica de ambos anticuerpos policlonales denominados como: anti-TC 27 (27kDa) y anti-TC34 (34kDa) mediante el kit comercial BCA Protein Assay. Para los anticuerpos de anti-TC27 se obtuvo una concentración de 4704.667 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para la muestra de anticuerpos contra anti-TC34 una concentración de 9464.667 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Una vez conocida la concentración proteica de cada uno de los anticuerpos policlonales, se diluyeron a una concentración de 1mg/mL. Cada dilución se realizó para continuar con el ensayo de estandarización de la técnica de inmunocitoquímica.

Estandarización de los anticuerpos policlonales anti- TCQ27 y anti- TCQ 34

A partir de los sueros en concentración de 1mg/mL se realizaron diluciones consecutivas: sin diluir, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50; 1:100 y 1:200, estas diluciones se probaron por duplicado para la estandarización de la técnica de inmunocitoquímica.

En la fig. 11 se muestra el reconocimiento del anticuerpo anti- TCQ27 hacia *T. cruzi*, en la primer columna se observa la fluorescencia verde correspondiente al reconocimiento del anticuerpo policlonal anti-TC27, en la segunda columna se muestra la fluorescencia azul con DAPI correspondiente al núcleo, en la tercer columna se visualiza el empalme entre ambas fluorescencias. Se observa una mejor fluorescencia y mayor señalización en la imagen A de la fig. 11, en este ensayo el anticuerpo policlonal anti-TC27 se utilizó sin diluir (equivalente a 5 μg), en el ensayo de la imagen D se colocó el anticuerpo policlonal anti-TC27 en dilución 1:5, se observa una fluorescencia menor, sin embargo aún es visible, pero no satisfactoria para el objetivo planteado, finalmente en la imagen G podemos observar la ausencia de fluorescencia.

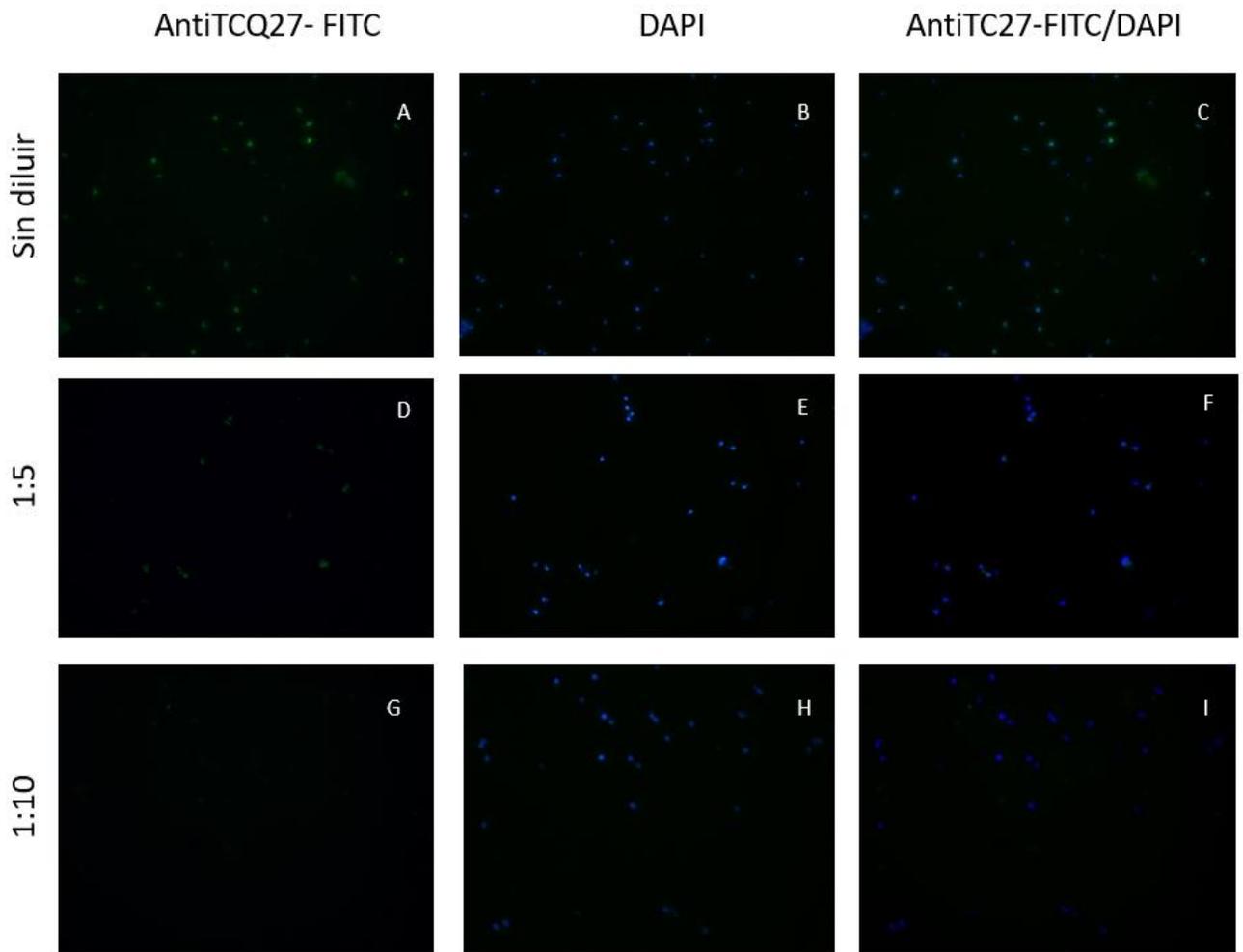


Figura 11. Titulación del anticuerpo policlonal anti-TC27, mediante la técnica de inmunocitoquímica en epimastigotes de *T. cruzi*, en donde se muestra la fluorescencia en tres diluciones. Fig. A. Anti-TC27-FITC sin diluir equivalente a 5 μ g. Fig. D. Anti-TC27-FITC en dilución 1:5. Fig. G. Anti-TC27-FITC en dilución 1:10. Figs. B, E y H. Se muestra la tinción de núcleos con DAPI. Figs. C, F e I. Se muestra el empalme de Anti-TC27-FITC y DAPI.

Por otra parte los resultados muestran satisfactoriamente la distribución general del anticuerpo policlonal anti-TC27 hacia *T. cruzi*, se observa que existe un reconocimiento predominante en la región del cinetoplasto (fig. 12).

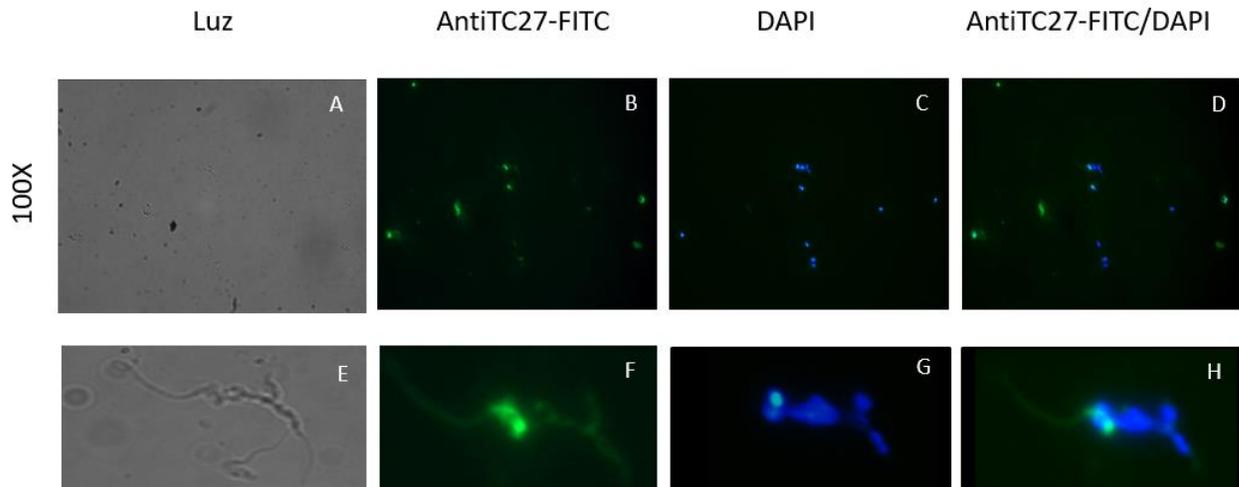


Figura 12. Imagen representativa de epimastigotes de *T. cruzi*. A y E) Epimastigotes observados con luz normal B) Epimastigotes con el anticuerpo policlonal anti-TC27- FITC C) Tinción- DAPI D) Superposición de las tinciones con anti- TC27-FITC y DAPI. E, F y G) Acercamiento de epimastigotes de *T. cruzi* H) Superposición de ambas fluorescencias, en donde se muestra la distribución de reconocimiento de anti-TC27 en cinetoplasto.

En la fig. 13 en la imagen A se observa el reconocimiento anti- TC34- FITC hacia *T. cruzi*, en la imagen B, se observa en azul la fluorescencia de núcleos de *T. cruzi* mediante la tinción con DAPI, en la imagen C se observa el empalme entre A y B. En el reconocimiento anticuerpo anti-TC34 hacia *T. cruzi* fue significativamente menor en el ensayo en el cual se colocó anti-TC34 sin diluir (5 μ g) con respecto a anti-TC27 (Fig. 13).

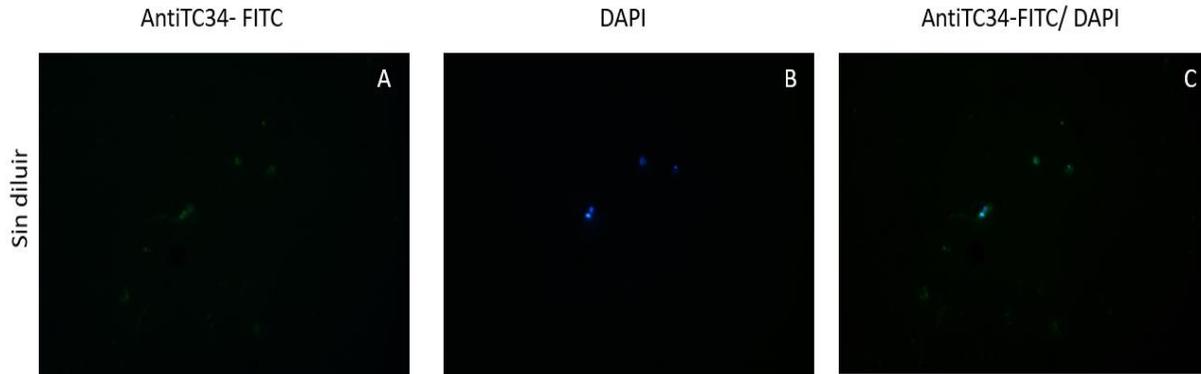


Figura 13. Imagen representativa de la titulación del anticuerpo policlonal anti-TC34, mediante la técnica de inmunocitoquímica en epimastigotes de *T. cruzi*
A) Epimastigotes de *T. cruzi* con anticuerpo policlonal anti-TC34 sin diluir (equivalente a 5 μ g) B) Tinción de núcleos con DAPI C) Superposición de la tinción con anti- TC34-FITC y DAPI

Se observa que el reconocimiento del anticuerpo policlonal anti-TC34 hacia epimastigotes de *T. cruzi*, se da en la región del citoplasma (fig. 14).

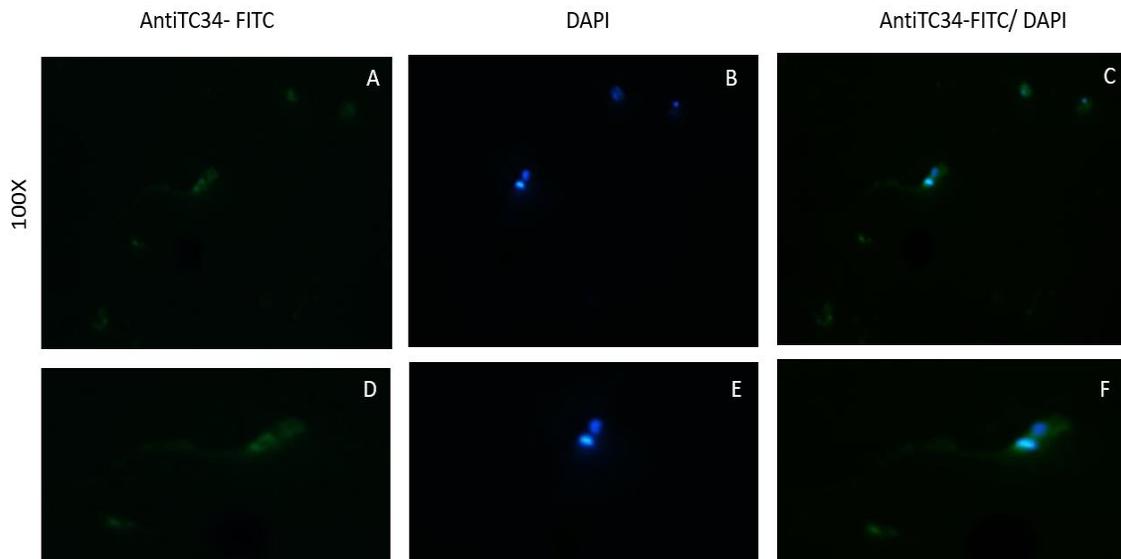


Figura 14. Imagen representativa de epimastigotes de *T. cruzi*. A) Epimastigotes con el anticuerpo policlonal anti-TC34- FITC B) Tinción- DAPI C) Superposición de las tinciones con anti- TC34-FITC y DAPI. D, E y F) Acercamiento de epimastigotes de *T. cruzi* F) Superposición de ambas fluorescencias, en donde se muestra la distribución de reconocimiento de anti-TC34 en la región del citoplasma.

Discusión

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas, la cual se diagnostica principalmente en la fase crónica por técnicas serológicas.

Existen diferentes biomarcadores y pruebas para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, tanto caseras como comercialmente disponibles; sin embargo los marcadores específicos para el reconocimiento del parásito en técnicas de microscopía son muy escasos.

En el estudio de *T. cruzi* y su interacción con sus huéspedes, es necesario el desarrollo de herramientas que permitan identificar y evidenciar visualmente a los parásitos y sus componentes de forma específica. Un recurso importante en el reconocimiento específico de proteínas y glicoproteínas son los anticuerpos.

Los anticuerpos contra proteínas, péptidos o epítopes específicos, han mostrado ser una herramienta sensible y poderosa para mostrar la identidad molecular de las células y tejidos empleando técnicas como la inmunocitoquímica e inmunofluorescencia. Además se conoce que las macromoléculas más inmunogénicas son las proteínas. Con estos antecedentes se sugiere la selección de las proteínas para la producción de anticuerpos policlonales y su uso en la técnica de microscopía ⁴.

En este trabajo, se seleccionó la cepa mexicana TQ de *T. cruzi* para su cultivo y obtención del extracto proteico, ya que ha mostrado mayor inmunogenicidad que otros aislados, como se comprobó en el trabajo de Bucio en 1999 ⁴⁵, además de haber sido empleada en el trabajo de Torres en 2015 ⁵¹ donde se reportaron los componentes de interés.

Debido a que solo se conoce el peso molecular de los componentes proteicos inmunodominantes, pero no su identidad y solo nos es posible obtenerlo en una mezcla compleja con otras proteínas, se decidió emplear un método sencillo de purificación mediante separación de electroforesis en geles de poliacrilamida. Una vez que se identifica el componente de interés por el peso molecular, es posible cortarlo directamente para la inoculación ⁵⁹; sin embargo este método representa

inconvenientes tanto en la purificación del componente, como en el daño tisular en los animales como: granulomas y abscesos en el sitio de inoculación debido a la presencia de SDS ^{60, 61, 62, 63}. A pesar de que es posible eliminar estos componentes dañinos mediante electroelución, se decidió buscar otra alternativa, debido a la pérdida de gran cantidad de proteína que implica este proceso. Se ha reportado la inmunización con proteínas transferidas a una matriz de celulosa, que resulta una alternativa ventajosa debido a que permite la localización del componente, solubilizarlo fácilmente con DMSO e inocularlo en su totalidad ⁶³.

El conejo es una de las especies animales más utilizadas para la producción de anticuerpos, resulta conveniente debido a su tamaño, fácil manipulación y obtención de sangre, lo cual permite obtener una buena cantidad de suero y por lo tanto de anticuerpos. Adicionalmente presenta la ventaja de que existen comercialmente gran cantidad de anticuerpos secundarios anti- conejo conjugados a diversos marcadores y enzimas, lo que facilita su uso en diferentes sistemas de detección.

Los anticuerpos son producidos por las células B, como parte de la respuesta humoral. Los beneficios de producir anticuerpos policlonales en conejos, es que esta mezcla de anticuerpos resultantes pueden reconocer una variedad de epítopes sobre el antígeno, permitiendo el reconocimiento de los componentes con una mayor tolerancia a cambios menores en el antígeno, por ejemplo ligeras desnaturalizaciones ^{4, 64, 65}.

Como parte de la validación de la producción de anticuerpos, al inicio de la fase experimental, se tomaron muestras de sueros preinmunes a los conejos. Estas muestras fueron probadas mediante la técnica de Western blot, ya que provee una alta especificidad en el reconocimiento antígeno- anticuerpo. Como se pueden observar los resultados, no mostraron ningún reconocimiento hacia los antígenos de *T. cruzi*.

Posterior al protocolo de inmunizaciones subcutáneas, se realizó nuevamente el análisis de los sueros, con la finalidad de: 1) Verificar la presencia de anticuerpos hacia *T. cruzi* y 2) verificar que el rango del peso molecular fuese el correspondiente a la proteína inmunizada.

Como resultado de la inmunización de los componentes proteicos unidos a la membrana de nitrocelulosa, se produjo una respuesta inmune específica y se mostró la pureza lograda en el aislamiento de los componentes de 27 y 34 kDa. Esto se evidencia en los resultados del Western- blot, en el cual el suero de cada conejo reconoce una banda cuyo peso molecular corresponde al del componente con el que fueron inmunizados. Sin embargo, el suero del conejo inoculado con el componente de 38 kDa no mostró desarrollo de alguna reactividad. Una posible explicación a este suceso es que la concentración mínima del antígeno de 38 kDa pudo no ser suficiente para el reconocimiento antígeno- anticuerpo y como consecuencia que no se produjera una respuesta de memoria hacia dicho componente. En cada caso, las fracciones proteicas utilizadas se contabilizaron por membrana de nitrocelulosa, sin embargo al ser tomadas de un extracto total no era posible conocer la concentración de cada componente escindido. Debido a estas características de la técnica de inmunización, es poco probable que la ausencia de respuesta se debiera a la generación de tolerancia, ya que esta se puede presentar cuando hay un exceso de inmunógeno. Por otra parte, a pesar de que los componentes seleccionados mostraron inmunodominancia en el humano, no debe olvidarse que un mismo antígeno puede tener diferente inmunogenicidad en diferentes organismos, por lo que la respuesta del conejo puede no ser la misma.

En los años 40-50, Coons introdujo las técnicas basadas en la conjugación de anticuerpos con fluorocromos para la detección de la reacción antígeno – anticuerpo. La inmunofluorescencia es esencialmente un método inmunocito e histoquímico de alta sensibilidad que resulta de particular utilidad selección de anticuerpos cuyo uso posterior sea, precisamente, la detección de antígenos celulares por técnicas inmunohistoquímicas ⁶⁶. Uno de los objetivos del presente trabajo fue emplear los anticuerpos producidos en técnicas de inmunofluorescencia.

La técnica de Inmunofluorescencia, se utilizó para verificar la reactividad de los anticuerpos Anti-TC27-FITC y Anti-TC34-FITC contra el parásito completo, así como la distribución de las proteínas de interés (inmunógenos). Para evidenciar la reacción antígeno- anticuerpo se utilizó el anticuerpo secundario anti- FITC.

T. cruzi es un protozooario altamente inmunogénico, ya que presenta una membrana rica en glicoproteínas de gran importancia para su supervivencia, como: transialidasas y mucinas, que además constituyen el primer contacto con sus huéspedes. Durante la infección en el humano, se ha reportado que gran cantidad de anticuerpos están principalmente dirigidos hacia los epítopes alfa galactosil presentes en la mayoría de las mucinas de los tripomastigotes⁶⁷. La presentación antigénica promueve una fuerte pero tardía respuesta inmune que es permite controlar el nivel de parasitemia, pero no elimina por completo la infección. Esta respuesta inmune tardía e inefectiva se atribuye a la gran cantidad de antígenos polimórficos que son simultáneamente expresados por el parásito^{68, 69}. Por lo anterior, se esperaba que los anticuerpos desarrollados contra los componentes inmunogénicos reconocieran principalmente la membrana celular de *T. cruzi*.

Sin embargo, los resultados de la prueba de inmunofluorescencia mostraron reconocimiento de Anti-TC27 y Anti-TC34 en la región del cinetoplasto y en citoplasma, respectivamente. El reconocimiento de componentes internos del parásito por el sistema inmune, puede ocurrir cuando los parásitos son lisados dentro de células fagocíticas, lo que permite su presentación antigénica por el Complejo Mayor de Compatibilidad de clase I (MHC) a través de la vía endógena^{70, 71}.

Estos anticuerpos están presentes en altas concentraciones durante la infección aguda y en toda la fase crónica y son los marcadores para la infección en humanos⁷². Sin embargo, los resultados de la prueba de inmunocitoquímica mostraron reconocimiento de Anti-TC27-FITC y Anti-TC34-FITC en la región del cinetoplasto y en citoplasma, respectivamente. Este reconocimiento posiblemente se produce porque el sistema inmune provoca la lisis de los parásitos y se da la presentación antigénica, liberando componentes internos de *T. cruzi*, dejándolos

disponibles para la presentación por el Complejo Mayor de Compatibilidad de clase I (MHC) a través de la vía endógena ^{70, 71}. Esta presentación promueve una fuerte pero tardía respuesta inmune CD8+ que es altamente efectiva para controlar el nivel de parasitemia, pero solo es evidente después de 5-6 días de la infección ^{69, 73, 74, 75, 76}. La respuesta inmune tardía anti- *T. cruzi* posiblemente sea porque se necesita una mayor cantidad de antígenos o por un gran número de diferentes antígenos polimórficos que son simultáneamente expresados por el parásito ⁶⁹.

Actualmente la identidad de las fracciones proteicas empleadas en este estudio son desconocidas. Existen algunos estudios de otros grupos de trabajo que identifican componentes inmunogénicos con pesos moleculares cercanos a 27 y 34 kDa; Sánchez y colaboradores que identifican proteínas en un rango de peso molecular de 30 a 38 kDa con reconocimiento de sueros de pacientes chagásicos; sin embargo, no investigan la identidad de éstas ⁴⁶.

Da Costa y colaboradores realizan un reporte con enfoque proteómico de inmunoafinidad e identifican proteínas con pesos moleculares entre 30 y 34 kDa y algunos de los componentes fueron identificados como: prostaglandina F₂- α sintetasa y metiladenosina fosforilasa ⁴⁷. Sin embargo, este estudio no mostró la localización de dichas proteínas en el parásito.

En este primer acercamiento nos permitió mostrar la utilidad del desarrollo de anticuerpos específicos que reconozcan componentes del parásito; sin embargo, también nos señala la necesidad de continuar con los estudios que permitan conocer la identidad de las proteínas de 27 y 34 kDa empleadas en este estudio. Ya que al no corresponder a las glicoproteínas mayoritarias de membrana, su papel en los mecanismos de infección de *T. cruzi* en el humano resultan de gran interés para explicar a qué se debe que sean extensamente reconocidos por los sueros de pacientes chagásicos. Otro aspecto interesante es que dado su éxito como antígenos en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, podrían ser emplearlos en el desarrollo de estuches de diagnóstico comerciales.

Conclusiones

La inmunización de conejos con componentes proteicos de *T. cruzi* permitió la producción de anticuerpos policlonales contra los componentes inmunodominantes de 27 y 34 kDa.

El empleo de estos anticuerpos policlonales contra *T. cruzi*, mediante la técnica de inmunocitoquímica permitió observar el reconocimiento hacia el epimastigotes de *T. cruzi*.

Observamos por primera vez el reconocimiento del anti-TC27 que sugiere su unión en la zona que corresponde al cinetoplasto y por otra parte el reconocimiento anti-TC34 sugiere su presencia en citoplasma.

Perspectivas

Será necesario realizar ensayos de inmunocitoquímica con las diferentes morfologías de *Trypanosoma cruzi* y determinar si el reconocimiento antígeno-anticuerpo se da en la misma intensidad o existe alguna diferencia, ya que esto podría ayudar a elucidar posibles roles de virulencia.

Además si presentase afinidad hacia el estadio de amastigote se podría utilizar en preparaciones *post mortem* principalmente en personas con afecciones cardíacas para facilitar el diagnóstico y contribuir a mejorar los datos epidemiológicos cuyo reporte es escaso de acuerdo con Ramsey ⁷⁷.

Los resultados muestran que el reconocimiento antígeno- anticuerpo anti-TC27 es afín hacia el cinetoplasto, mientras que el reconocimiento con anticuerpos de anti-TC34 se observa afinidad en citoplasma, para mostrar una localización específica será necesario el uso de técnicas de biología celular como microscopía electrónica en la que se observen los diferentes organelos de *T. cruzi* y comprobar la unión específica del anticuerpo en dichas localizaciones y conocer si existe algún reconocimiento más de éstos anticuerpos hacia algún otro organelo.

La especificidad de los anticuerpos anti-TC27 y anti-TC34 (27 y 34 kDa) hacia *Trypanosoma cruzi* es muy alta y diferentes grupos de investigación encuentran algunos de pesos similares, lo cual sugiere el uso potencial de estos anticuerpos para el desarrollo de estuches diagnósticos.

Para precisar aún más el reconocimiento antígeno - anticuerpo, será necesario separar a las proteínas de *T. cruzi* de acuerdo a su peso molecular y punto isoeléctrico, realizar electroinmunotransferencias y posteriormente ensayos de Western blot con sueros de pacientes chagásicos para conocer: 1) Si el reconocimiento entre antígeno-anticuerpo se presenta con la misma especificidad o si el reconocimiento entre ambos se da con mayor especificidad hacia algunos componentes proteicos de nuestras bandas seleccionadas (27 y 34 kDa) y 2) identificar bioquímicamente los dots más significativos en cuanto al reconocimiento

antígeno-anticuerpo. Este reconocimiento nos podría ayudar a comprender los mecanismos infectivos del parásito en el huésped humano, además facilitará el desarrollo de blancos terapéuticos para el diseño de fármacos y la comprensión de los mecanismos de infección producidos por este patógeno.

Finalmente para una mayor especificidad en la producción de éstos anticuerpos, se requerirán técnicas de biología molecular recombinante, para realizar vectores de clonación, además con el uso de cepas mutantes se podrá conocer si la expresión o supresión de tales proteínas están regulando a otras proteínas vitales en el desarrollo del parásito, esto será relevantes para conocer la función biológica del patógeno.

Referencias

1. Chagas, C. (1909). **Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), 159-218.
2. Harrison, T. R. (2009). **Principios de Medicina Interna.** 17^a.
3. Rivero, A. R. D. L., Tamoy, M. N. F., Leal, E. T., Aguilera, M. C. N., & Alvarez, V. T. C. (2001). **Purificación parcial y empleo de fracciones glicosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.** *Acta Científica Venezolana*, 52, 235-247.
4. Ivell, R., Teerds, K., & Hoffman, G. E. (2014). **Proper application of antibodies for immunohistochemical detection: antibody crimes and how to prevent them.** *Endocrinology*, 155(3), 676-687.
5. Angheben, A., Anselmi, M., Gobbi, F., Marocco, S., Monteiro, G., Buonfrate, D., Tais, S., Talamo, M., Zavarise, G., Strohmeyer, M., Bartalesi, F., Mantella, A., Tommaso, M. D., Aiello, K. H., Veneruso, G., Graziani, G., Ferrari, M. M., Spreafico, I., Bonifacio, E., Gaiera, G., Lanzafame, M., Mascarello, M., Cancrini, G., Albajar-Viñas, P., Bisoffi, Z., & Bartolini, A. (2011). **Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence.** *Euro Surveill*, 16, 6-13.
6. World Health Organization (2013) **Tropical Disease Research. Program for research and training tropical disease (TDR).** Fact sheet N° 340. Updated March 2013. Geneva: *World Health Organization*.
7. Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., de Alba-Alvarado, M. C., Castillo-Saldaña, D. R., Zenteno-Galindo, E. A., Rojo-Medina, J., Fernández-Santos, N. A., Perera-Salazar, M. G. (2016). **Enfermedad de Chagas en México.** *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*
8. Andrade, D. V., Gollob, K. J., & Dutra, W. O. (2014). **Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), e3010.
9. **¿De qué hablamos cuando hablamos de Chagas?** Consultada en Marzo del 2016. <http://www.hablamosdechagas.com.ar/info-chagas/que-es-el-chagas/dimension-epidemiologica/>
10. Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M.D. & Kirk, P. M. (2015). **A higher level classification of all living organisms.** *PloS one*, 10(4), e0119248.
11. Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R. E., McKerrow, J., Reed, S. & Tarleton, R. (2008). **Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases.** *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1301-1310.
12. Guzmán-Marín, E., Zavala-Castro, J., Acosta-Viana, K., & Rosado-Barrera, M. (1999). **Importancia de la caracterización de cepas de**

- Trypanosoma cruzi*. *Revista Biomédica*, 10(3), 177-184.
13. Haro Arteaga, I. D., Salazar Schettino, P. M., Cabrera Bravo, M. (1995). **Diagnóstico morfológico de las parasitosis** (No. Sirsi) i9789686596519).
 14. Fernandes, M. C., & Andrews, N. W. (2012). **Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence.** *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3), 734-747.
 15. **Centers for Disease Control and Prevention** Consultada en septiembre de 2015 <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>
 16. Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). **Chagas disease.** *The Lancet*, 375(9723), 1388-1402
 17. Justi, S. A., Galvão, C., & Schrago, C. G. (2016). **Geological Changes of the Americas and their Influence on the Diversification of the Neotropical Kissing Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae).** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(4), e0004527.
 18. Salazar Schettino, P. M., Rojas Wastavino, G. E., Cabrera Bravo, M., Bucio Torres, M. I., Martínez Ibarra, J. A., Monroy Escobar, M. C., Rodas-Retana, A., Guevara-Gómez, Y., Vences-Blanco, M. O., Ruíz-Hernández, A. L. & Torres Gutiérrez, E. (2010). **Revisión de 13 especies de la familia Triatominae [(Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas, en México.** *Journal of the Selva Andina Research Society*, 1(1), 57-81.
 19. UNAM, F. de M., & OPS, O. (2006) **Manual para el diagnóstico de la Infección por *Trypanosoma cruzi*.** México: OPS/OMS.
 20. Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. J., & Montgomery, S. P. (2011). ***Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States.** *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 655-681.
 21. Pereira, K. S., Schmidt, F. L., Guaraldo, A., Franco, R., Dias, V. L., & Passos, L. A. (2009). **Chagas' disease as a foodborne illness.** *Journal of Food Protection®*, 72(2), 441-446.
 22. Nóbrega, A. A., Garcia, M. H., Tatto, E., Obara, M. T., Costa, E., Sobel, J., & Araujo, W. N. (2009). **Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil.** *Emerging Infectious Diseases*, 15, 4.
 23. Bastos, C. J., Aras, R., Mota, G., Reis, F., Dias, J. P., de Jesus, R. S., Freire, M. S., de Araujo, E. G., Prazeres, J., & Grassi, M. F. R. (2010). **Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(6), e711.
 24. **Recursos en Parasitología. Departamento de Microbiología y Parasitología, UNAM.** Consultada Mayo de 2016 www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/
 25. Teixeira, A. R., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., & Nitz, N. (2011). **Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity.** *Clinical Microbiology Reviews*, 24(3), 592-630.
 26. Messenger, L. A., Miles, M. A., & Bern, C. (2015). **Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease.** *Expert review of anti-infective therapy*, 13(8), 995-1029.
 27. Vidaurre R. T., Córdova L. G., Pérez V. L., Córdova B.E., Saldías V. J., & Vivar M. A. (1999). **Enfermedad de Chagas en sujetos asintomáticos**

- con y sin alteraciones electrocardiográficas en una zona endémica. *Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 12(3), 131-42.
28. Prata, A. (2001). **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.** *The Lancet Infectious Diseases*, 1(2), 92-100.
 29. OMS, S. D. I. T. (2002). **Control de la Enfermedad de Chagas. Segundo informe del Comité de Expertos de la OMS.** Ginebra, 38.
 30. Verani, J. R., Seitz, A., Gilman, R. H., La Fuente, C., Galdos-Cardenas, G., Kawai, V., de la Fuente, E., Ferrufino, L., Browman, N. M., Levy, M. Z. Steurer, F., Todd, C. W., Kirchoff, L. V., Cabrera, L., Verastegui, M. & Bern, C. (2009). **Geographic variation in the sensitivity of recombinant antigen-based rapid tests for chronic *Trypanosoma cruzi* infection.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(3), 410.
 31. Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages- Silva, E., Machado, C. R, Andradel, S. G. & Sturm, N. R. (2012). **The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications.** *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240-253.
 32. Añez, N., Crisante, G., da Silva, F. M., Rojas, A., Carrasco, H., Umezawa, E. S., Stolf, A. M. S., Ramírez, J. L. & Teixeira, M. M. (2004). **Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease.** *Tropical Medicine & International Health*, 9(12), 1319-1326.
 33. Black, C. L., Ocaña, S., Riner, D., Costales, J. A., Lascano, M. S., Davila, S., Arcos- Teran, L., Seed Richard, J. & Grijalva, M. J. (2007). **Household risk factors for *Trypanosoma cruzi* seropositivity in two geographic regions of Ecuador.** *Journal of Parasitology*, 93(1), 12-16.
 34. Mejía-Jaramillo, A. M., Peña, V. H., & Triana-Chávez, O. (2009). ***Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of lineages I and II supports the predominance of lineage I in Colombia.** *Experimental Parasitology*, 121(1), 83-91.
 35. López-Olmos, V., Pérez-Nasser, N., Pintero, D., Ortega, E., Hernandez, R., & Espinoza, B. (1998). **Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*.** *Acta Tropica*, 69(3), 239-254.
 36. Bosseno, M. F., Barnabé, C., Gastélum, E. M., Kasten, F. L., Ramsey, J., Espinoza, B., & Brenière, S. F. (2002). **Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico.** *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 627-632.
 37. Zumaya-Estrada, F. A., Messenger, L. A., Lopez-Ordóñez, T., Lewis, M. D., Flores-Lopez, C. A., Martínez-Ibarra, A. J., Pennington, P. M., Cordon-Rosales, C., Carrasco, H. V., Segovia, M., Miles, M. A. & Llewellyn, M. S. (2012). **North American import? Charting the origins of an enigmatic *Trypanosoma cruzi* domestic genotype.** *Parasit Vectors*, 5, 226.
 38. Andrews, N. W., Hong, K. S., Robbins, E. S., & Nussenzweig, V. (1987). **Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*.** *Experimental Parasitology*, 64(3), 474-484.

39. Kloetzel, J., Camargo, M. E., & Giovannini, V. L. (1975). **Antigenic differences among epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi***. *The Journal of Protozoology*, 22(2), 259-261.
40. Sodr , C. L., Chapeaurouge, A. D., Kalume, D. E., de Mendonça Lima, L., Perales, J., & Fernandes, O. (2009). **Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project**. *Archives of Microbiology*, 191(2), 177-184.
41. WHO - World Health Organization 1993. International Programme on Chemical Safety. **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Disponible en: inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm.
42. WHO - World Health Organization 2001. International Programme on Chemical Safety. **Biomarkers in risk assessment: validity and validation**. Disponible en: inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm.
43. Pinazo, M. J., Thomas, M. C., Bustamante, J., Almeida, I. C. D., Lopez, M. C., & Gascon, J. (2015). **Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: state of the art and future perspectives**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 422-432.
44. Marcipar, I. S., & Lagier, C. M. (2012). **Advances in serological diagnosis of Chagas' disease by using recombinant proteins**. *Current Topics in Tropical Medicine*, 273-298.
45. Bucio, M. I., Cabrera, M., Segura, E. L., Zenteno, E., & Salazar-Schettino, P. M. (1999). **Identification of immunodominant antigens in Mexican strains of *Trypanosoma cruzi***. *Immunological Investigations*, 28(4), 257-268.
46. Sánchez, B., Monte n, V., Reyes, P. A., & 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**. *Archives of Medical Research*, 32(5), 382-388.
47. da Costa, G. C. V., Lery, L. M. S., da Silva, M. L., Moura, H., Peralta, R. H. S., von Kr ger, W. M. A., Bisch, P. M., Barr, J. R. & Peralta, J. M. (2013). **The identification and characterization of epitopes in the 30–34kDa *Trypanosoma cruzi* proteins recognized by antibodies in the serum samples of chagasic patients**. *Journal of Proteomics*, 80, 34-42.
48. Teixeira, M. G., Borges-Pereira, J., Netizert, E., Souza, M. L., & Peralta, J. M. (1994). **Development and evaluation of an enzyme linked immunotransfer blot technique for serodiagnosis of Chagas' disease**. *Tropical Medicine and Parasitology: Official Organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ)*, 45(4), 308-312.
49. Monte n, V. M., Guzman-Rojas, L., Negrete-Garcia, C., Rosales-Encina, J. L., & Lopez, P. A. (1997). **Serodiagnosis of American trypanosomiasis by using nonpathogenic trypanosomatid antigen**. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(12), 3316-3319.
50. Sánchez, B., Monte n, V., Reyes, P. A., & 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**.

- Archives of Medical Research*, 32(5), 382-388.
51. Torres-Gutiérrez, E., Barrios-Palacios, D., Ruiz-Hernández, A. L., Cabrera-Bravo, M., Guevara-Gómez, Y., Rojas-Wastavino, G., Salazar-Schettino, P. M. & Bucio-Torres, M. I. (2015). **Identificación de componentes inmunodominantes de un aislado de *Trypanosoma cruzi* por inmunoblot y su estandarización con fines diagnósticos.** *Gaceta Médica de México*, 151.
 52. Edwards, A. M., Isserlin, R., Bader, G. D., Frye, S. V., Willson, T. M., & Frank, H. Y. (2011). **Too many roads not taken.** *Nature*, 470(7333), 163-165.
 53. Wang, X. Z., Coljee, V. W., & Maynard, J. A. (2013). **Back to the future: recombinant polyclonal antibody therapeutics.** *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2(4), 405-415.
 54. Batista, C. M., Medeiros, L. C. S., Eger, I., & Soares, M. J. (2014). **MAB CZP-315. D9: an antirecombinant cruzipain monoclonal antibody that specifically labels the reservosomes of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes.** *BioMed research international*.
 55. LifeSpan BioSciences, Inc. Consultada Mayo de 2016 <https://www.lsbio.com/antibodies/anti-trypanosoma-cruzi-lpg-antibody-if-immunofluorescence-wb-western-elisa-ls-c132706/136326>
 56. Henao-Martínez, A. F., Agler, A. H., Watson, A. M., Hennessy, C., Davidson, E., Demos-Davies, K., McKinsey T. A, Wilson, M., Schwartz, D. A. & Yang, I. V. (2015). **AKT Network of Genes and Impaired Myocardial Contractility During Murine Acute Chagasic Myocarditis.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(3), 523-529.
 57. Hjelm, B., Forsström, B., Igel, U., Johannesson, H., Stadler, C., Lundberg, E., Ponten, F., Sjöberj, A., Rockberg, J., Schwenk, J.M., Nilsson, P., Johansson, C. & Uhlén, M. (2011). **Generation of monospecific antibodies based on affinity capture of polyclonal antibodies.** *Protein Science*, 20(11), 1824-1835.
 58. Flores, R. A. G., Guerra, R. S. T., Guerra, P. T., & Padilla, C. R. (2008). **Impacto de la biotecnología en la inmunología.** *Medicina universitaria*, 10(39), 92-101.
 59. Boulard, C., & Lecroisey, A. (1982). **Specific antisera produced by direct immunization with slices of polyacrylamide gel containing small amounts of proteins.** *Journal of Immunological Methods*. 50 (2), 221-6
 60. Diano, M., Bivic, A. L., & Hirn, M. (1998). **Raising polyclonal antibodies using nitrocellulose-bound antigen.** *Immunochemical Protocols*, 5-13.
 61. Totowa, Asai, N.J. **Methods in Molecular Biology.** Human Press Inc. Vol. 80. 2nd ed.
 62. DJ 1993 Antibodies in cell biology. *Methods in Cell Biology*, Vol. 37. Academic Press, 452 pp.
 63. Diano, M., Bivic, A. Le, & Hirn, M. (1998). **Raising polyclonal antibodies using nitrocellulose-bound antigen.** *Immunochemical Protocols*, Pp 5-13. Totowa, NJ.
 64. Abbas, A. K. (2002). **Inmunología celular y molecular.** McGraw-Hill Interamericana.
 65. Calderón, P. R. V. (2007) **Inmunoquímica.** Instituto biotecnología, UNAM. Recuperado de www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf
 66. Gavilondo- Coeley, J. (1995) **Anticuerpos policlonales y monoclonales.** *Anticuerpos*

- Monoclonales*, ed. Gavilondo-Coeley. Elfos Scientiae. Pp. 25-29. La Habana.
67. Almeida, I. C., Milani, S. R., Gorin, P. A., & Travassos, L. R. (1991). **Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies.** *The Journal of Immunology*, 146(7), 2394-2400.
 68. Cardoso, M. S., Reis-Cunha, J. L., & Bartholomeu, D. C. (2015). **Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection.** *Frontiers in Immunology*, 6, 659.
 69. Tarleton, R. L. (2015). **CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection.** *In Seminars in Immunopathology*, 37(3) 233-238.
 70. Junqueira, C., Caetano, B., Bartholomeu, D. C., Melo, M. B., Ropert, C., Rodrigues, M. M., & Gazzinelli, R. T. (2010). **The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease.** *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12, e29.
 71. Rodrigues, M. M., de Alencar, B. C. G., Claser, C., & Tzelepis, F. (2009). **Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease?.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(3), 220-223.
 72. Andrade, A. L. S., Martelli, C. M., Oliveira, R. M., Silva, S. A., Aires, A. I., Soussumi, L. M., Covas, D. T., Silva, L. S., Andrade, J. G., Travassos, L. R. & Almeida, I. C. (2004). **Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi*-infected adolescents after a six-year follow-up.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5), 594-597.
 73. Tarleton, R. L. (1990). **Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*.** *The Journal of Immunology*, 144(2), 717-724.
 74. Tarleton, R. L., Koller, B. H., Latour, A., & Postan, M. (1992). **Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection.** *Nature*, 356(6367), 338-340.
 75. Martin, D. L., Weatherly, D. B., Laucella, S. A., Cabinian, M. A., Crim, M. T., Sullivan, S., Heiges, M., Craven, S.H., Rosenberg, C.S., Collins, M.H., Sette, A., Postan, M. & Tarleton, R.L. (2006). **CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes.** *PLoS Pathogens*, 2(8), e77.
 76. Alvarez, M. G., Postan, M., Weatherly, D. B., Albareda, M. C., Sidney, J., Sette, A., Olivera, Armenti, H. A., Tarleton, R. L. & Laucella, S. A. (2008). **HLA class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8+ T cells in chronic Chagas disease.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(9), e288.
 77. Ramsey, J. M., Ordoñez, R., Tello-López, A., Pohls, J. L., Sanchez, V., & Peterson, A. T. (2003). **Actualidades sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas en México.** *Iniciativa para la vigilancia y control de la enfermedad de Chagas en México. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública, México*, 85-104.