



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación de glicoproteínas inmunodominantes en modelo murino ante la
infección por *Trypanosoma cruzi*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARIANA LIZETH LÓPEZ HERNÁNDEZ

ASESORA

DRA. MARTHA IRENE BUCIO TORRES

SUPERVISORA TÉCNICA:

M EN C. MARIANA CITLALLI DE ALBA ALVARADO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD MX

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Abel Gutiérrez Ramos
VOCAL: Profesora: Natividad García Escamilla
SECRETARIO: Profesora: Martha Irene Bucio Torres
1er. SUPLENTE: Profesor: José Cordero Hernández
2° SUPLENTE: Profesor: Jesús Pedroza Gómez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE MEDICINA, DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA, LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE PARÁSITOS, CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO.

ASESORA DEL TEMA:

DRA. MARTHA IRENE BUCIO TORRES

SUPERVISORA TÉCNICA:

C. A DRA. MARIANA CITLALLI DE ALBA ALVARADO

SUSTENTANTE:

MARIANA LIZETH LÓPEZ HERNÁNDEZ

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina UNAM con el apoyo financiero parcial de la Facultad de Medicina, “Análisis del perfil de citocinas y alteraciones histopatológicas en ratones infectados con *T. cruzi*” FMD/DI/022/2017 y de DGAPA-PAPIIT, proyectos IT-200913 “Validación de métodos para confirmación del diagnóstico de la infección de *T. cruzi* mediante el uso de marcadores biológicos específicos”, IN-227816 “Estudio clínico y cardiológico en niños seropositivos a *Trypanosoma cruzi* en dos poblaciones rurales del estado de Chiapas, México” y de Laboratorios Silanes S.A. de C.V.

ABREVIATURAS

<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>T. cruzi</i>
2D	2 Dimensiones
4C	4 cepas
Ac.	Anticuerpo
Ag	Antígeno
BSA	Albúmina de suero Bovino
C/	Cada
Cat.	Catálogo
D.O.	Densidad óptica
dpi	Días posterior a la infección
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
g	Gramos
h	Horas
IgG	Inmunoglobulina G
kDa	Kilodalton
LIT	Medio de cultivo Infusión Hígado Triptosa
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
NNN	Medio bifásico de agar sangre (Novy, Nicolle y McNeal)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
QRO	Cepa Querétaro
rpm	Revoluciones por minuto
SLP	San Luis Potosí
TQ	Tequesquitengo
Vol.	Volumen
W-b	Western blot
µL	Microlitros
Xal	Xalapa
MWM	Marcador de peso molecular

INDICE

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	8
2.1. Enfermedad de Chagas.....	8
2.2. Generalidades	8
2.3. Agente etiológico	9
2.3.1. Clasificación taxonómica	10
2.3.2. Morfología de <i>T. cruzi</i>	10
2.3.3. Ciclo biológico	12
2.4. Vector	14
2.4.1. Clasificación taxonómica	14
2.4.2. Características del vector	14
2.5. Principales mecanismos de infección y transmisión.....	15
2.6. Epidemiología.....	16
2.7. Cuadro clínico	17
2.8. Patogénesis.....	19
2.9. Diagnóstico.....	21
2.9.1. Métodos parasitológicos	21
2.9.2. Métodos inmunológicos	22
2.9.3. Métodos de diagnóstico molecular.....	23
3. TRATAMIENTO	24
4. ANTECEDENTES.....	25
4.1. Estudios de serología y proteómica de <i>T. cruzi</i>	25
4.2. Sistema immune.....	27
4.2.1 Inmunoglobulinas y subtipos.....	27
4.3. Estudios serológicos en modelo murino.....	28
5. JUSTIFICACIÓN.....	30
6. HIPÓTESIS	31
7. OBJETIVOS	31
7.1. Objetivo general	31
7.2. Objetivos particulares	31
8. DISEÑO EXPERIMENTAL	32
9. METODOLOGÍA	33

9.1.	Extracción antigénica	33
9.2.	Expansión parasitaria	33
9.2.1.	Extracción antigénica.....	34
9.3.	Cuantificación de proteínas totales	34
9.4.	Modelo animal	34
9.5.	Curvas de parasitemia.....	35
9.6.	Sueros de ratón	35
9.7.	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.....	35
9.8.	Electroinmunotransferencia (Western-blot).....	36
9.9.	Estandarización de la técnica de ELISA en microplaca	37
9.10.	Obtención de pesos moleculares de los componentes del extracto proteico ..	37
10.	RESULTADOS.....	38
10.1.	Curva de parasitemia	38
10.2.	Inmunoensayo enzimático (ELISA)	38
10.2.1.	Determinación del título de corte.....	38
10.2.2.	ELISA indirecta en suero de ratones infectados	40
10.2.3.	Western blot en sueros de ratones infectados	41
11.	DISCUSIÓN.....	51
12.	CONCLUSIONES	58
13.	PERSPECTIVAS.....	59
14.	BIBLIOGRAFÍA	60

1. RESUMEN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una parasitosis causada por *Trypanosoma cruzi*. Se extrajeron dos antígenos, el antígeno obtenido de la cepa QRO, aislada de *Triatoma barberi*, conocida por su alta virulencia y el antígeno 4C proveniente de un pool de las cepas QRO, TQ (aislado de *M. pallidipennis*), XAL (de *T. dimidiata*) y Cristi (de humano).

En este estudio, se evalúa la correlación entre la parasitemia, los títulos de anticuerpos IgG y la presencia de componentes inmunodominantes específicos durante el transcurso de la enfermedad, además se pretende correlacionar en modelo murino las fases características de la enfermedad en humanos. La metodología consistió en inocular dos grupos de ratones, tomar muestras séricas cada 72 horas para cuantificar parasitemia circulante, además de sangre para los inmunoensayos. El inicio de la parasitemia se detectó a los 14 días, y el final de la fase *log* de crecimiento a los 36 días hasta el día 50, momento en que la parasitemia no fue detectable. La detección de anticuerpos se determinó previo a la titulación de la técnica de ELISA y el establecimiento del título de corte para cada antígeno, los sueros presentaron reactividad a la infección a partir del día 40, con el mayor nivel de anticuerpos del tipo IgG al día 60, hasta el día 105 donde disminuye la reactividad dentro de valores positivos.

Existe un gran número de componentes antigénicos descritos y son en su mayoría glicoproteínas de superficie. El análisis glicoproteico a partir del día 5 hasta el día 110, mostró detección de componentes específicos a partir del día 23 posterior a la infección con el antígeno QRO y 18 para el antígeno 4C. Con base en los resultados se propone como una probable fase aguda al periodo del día 1 al 40 posterior a la infección con los componentes específicos de 44, 48, 88, 79 y 89 kDa; el inicio de la probable fase crónica entre los 41 y 49 días posterior a la infección con los componentes de 47 y 50 kDa y finalmente, posterior al día 50 de infección como probable fase crónica, con la presencia de los componentes de 20, 21, 30, 52, 60, 77, 80, 84, 87, 90, 94, 95 y 127 kDa.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, descrito por primera vez por el Doctor Carlos Chagas en 1909, en Minas Gerais Brasil cuando se encontraba en una campaña de erradicación del paludismo donde aisló el parásito que denominó *Schyzotripanum cruzi* debido a que en un inicio supuso que el parásito se reproducía por esquizogonia; posteriormente, además de los estudios en humanos, infectó animales de laboratorio como macacos, cobayos, conejos y perros para describir así el ciclo biológico, cuadro clínico, patología y epidemiología de la enfermedad, además refirió la importancia que desempeñan las condiciones de vivienda rural para la propagación de la infección (Chagas, 1909).

2.2. Generalidades

Esta enfermedad es endémica en 21 países de América Latina y aproximadamente el 28% de la población se encuentra en riesgo de infección por lo que se estima que en el mundo existen entre 6 y 7 millones de personas infectadas (OMS, 2017) y actualmente es considerada una parasitosis de relevancia mundial debido a que se han reportado casos en países no endémicos.

En México, el primer reporte del transmisor fue en 1928 por Hoffman y en 1940 Mazzoti publica los primeros dos casos humanos y de vertebrados infectados en los estados de Oaxaca y Colima (Mazzoti, 1940).

Las encuestas se realizaron por primera vez en 1947 por Perrin y Brenes, seguidos de Biagi, Tay y Salazar, hasta 1961 solo se habían comprobado parasitológicamente 6 casos humanos. En 1965 Biagi y Arce diagnosticaron los primeros dos casos de miocardiopatía Chagásica en México *pos-mortem* (Biagi,

1965), en 1979 Salazar-Schettino reporta el tercer caso de miocardiopatía chagásica en un paciente vivo (Salazar, 1979) y el primer caso de megaesófago con serología positiva en el estado de Oaxaca en 1984 (Salazar, 1984), en 1986 Tay reporta el primero de megacolon y el primer caso de transmisión por transfusión sanguínea se describe en 1989 en la Ciudad de México por Salazar (Salazar, 1989).

En el año 2005 la Organización Mundial de la Salud (OMS), incorpora a la enfermedad de Chagas dentro de la clasificación de enfermedades tropicales desatendidas con el propósito de generar medidas y tomar acciones necesarias para el control de la transmisión y disminución de nuevos casos (OMS, 2009).

En México La Secretaría de Salud, reporta durante el período comprendido entre 2000 al 2015, 8,123 casos de enfermedad de Chagas (agudos y crónicos), y para 2016 el registro preliminar de la incidencia con 814 casos nuevos. Los grupos de edad más afectados se encuentran dentro de la edad productiva, principalmente entre los 25 y 44 años. Los estados con mayor número de casos reportados fueron Veracruz, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Chiapas y Guerrero.

2.3. Agente etiológico

Trypanosoma cruzi es un parásito hematófago, unicelular perteneciente al orden Kinetoplastida, presenta una mitocondria única y cinetoplasto constituido por material genético extranuclear, se divide por fisión binaria longitudinal.

2.3.1. Clasificación taxonómica

T. cruzi se clasifica de la siguiente forma (Ruggiero et al, 2015):

Superreino: Eukarya

Reino: Protozoa

Infrarreino: Euglenozoa

Phylum: Euglenozoa

Clase: Kinetoplastida

Orden: Trypanosomatida

Familia: Trypanosomatidae

Género: *Trypanosoma*

Especie: *T. cruzi* (Chagas, 1909)

2.3.2. Morfología de *T. cruzi*

T. cruzi es un parásito que sufre cambios estructurales y metabólicos dependiendo de la fase del ciclo de vida en la que se encuentre, lo que favorece la infección de células nucleadas del mamífero infectado; la posición del cinetoplasto, respecto al núcleo, permite determinar principalmente cuatro fases morfológicas; el tripomastigote sanguíneo que se encuentra en el torrente sanguíneo, el tripomastigote metacíclico en la ampolla rectal del transmisor, el epimastigote en medios de cultivo y en intestino medio del triatómino y el amastigote que es la forma replicativa intracelular en el vertebrado (Figura 1.)

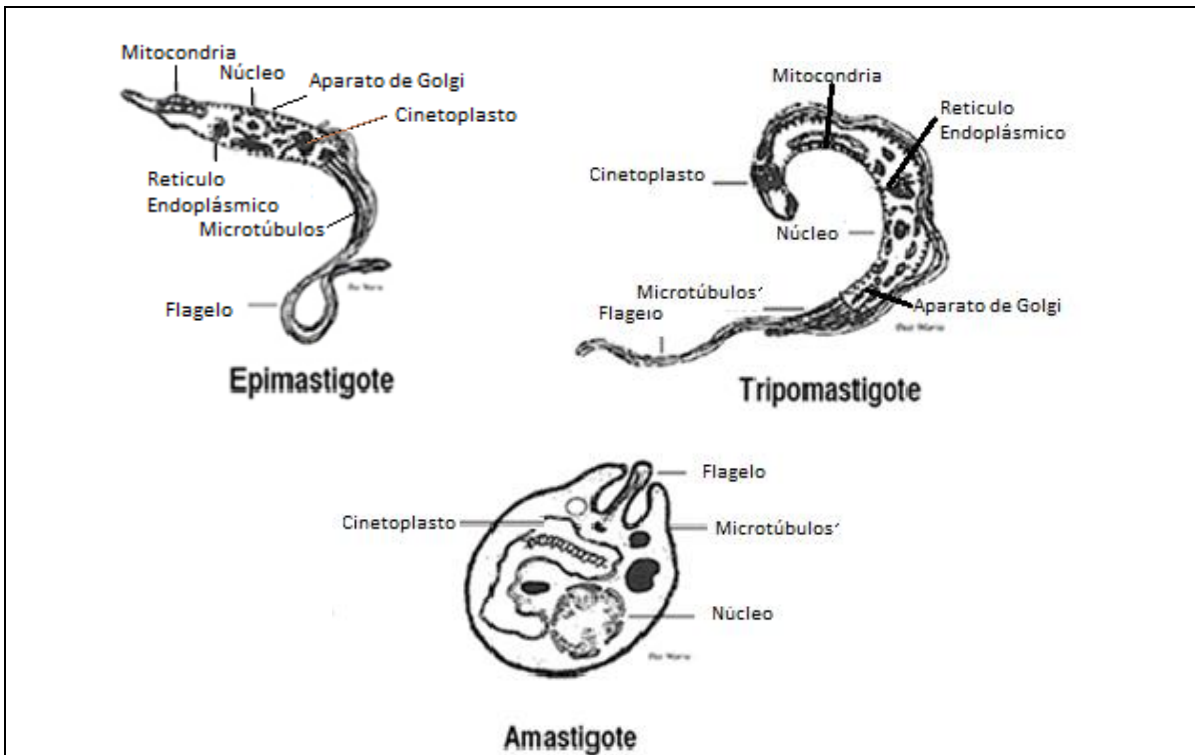


Figura 1. Morfología del parásito. Cortesía: Dra. Paz María Salazar-Schettino

- Epimastigote: Presenta una forma fusiforme y alargada, es la forma replicativa que se encuentra en el intestino del vector (y en medios de cultivo para su conservación), tiene una longitud de 20 μm y un diámetro de 2-4 μm , en la región anterior al núcleo se encuentra el cinetoplasto del cual emerge el flagelo.
- Tripomastigote: Cuerpo alargado en forma de "S" o "C", una longitud de 25 μm y 2 μm de diámetro. Presenta las formas de: tripomastigote metacíclico (forma infectiva) y tripomastigote sanguíneo cuando se encuentra en el torrente sanguíneo del huésped vertebrado. En esta fase, el cinetoplasto está localizado posterior al núcleo, del cual, emerge la membrana ondulante.
- Amastigote: Forma esférica carente de flagelo, con un diámetro de 2-5 μm , presenta núcleo aparente y un cinetoplasto en forma de bastoncillo, es la forma replicativa intracelular en el huésped vertebrado (Salazar, 2011).

2.3.3. Ciclo biológico

La infección vectorial o natural de *T. cruzi*, inicia cuando el triatómino se alimenta de un vertebrado infectado (humanos, perros, gatos, armadillos, tlacuache o zarigüeya, bovino, cerdos, entre otros) ingiriendo tripomastigotes sanguíneos, posteriormente los tripomastigotes se transforman en epimastigotes en el intestino del triatómino y se multiplican en la luz del intestino de este; después de 15 a 30 días, los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos los cuales se alojan en el ámpula rectal siendo liberados junto con las heces del vector. Cuando el triatómino infectado con *T. cruzi* se alimenta de un vertebrado sano, deyecta los tripomastigotes metacíclicos (fase infectante) los cuales pueden atravesar la piel por el sitio de la picadura o bien pueden penetrar por las mucosas. Una vez dentro del vertebrado, *T. cruzi* es fagocitado por células del sistema inmune e invade células nucleadas y se transforma en amastigote, el cual se multiplica por fisión binaria longitudinal y después de nueve ciclos de división se diferencian en tripomastigotes sanguíneos para liberarse al torrente sanguíneo con la capacidad de infectar otras células.

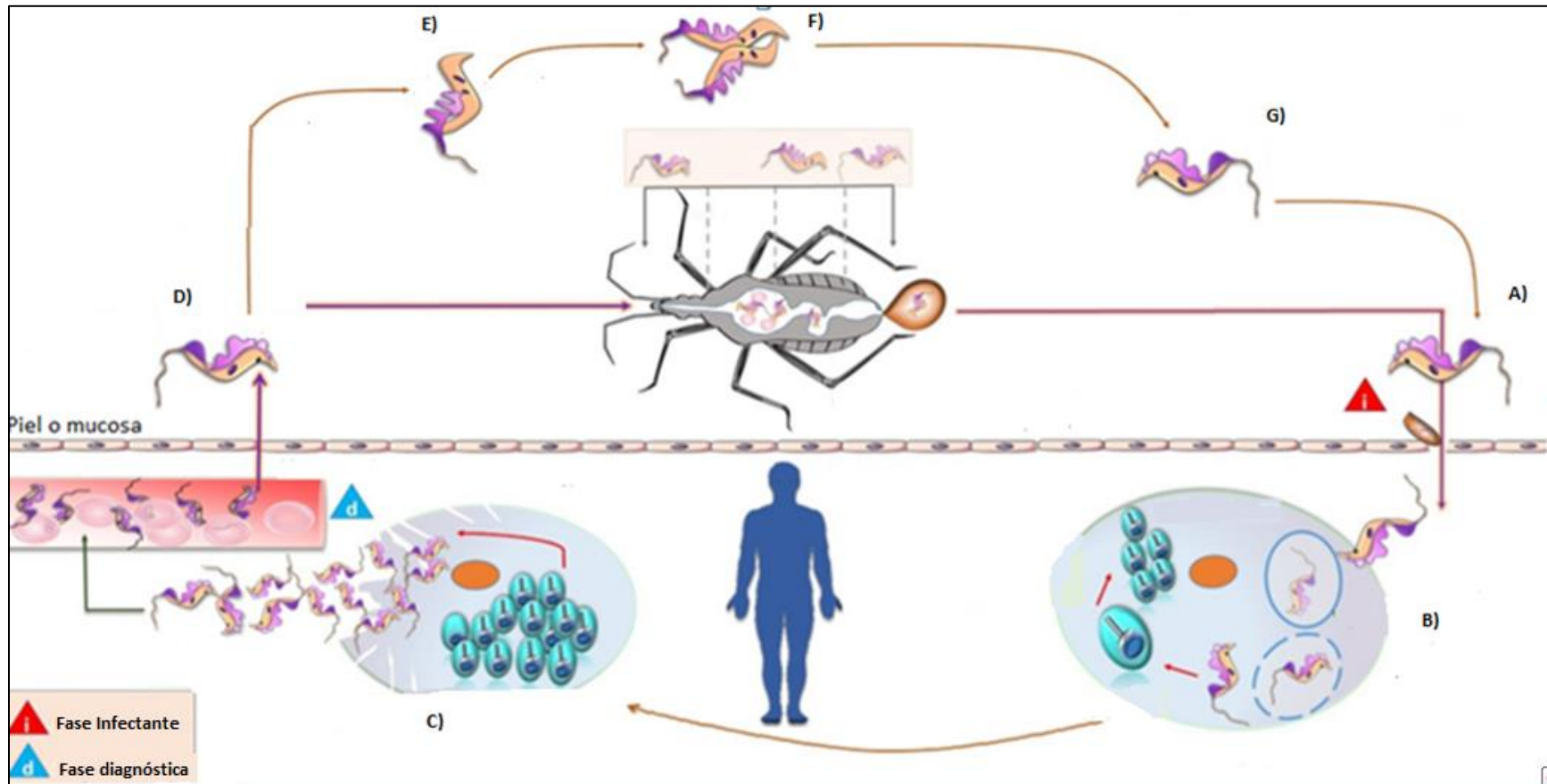


Figura 2: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

A) Infección del vertebrado con tripomastigotes metacíclicos provenientes del vector. B) Invasión de las células huésped. C) Diferenciación en amastigote y reproducción. D) Diferenciación en tripomastigote, los cuales pueden ser ingeridos por otro vector. E) Epimastigotes en el intestino anterior del vector. F) Reproducción por fisión binaria longitudinal. G) Tripomastigotes metacíclicos. **Modificado de (Lidani, 2017).**

2.4. Vector

2.4.1. Clasificación taxonómica

Clase Insecta

Orden Hemiptera

Familia Reduviidae

Subfamilia Triatominae

(Galvão, 2003)

2.4.2. Características del vector

T. cruzi es transmitido en forma natural a los seres humanos, animales domésticos y silvestres, por medio de redúvidos hematófagos de la subfamilia Triatominae, en México se reconocen 8 géneros con 32 especies de las cuales 13 son de importancia por su epidemiología, localización geográfica, doméstica e infección natural por *T. cruzi*. (Salazar, 2010).

El ciclo de vida del vector incluye huevo, cinco estadios ninfales y adulto, a partir del primer estadio, después de la alimentación, puede adquirir al parásito para iniciar la transmisión natural, la cual puede llevarse a cabo en el domicilio, peridomicilio o silvestre (Salazar 2005). El tamaño de los triatóminos adultos varía dependiendo de la especie, en un rango de 5 a 45 mm. El origen de estos insectos es de tipo silvestre, pero debido a la invasión y devastación de los ecotopos naturales por el hombre, algunas especies han modificado su hábitat, e incluso se ha favorecido la adaptación de algunas especies al domicilio y peridomicilio.

Salazar-Schettino en 2005 señala que en México existen tres especies de importancia epidemiológica que son *Triatoma barberi*, *Triatoma dimidiata* y *Meccus pallidipennis* y dentro de estas señala a *T. barberi* como el mejor transmisor de *Trypanosoma cruzi* debido a que es una especie peri e

intradomiciliada, presenta un mayor porcentaje de tripomastigotes metacíclicos en la materia fecal y el menor tiempo entre alimentación y defecación (Salazar, 2005).

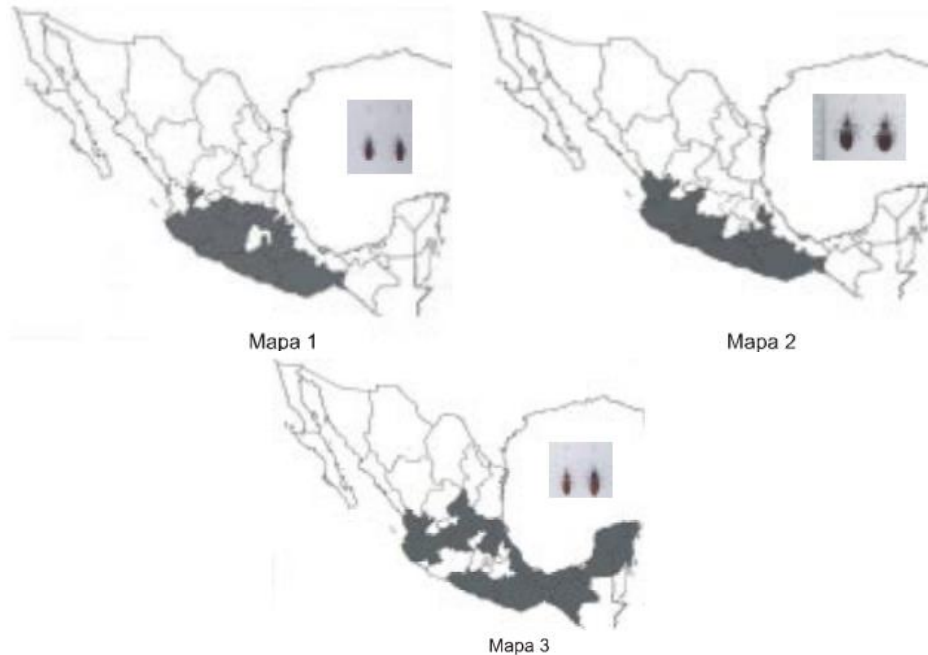


Figura 3. Distribución de las tres principales especies de triatóminos en México (Salazar, 2005).
1: *Triatoma barberi*. 2: *Triatoma pallidipennis*. 3: *Triatoma dimidiata*.



Figura 4. Principales especies de triatóminos en México

2.5. Principales mecanismos de infección y transmisión

Existen distintos mecanismos de transmisión de *T. cruzi*; el principal, es la infección natural, conocido también como Chagas Rural, debido a que los

triatóminos viven en las grietas y huecos de las paredes y techos de las casas, este mecanismo de infección es muy común en zonas rurales y suburbanas y se lleva a cabo mediante la inoculación transcutánea del parásito por contacto directo con las heces de los triatóminos infectados que pican en piel y en regiones cercanas a las mucosas de cara.

Otros mecanismos de infección:

- Transfusional: Es el segundo en importancia epidemiológica y se lleva a cabo por la transfusión de sangre o cualquiera de sus componentes, también se conoce como Chagas Urbano donde se incluye también a los trasplantes de órganos y otros tejidos; en México se ha establecido la obligatoriedad del tamizaje en Bancos de Sangre para *Trypanosoma cruzi* a partir del año 2012 mediante la “NOM 253 SSA1 2012” (“Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos”).
- Transmisión vertical o materno-fetal: Se estima que existen aproximadamente 15 000 casos de infección congénita.
- Ingestión de alimentos contaminados con las heces de triatóminos infectados (Salazar, 1983; OMS, 2015)
- Accidentes de laboratorio: Se presenta sobre todo en centros y laboratorios de diagnóstico o investigación; el primer caso documentado fue en el Instituto de Parasitología de Paris, con una cepa proveniente del estado de Colima (Brumpt E, 1939).

2.6. Epidemiología

La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países de América Latina, desde sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile, ha extendido sus límites geográficos debido a la migración de personas infectadas, hacia países no endémicos como el norte de Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón y algunos países de Europa (OPS, 2015).

La OMS en 2015, realizó diversas estimaciones para Latinoamérica y en México calculó 70 117 casos de cardiopatas de etiología Chagásica con aproximadamente el 20.87% de la población en riesgo de contraer la infección (WHO, 2015) y en 2017, se calcula que en el mundo existen entre 6 y 7 millones de personas infectadas (OMS, 2017).

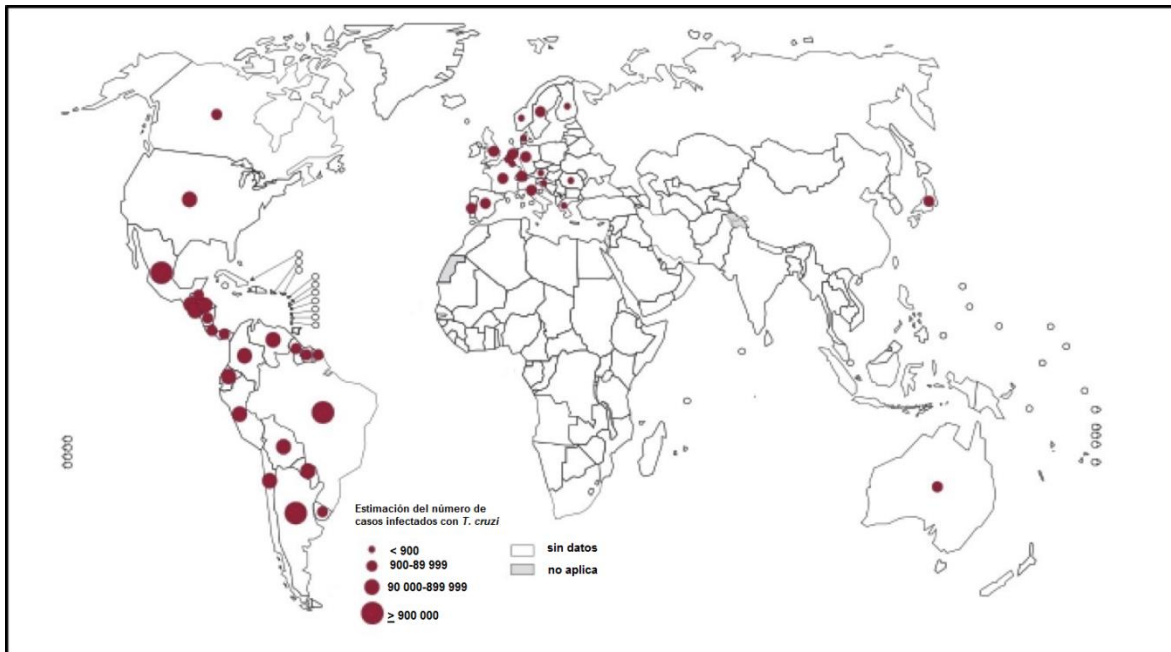


Figura 5. Distribución mundial de casos de la enfermedad de Chagas, en base a estimaciones oficiales, 2006-2010 Fuente: WHO, Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases, enero 2013.
http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/

2.7. Cuadro clínico

En la evolución clínica de la enfermedad de Chagas, se presentan las fases aguda y crónica; ésta última, puede ser asintomática o sintomática.

- **Fase aguda.** Inicia cuando se lleva a cabo la infección del humano por *T. cruzi*, la mayoría de los casos cursan asintomáticos o bien, en el caso de la transmisión vectorial, cuando el parásito penetra por piel, puede observarse una reacción local en el sitio de la infección caracterizado por la presencia de una lesión nodular de color violáceo denominado chagoma de

inoculación, si el parásito penetra cerca de la mucosa ocular se puede presentar el Signo de Romaña-Mazza que consiste en edema bipalpebral unilateral, también de color violáceo; durante esta fase pueden presentarse además fiebre y malestar general durante los primeros 15 días. Esta fase puede durar de dos a cuatro meses (Figura 6).

- **Fase Crónica Asintomática.** Anteriormente conocida como indeterminada, esta fase se caracteriza por no presentar patología demostrada, tiene una duración variable que puede ser de 10 años o incluso, varias décadas y se presenta en aproximadamente el 70% de los casos que se infectan. En esta fase la parasitemia es muy baja, prácticamente no detectable y los métodos de diagnóstico son principalmente serológicos.
- **Fase Crónica Sintomática.** Se desarrolla en aproximadamente el 25 o 30% de los pacientes infectados, esta fase implica un compromiso visceral progresivo e irreversible si no es tratado; los órganos más afectados son corazón donde ocasiona cardiomegalia, esófago con megaesófago y colon con megacolon (Figura 7 y 8).

La manifestación más importante de la enfermedad de Chagas es la miocardiopatía que se caracteriza por insuficiencia cardíaca y trastornos del ritmo cardíaco.



Figura 6. Signo de Romaña-Mazza.
Cortesía: Dras. Salazar/Bucio



Figura 7. Radiografía de tórax. Cardiomegalía Chagásica WHO/TDR



Figura 8. Megacolon. WHO/TDR

2.8. Patogénesis

Existen diversos factores que favorecen la infección por *T. cruzi* por parte del huésped mamífero, así como factores genéticos del parásito; respecto al huésped, son de importancia el sexo, edad, raza, respuesta inmunológica, entre otros dependerá como afectará la infección al individuo; en el caso del parásito, se debe considerar la cepa, polimorfismo, tropismo, virulencia, la constitución antigénica, cantidad de inóculo así como vía de entrada del parásito siendo las cepas más virulentas aquellas con un alto poder de penetración celular; estas características, podrían explicar las diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas (Marin-Neto, 2007). Los mecanismos de invasión celular inducen una respuesta inmune en el huésped vertebrado, el cual produce anticuerpos específicos inicialmente durante la fase aguda del tipo IgM y posteriormente los anticuerpos de memoria del tipo IgG.

T. cruzi, tiene la capacidad de invadir todas las células nucleadas, principalmente macrófagos, fibroblastos, neuroglia y células musculares iniciando un periodo de reproducción por fisión binaria, por lo tanto, la cantidad de antígenos producidos dependerá directamente de la cantidad de parásitos inoculados. En la cardiopatía Chagásica, el daño al miocardio está directamente relacionado con la persistencia de los parásitos, mientras que las anomalías estructurales y funcionales ocurren como consecuencia del proceso inflamatorio (Marin-Neto, 2007).

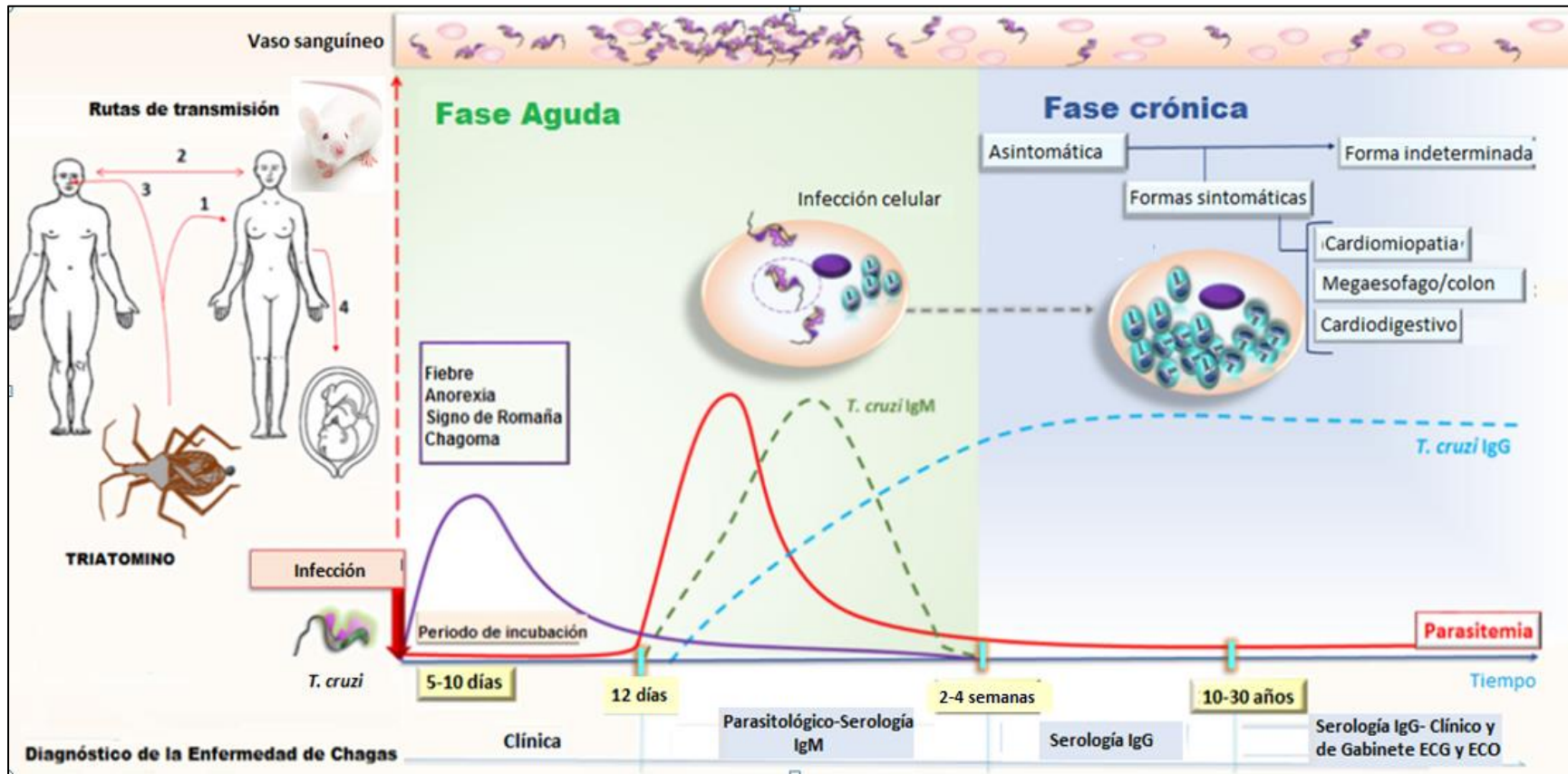


Figura 9. Curso natural de la infección humana por *T. cruzi*. Modificado de Lidani, 2017.

En el humano, después de la infección, se presenta el período de incubación con duración de 5 a 10 días, seguido por la fase aguda caracterizada por tripomastigotes sanguíneos circulantes, el diagnóstico se basa en la detección de parásitos por medio de métodos parasitológicos o bien por la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* del tipo IgM que pueden detectarse después de 12 días de infección. La fase crónica inicia cuando la parasitemia disminuye y el diagnóstico en esta fase consiste en la detección de anticuerpos anti *T. cruzi* del tipo IgG, así como estudios complementarios de gabinete: radiológicos, electrocardiograma y el ecocardiograma, principalmente.

2.9. Diagnóstico

Se valoran diferentes parámetros que incluyen, evaluación clínica, epidemiológica y el empleo de diferentes pruebas parasitológicas, serológicas de laboratorio e imagenología dependiendo de la fase que curse la enfermedad.

2.9.1. Métodos parasitológicos

Son de utilidad en la fase aguda de la enfermedad donde se presenta una elevada parasitemia, por lo tanto, se basan en la detección del parásito. Los siguientes métodos son los más empleados:

- Examen directo, gota gruesa y frotis sanguíneo. Se observan tripomastigotes sanguíneos, se presenta una sensibilidad del 50% durante esta fase.
- Hemocultivo en medios como el de NNN. El parásito en los medios convencionales se multiplica en forma de epimastigote.
- Inoculación de animales de laboratorio (No en forma rutinaria).
- Xenodiagnóstico. Se emplean triatóminos no infectados. Actualmente en desuso. (OMS, 2002).

SENSIBILIDAD DE LOS MÉTODOS PARASITOLÓGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

MÉTODO	SENSIBILIDAD (%)	FASE CLÍNICA
Directo	80-90	Aguda
Frotis	<60	Aguda
Gota Gruesa	<70	Aguda
Strout	90-100	Aguda
Microstrout	90-100	Aguda
Microhematocrito	90-100	Aguda
Hemocultivo	90-100	Aguda
Xenodiagnóstico	90-100	Aguda

Cuadro 1. Modificado de: The Control of Chagas Disease. WHO Technical Report Series No. 811. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1991.

2.9.2. Métodos inmunológicos

Durante la fase crónica (sintomática y asintomática) la parasitemia es poco detectable, por lo que es necesario utilizar métodos serológicos que permitan evidenciar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* generados por el vertebrado.

Métodos convencionales:

- Inmunoensayo enzimático (ELISA indirecta). Para la detección de anticuerpos de memoria específicos.
- Inmunofluorescencia indirecta (IFI) Detección de anticuerpos por medio de parásitos completos fijados en laminilla.
- Hemaglutinación indirecta (HAI) aglutinación específica en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con antígeno de *T. cruzi*.

Métodos Serológicos y Moleculares para el diagnóstico de la Infección por *T. cruzi*

Situación*	Métodos convencionales			Métodos no convencionales	
	ELISA	IFI	HAI	Antígenos recombinantes	PCR
Confirmación de caso clínico (Se recomiendan dos pruebas)	X	X	X		
Control de sangre a transfundir (Se recomienda una prueba)	X				
Detección de la infección congénita (Se recomiendan dos pruebas)	X	X		X	X
Investigación Epidemiológica (Se recomiendan 2 pruebas) 2	X	X	X		
Seguimiento a paciente tratado (Se recomiendan dos pruebas) 1	X	X	X	X	X

Cuadro 2. Métodos serológicos y moleculares para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*.

Modificado de: Control de calidad de la enfermedad de Chagas, Segundo informe del Comité de Expertos de la OMS, Serie de informes técnicos Ginebra 2002.

(1 Únicamente cuando un programa de control de calidad con componentes interno y externo haya sido instalado 2 Toma de muestra en papel filtro)

2.9.3. Métodos de diagnóstico molecular

Métodos no convencionales:

- Western-blot (W-b). Reconocimiento de componentes de origen proteico. Utiliza diversos componentes específicos del parásito.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). permite amplificar secuencias de ADN del parásito con alta especificidad.

El diagnóstico definitivo dependerá del resultado positivo de por lo menos dos pruebas serológicas diferentes (ELISA, IFI Indirecta o HAI Indirecta) (OPS/OMS, Informe general de la enfermedad de chagas, 2016).

3. TRATAMIENTO

A la fecha solo existen dos medicamentos específicos aprobados por los Ministerios de Salud, disponibles para el tratamiento de la enfermedad que son el Nifurtimox y el Benznidazol; ambos reducen la gravedad de los síntomas y acortan el curso clínico así como el tiempo de duración de la parasitemia en la fase aguda; por esta razón, están indicados específicamente durante esta fase de la enfermedad. Durante la fase crónica la eficacia del tratamiento disminuye considerablemente, se puede administrar un tratamiento específico para las manifestaciones cardíacas y digestivas según sea el caso.

4. ANTECEDENTES

4.1. Estudios de serología y proteómica de *T.cruzi*.

La primera prueba serológica para la detección de *T. cruzi* fue la reacción de Guerreiro y Machado en 1913, la cual consistía en la fijación del complemento con el antígeno, obtenido de órganos de animales infectados, la desventaja era que se obtenían resultados que cruzaban con otras entidades clínicas, principalmente con Leishmaniasis; debido a esto, los investigadores fueron desarrollando métodos y procedimientos para incrementar tanto la sensibilidad como la especificidad.

Debido a la cronicidad de la infección por *T. cruzi*, es indispensable determinar si se presentan cambios proteicos, probables indicativos de la fase de la enfermedad en que se encuentra el individuo o bien, conocer que proteínas específicas expresa para realizar un diagnóstico eficaz y confiable. Alguno autores han propuesto estudio de la identificación proteica en las diferentes fases de *T. cruzi* inicia en 1944 con Muniz y Freitas, al demostrar la presencia de componentes antigénicos comunes en diferentes fases del parásito, en 1979 Snary identificó una glicoproteína de superficie de 90 kDa que ha sido muy estudiada incluso con fines vacunales, Nogueira en 1981 describe otra de 75 kDa en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos y la de 90kDa en amastigotes y tripomastigotes sanguíneos, esta última, común en pacientes que cursan la fase crónica de la enfermedad.

Dentro de las proteínas más relevantes se encuentran las transialidasas en el 66 % del total; son de importancia en los procesos de interiorización del parásito hacia la célula del vertebrado (Bautista 2016), existen también mucinas y una gran cantidad de proteínas desconocidas, lo que abre un amplio panorama para estudios de proteómica funcional y estructural del parásito con diversos fines.

Cuadro 3. Principales glicoproteínas estudiadas de *T. cruzi*

Autor	Año	GP	Descripción
Snary y Hudson	1979	90 kDa	Primera descripción en tripomastigotes sanguíneos, amastigotes y epimastigotes.
Corral	1989	80 kDa	Altamente antigénica en perros infectados con <i>T. cruzi</i> , excretada por orina en fase aguda.
Snary	1985	-	Describe la función que desempeñan las GP de superficie en el reconocimiento, la unión e interiorización del parásito-célula huésped, así como en la protección del parásito de la fagocitosis.
Santos-Büch	1985	25 kDa	Antígeno específico para casos con miocardiopatía
Campetella	1992	85 kDa	Familia y Superfamilia de 85 kDa en Tripomastigotes
Ruef	1993	85-160 kDa	Familia multigénica de antígenos de superficie.
Monteón	1993	81, 54, 42, 46 kDa	Evaluaron epimastigotes de 4 aislados mexicanos con 4 componentes específicos compartidos.
O'Daly	1994	42, 50 kDa	18 componentes reactivos en el extracto total de la cepa Y, con mayor relevancia los de 42 y 50 kDa.
Krautz GM	1995	24 kDa	Proteína flagelar recombinante de unión a calcio de 24 kDa para el diagnóstico y seguimiento de pacientes tratados
Bucio	1999	74, 44, 31, 25 y 18 kDa	5 componentes inmunodominantes en sueros de casos de origen mexicano
Sánchez	2001	30, 32, 40, 42, 65, 70 y 83 kDa	Identificaron en los aislados Ninoa, Querétaro y Mor 10, proteínas relevantes, específicas en fase crónica.
De Lima	2001	66 a 45 kDa	Extractos de epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes metacíclicos de la cepa EP con 5 antígenos inmunodominantes en epimastigotes (66/64, 60/57, 53/51, 50/48, 47/57), 5 en amastigotes (60, 66, 58, 53/51, 47/45 kDa) y 3 en metacíclicos (66, 62/58, 53/51 kDa).
Torres	2011	38, 34 y 27	Describe un grupo de 3 GP para su empleo con fines diagnósticos mediante Inmunoblot.
Ceridorio	2012	82 kDa	GP específica en tripomastigotes metacíclicos.
De la Cruz Pech-Canul	2017	18, 27, 36	Describe las TcTASV (Tripomastigotes Alanina Serina Proteína rica en valina) localizadas en la superficie del parásito.

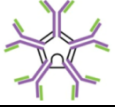

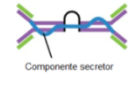


El estudio de las glicoproteínas de *T. cruzi* amplía el panorama para conocer y entender a nivel molecular los mecanismos que favorecen su permanencia en el vertebrado, además de facilitar la identificación de probables marcadores de fase clínica en la enfermedad así como de blancos terapéuticos. En la actualidad se están llevando a cabo estudios proteómicos en cada fase del ciclo de vida del parásito, encontrándose en su mayoría transialidasas debido a que estas favorecen la invasión celular. El principal problema, es que en todas las fases, hay un gran número de proteínas hipotéticas, dejando un amplio panorama de estudio sobre los mecanismos que utiliza el parásito para favorecer su permanencia dentro de sus hospederos.

4.2. Sistema immune

La respuesta inmune de un individuo se divide en respuesta innata y respuesta adquirida, las principales diferencias son la especificidad, diversidad y memoria.

4.2.1 Inmunoglobulinas y subtipos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), son glicoproteínas producidas naturalmente en respuesta a partículas extrañas (antígenos) que incluyen agentes infecciosos como microorganismos o virus. Su importancia es crucial en la defensa inmune contra la infección. Existen 5 Subtipos, IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, cada inmunoglobulina genera diferente respuesta inmune y se presentan según la evolución de la infección.

Característica	IgM	IgG	IgA Secretora	IgE	IgD
	Pentámero	Monómero	Dímero	Monómero	Monómero
					
Cadenas pesadas	μ	γ	A	ϵ	δ
Sitios de unión antigénica	10	2	4	2	2
Peso Molecular (Daltones)	900,000	150,000	285,000	200,000	180,000
Porcentaje total en suero	6%	80%	13%	0.002%	1%
¿Atraviesa placenta?	NO	SÍ	NO	NO	NO
Promedio de vida en suero (Días)	5	23	6	2.5	3
Fc se une a		Fagocitos		Mastocitos y basófilos	
Función	Principal Ac. de respuestas primarias, mejor en fijación de complemento	Principal Ac. en sangre en respuestas secundarias, neutralización de toxinas, opsonización.	Secretada en mucosas, lágrimas, saliva y calostro	Ac. de alergias y actividad antiparasitaria	Receptor células B

Cuadro 4. Principales características de las inmunoglobulinas

4.3. Estudios serológicos en modelo murino

A la fecha, no existen trabajos en modelo murino con la infección por *T. cruzi* que hayan sido estandarizados para determinar el inicio y comportamiento en los títulos de anticuerpos mediante las técnicas convencionales durante la evolución de la infección; tampoco existe evidencia para la correlación de los mismos con la respuesta en humano. En el siguiente cuadro se presentan algunos estudios en los que se ha utilizado este modelo con otros fines.

Autor	Descripción	Cepa de ratón
Scott, 1984	Determinación por Radioinmunoensayo (RIA) y ELISA, el isotipo IgG2a en mayor concentración en fase crónica.	BALB/c
Brodskyn, 1989	Determinación de las subclases de IgG en ratones infectados con mayor especificidad en IgG2 respecto a IgG1.	BALB/c
Cerban, 1992	Identificación de dos componentes antigénicos de 50 y 55 kDa para IgG1 específicas de tripomastigotes de la cepa EA 4.5	BALB/c
Santana, 2016	Infección de ratones y perros con las cepas Berenice-78, AAS y VL-10; se señala que los niveles de IgG1 mostraron correlación con la miocarditis por lo que se propone como candidato para marcador.	Swiss

Cuadro 5. Estudios donde se determinan IgG específicos anti-*T. cruzi* en modelo murino

5. JUSTIFICACIÓN

Los estudios de componentes proteicos son indispensables en las infecciones por microorganismos patógenos; los antígenos inmunodominantes son reconocidos por la respuesta inmune en el transcurso de las infecciones en forma diferencial. A la fecha existen investigaciones donde se estudian algunas proteínas inmunodominantes como candidatas para ser propuestas como marcadores biológicos y que están siendo evaluadas en pacientes cursando fase aguda y crónica de la enfermedad de Chagas.

A la fecha, no existen trabajos estandarizados en modelo murino con la infección por *T. cruzi* que permitan determinar el inicio de la producción de anticuerpos así como el aumento de los títulos de los mismos y su correlación con la respuesta en humano.

En este trabajo se propone la estandarización en modelo murino infectado con *T. cruzi*, para correlacionar con la evolución de la infección, el inicio y comportamiento de los títulos de anticuerpos del tipo IgG y la inmunodominancia proteica mediante Western-blot durante cien días.

6. HIPÓTESIS

En el humano se han determinado componentes inmunodominantes y anticuerpos del tipo IgG específicos contra *Trypanosoma cruzi*; entonces, probablemente, durante la evolución de la infección, esta respuesta sea semejante en el modelo murino.

7. OBJETIVOS

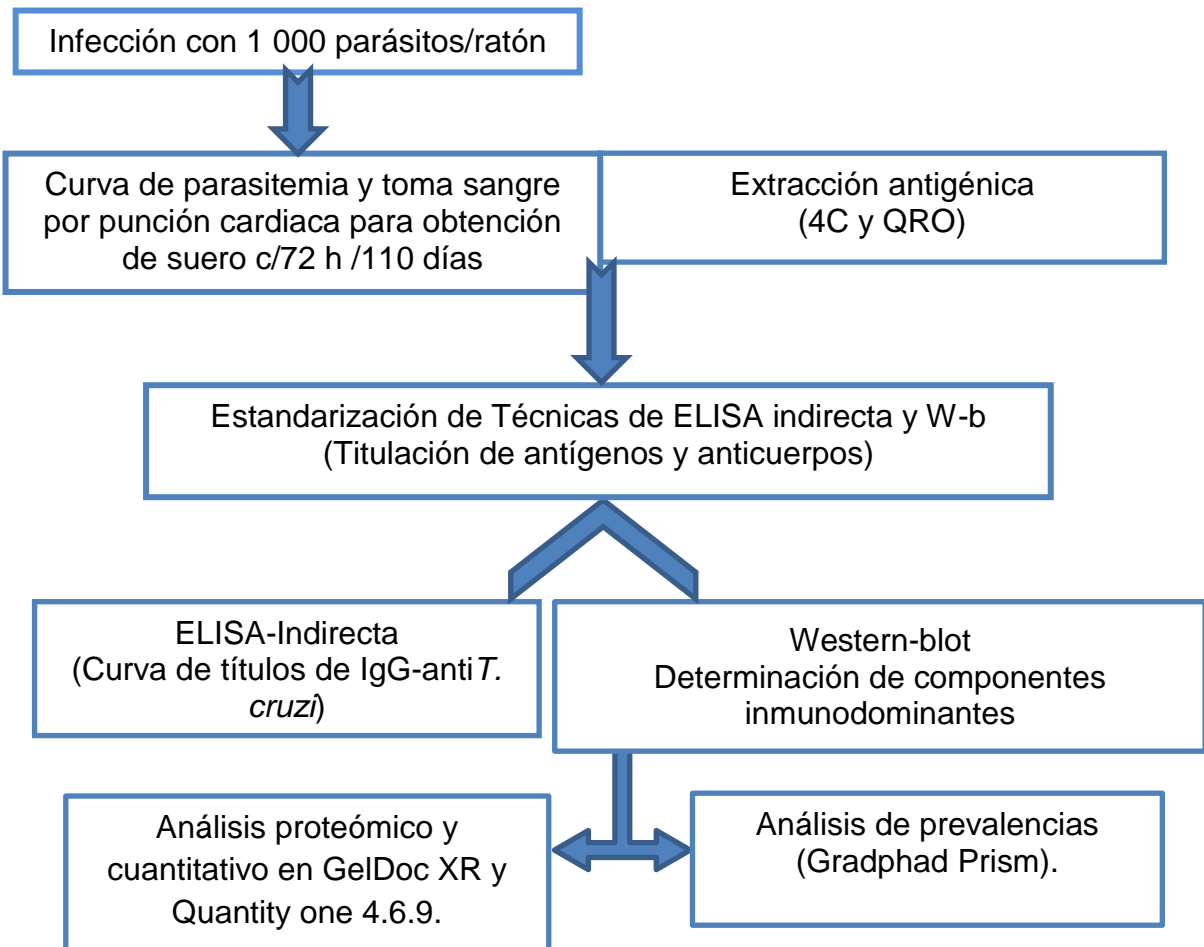
7.1. Objetivo general

Determinar en modelo murino, después de la infección por *T.cruzi*, durante 110 días, el perfil de reconocimiento glicoproteico y los niveles de anticuerpos por medio de técnica de ELISA con dos extractos antigénicos con diferente procedimiento de extracción y su correlación con la respuesta descrita en el humano.

7.2. Objetivos particulares

- Estandarizar por medio de curvas de parasitemia, el comportamiento de la infección por *T. cruzi* con el aislado QRO en modelo murino.
- Determinar el título de anticuerpos por medio de técnica de ELISA Indirecta con dos extractos antigénicos (4C y QRO).
- Identificar el patrón de componentes inmunodominantes prevalente a lo largo de la infección con ambos extractos antigénicos.
- Analizar el patrón de componentes inmunodominantes en modelo murino y su correlación con los perfiles descritos en el humano.

8. DISEÑO EXPERIMENTAL



9. METODOLOGÍA

9.1. Extracción antigénica

Para la extracción de antígenos parasitarios, se utilizaron cuatro aislados de *T. cruzi* del cepario del Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Cuadro 6. Características generales de los antígenos denominados 4C y QRO.

Fecha de Aislamiento	Aislado de:	Procedencia	Código internacional
1986	<i>T. barberi</i>	La Cueva, Querétaro	ITRI/MX/1986/QRO
1991	<i>M. pallidipennis</i>	Tequesquitengo, Morelos	ITRI/MX/1991/TQ
2003	<i>T. dimidiata</i>	Xalapa, Veracruz	ITRI/MX/2003/XAL
2007	Humano	Tanchahuil, SLP	MHOM/MX/2007/Cristi

La cepa QRO., originalmente aislada por la Dra. Paz María Salazar Schettino (Salazar, 1983) se seleccionó para ser estudiada como parte del extracto 4C y sola, debido a que ha mostrado ser de alta virulencia para el ratón.

9.2. Expansión parasitaria

La expansión parasitaria de cada aislado se realizó por separado en matraces de un litro de capacidad con medio de cultivo Infusión de hígado y triptosa (LIT) suplementado al 5% con suero fetal de bovino inactivado; se incubaron a 28°C y se realizaron tres pases antes de la cosecha parasitaria. Los cultivos se revisaron cada tercer día, hasta observar el inicio de la fase estacionaria (aproximadamente en el día 19).

9.2.1. Extracción antigénica

La extracción antigénica se realizó con algunas modificaciones, acorde con la metodología descrita (Bucio, 1999). Posterior a la cosecha parasitaria, se realizaron cinco lavados con amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.2 A 3500 rpm a 4°C durante 20 min en centrifuga refrigerada (Sorvall® modelo RT 6000 D); se cuantificó la masa parasitaria, se resuspendió en una solución de Tris HCl 50 mM pH 7.4 y se agregaron los inhibidores de proteasas (Complete mini Roche®). El fraccionamiento parasitario se realizó por sonicación con un procesador ultrasónico (Vibra Cell VC50); se aplicaron 7 pulsos de 1 min a 40 watts en baño frío, posteriormente se centrifugó a 20,000 rpm durante 60 min a 4°C en centrifuga refrigerada (Sorvall RC 26 Plus), por último se separó el sobrenadante en tubos Eppendorf y se conservó a -40°C hasta su uso.

9.3. Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas de ambos extractos, se realizó por medio del método colorimétrico del ácido bicinconínico con un kit comercial (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, cat. No. 23225); este método se seleccionó, debido a su alta sensibilidad en comparación con otros métodos colorimétricos dentro de un rango de 0.5 µg a 10 µg; el cálculo de las concentraciones de proteínas totales se obtuvo por medio de la regresión lineal obtenida a partir de la curva de calibración con BSA. La densidad óptica se determinó a una longitud de onda de 580nm.

9.4. Modelo animal

Para la obtención de los sueros empleados en este trabajo y para la elaboración de las curvas de parasitemia, se utilizaron dos grupos de ratones hembra de 28-30g de la cepa CD1 obtenidos del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. CD1 es una cepa no-endogámica, que permite obtener distintas respuestas inmunológicas después de la infección.

Durante el desarrollo de este trabajo, el manejo y cuidado de animales, se realizó acorde con las consideraciones éticas señaladas en la Norma Oficial Mexicana

(NOM-062-ZOO-1999) “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

9.5. Curvas de parasitemia

Se preparó el inóculo previamente estandarizado de la cepa QRO con 1000 parásitos de *T. cruzi* por cada ratón en 200µL de PBS. Se realizó un conteo parasitario obteniendo 10µL de sangre de la cola de un ratón infectado por medio de una cámara de Neubauer, una vez conocida la parasitemia del ratón infectado se procedió a obtener la cantidad de sangre necesaria y se preparó el inóculo para infectar 40 ratones.

La cuantificación de la parasitemia se realizó cada tercer día a partir de la infección en cámara de Neubauer con 10µl de sangre + 10 µL de EDTA + 80 µL de PBS (dilución 1:10).

9.6. Sueros de ratón

Se infectaron 85 ratones con 1000 parásitos de la cepa QRO, se sacrificaron 5 ratones infectados y tres ratones control cada 3 días a partir del día 5 hasta el día 110 previa obtención de sangre por punción cardiaca.

La sangre obtenida se colocó en tubos tipo Eppendorf de 1.6 mL debidamente etiquetados sin anticoagulante. Después de una hora de incubación a 37°C se centrifugo a 2500 rpm durante 15 minutos. Se separó el suero del paquete globular y se glicerizó en dilución 1:2 para su conservación y almacenamiento en congelación hasta su uso.

9.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (sds-page-12%).

Estos ensayos se realizaron en términos generales, según la técnica originalmente descrita por Laemmli en 1970 con algunas modificaciones.

La electroforesis de los componentes de los extractos antigénicos, se realizó en condiciones reductoras en poliacrilamida con gel separador al 12.5% y concentrador

al 5% con dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 10% en un equipo Mini Protean Tetra Cell, Bio Rad® (Cat. 1658004 EDU) a una diferencia de potencial constante de 150 Volts durante aproximadamente 90 min, con una fuente de poder Bio-Rad, Modelo 200/2.0 en amortiguador de corrida.

Inicialmente se tituló la cantidad de proteína a utilizar en un rango entre 5 y 500 µg de proteína por carril con amortiguador de muestra comercial (Bio-Rad No. cat 161-0737), se utilizó un marcador de peso molecular comercial con rango de 10 a 250 kDa (Precision Plus Protein Standards, BIO-RAD 161-0374); después de la titulación, se determinó la cantidad de 198 µg de proteína por gel para el antígeno QRO y de 462µg para el antígeno 4C para ser utilizado en un equipo Multiscreen.

9.8. Electroinmunotransferencia (Western-blot)

Los ensayos de Western-blot se realizaron en términos generales, según lo descrito por Towbin en 1979 con algunas modificaciones.

Después del corrimiento electroforético, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa con poro de 0.45 µm, en un equipo Bio-Rad (Trans-Blot® Turbo Transfer System, Cat. 1704150) con una diferencia de potencial de 15 volts durante 30 min. Posterior a la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con PBS/Tween 20 0.3%/leche 5% durante 2 horas a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados e incubaron los sueros control negativo, reactivo a *T. cruzi* y sueros problema en dilución 1:100 a 4°C durante 12 horas en un equipo Mini-PROTEAN II Multiscreen (Bio-Rad Cat. 1704017); después de 3 lavados, se incubó con el conjugado anti IgG de ratón unido a peroxidasa previamente titulado, en dilución 1:15000 durante 2 h (T.A.). Se realizaron 5 lavados y se reveló con 3,3' Diaminobenzidina (DAB, Bio-rad, Cat. No. 170-6535) en oscuridad, para finalmente frenar la reacción con agua destilada a los 5 min.

9.9. Estandarización de la técnica de ELISA en microplaca

La técnica de ELISA se realizó en términos generales, según lo descrito por Voller en 1975, con algunas modificaciones. La detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*, se realizó mediante la técnica de ELISA Indirecta en microplaca de poliestireno de 96 pozos con fondo plano (Costar®), los antígenos y conjugados fueron previamente titulados para finalmente utilizar la dilución de 1:300 para el antígeno QRO y 1:600 para 4C, el periodo de incubación fue de 12 horas a 4°C; posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS/Tween 20 al 0.05% y fueron bloqueadas durante 1h (T.A.) con PBS/leche al 5%, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS/Tween 20 al 0.05% para proceder a la incubación por duplicado de todos los sueros con ambos antígenos; los sueros control positivos y negativos (de origen humano y de ratón) y los sueros problema se utilizaron en dilución 1:100 en un volumen de 100 µL por pozo, se incubaron durante 30 min a 37°C; se realizaron 3 lavados y se incubaron en un volumen de 100 µL con el conjugado anti IgG de ratón unido a peroxidasa (anti-mouse IgG-HRP, Invitrogen) en dilución de 1:3000 para el Ag. QRO. Y de 1:2000 para 4C durante 30 min a 37°C; se realizaron 5 lavados y la reacción se reveló con el sustrato y el cromógeno (peróxido de hidrógeno en solución tampón de fosfato citrato pH5, OPD), la reacción se detuvo a los 15 min con 100 µL de ácido sulfúrico 1N por pozo. La lectura de la D.O. se realizó en espectrofotómetro de microplacas a 490 nm (ELISA Microplate Reader, modelo 550, Bio-Rad®). El título de corte (Cut-off) se calculó con el valor promedio de los resultados de los sueros negativos + 2 o 3 desviaciones estándar (Cura y Wendel, 1994).

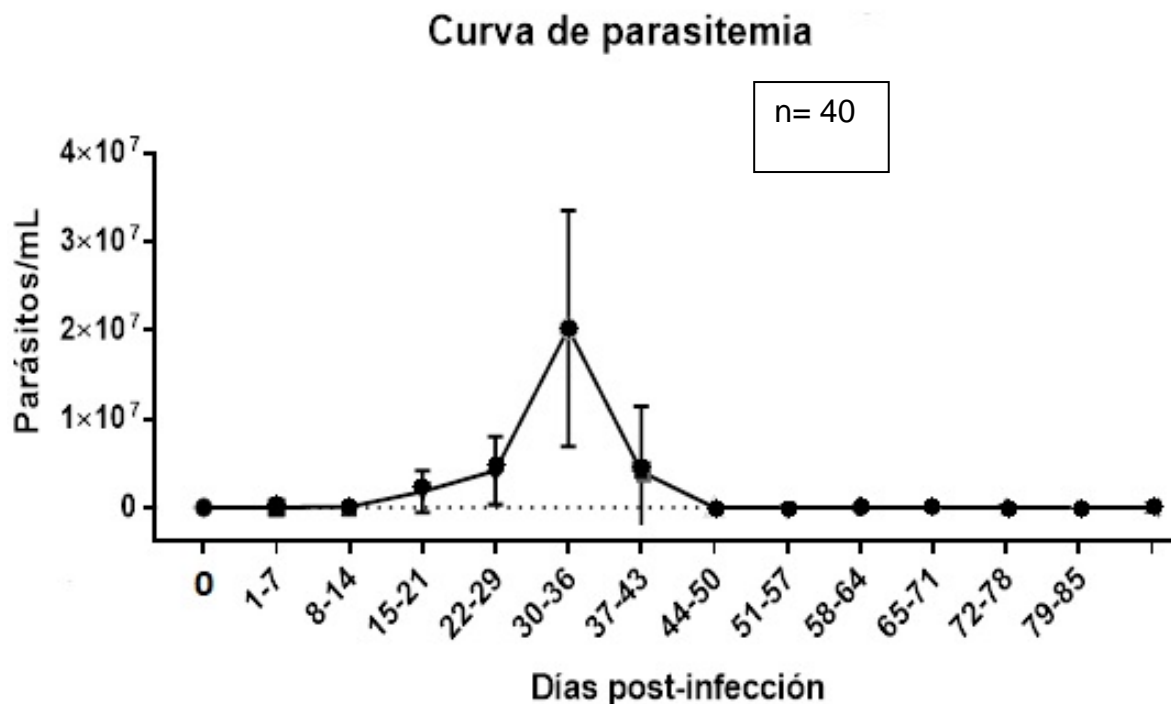
9.10. Obtención de pesos moleculares de los componentes del extracto proteico

El cálculo de los pesos moleculares de cada componente detectado (kDa) se realizó al capturar la imagen de las membranas con un equipo GelDoc XR por medio del software de análisis Quantity One versión 4.6.9 (Bio Rad ®).

10. RESULTADOS

10.1. Curva de parasitemia

La parasitemia inició a los 14 días pos-infección (dpi); el mayor número de parásitos (2×10^7 parásitos/mL) se observó a los 33 dpi. El promedio del final de la fase *log* de la curva de crecimiento se registró a los 33 dpi. El promedio de valores mínimos fue de 0 parásitos y el promedio de valores máximos fue de 2.018×10^7 parásitos/mL, según se aprecia en la (Gráfica 1).



Gráfica 1. Curva de parasitemia con inóculo de 1000 parásitos.

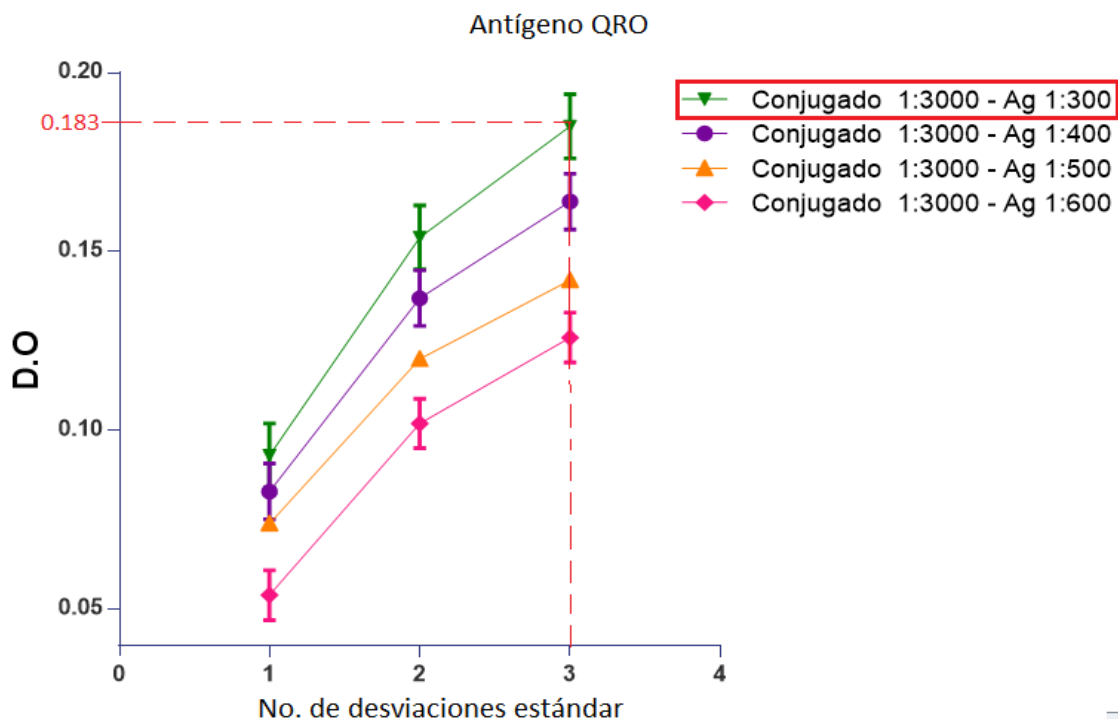
● Media. Kruskal-Wallis (P= 0.9854).

10.2. Inmunoensayo enzimático (ELISA)

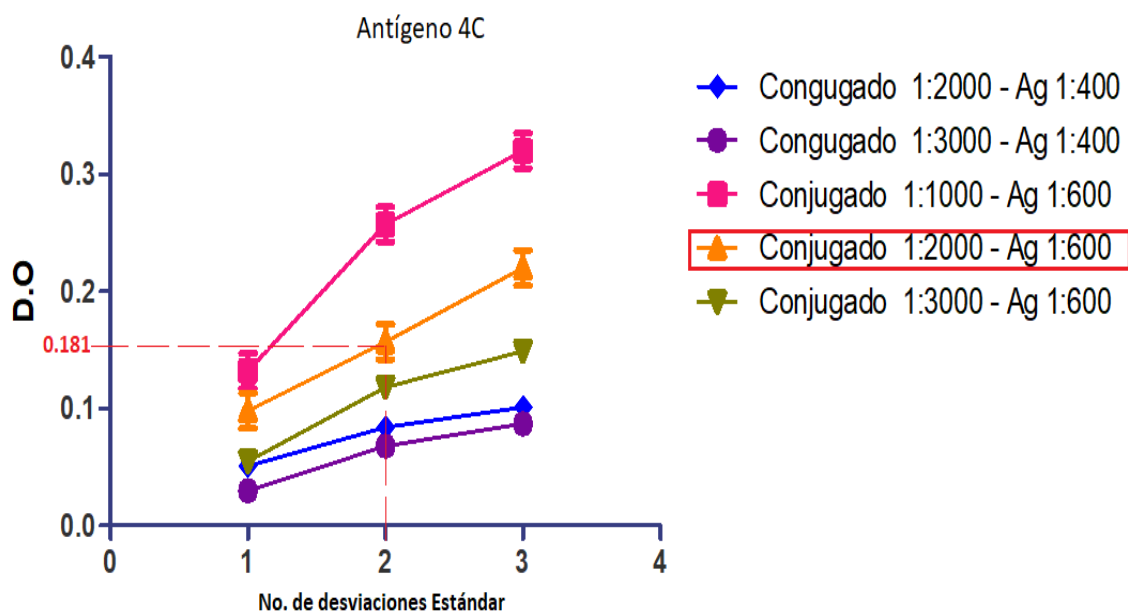
10.2.1. Determinación del título de corte

Para la determinación de los títulos de corte, al analizar y correlacionar las variables de concentraciones antigénicas y de conjugados, se aprecia que para el antígeno QRO, con la dilución de antígeno 1:300 y de conjugado, 1:3000 (Gráfica 2); el valor

para el título de corte fue de 0.183 (D.O. 490nm) y para el antígeno 4C se determinó en 0.181 (D.O. 490nm) con dilución del antígeno en 1:600 y de conjugado 1:2000, según se aprecia en la Gráfica 3.



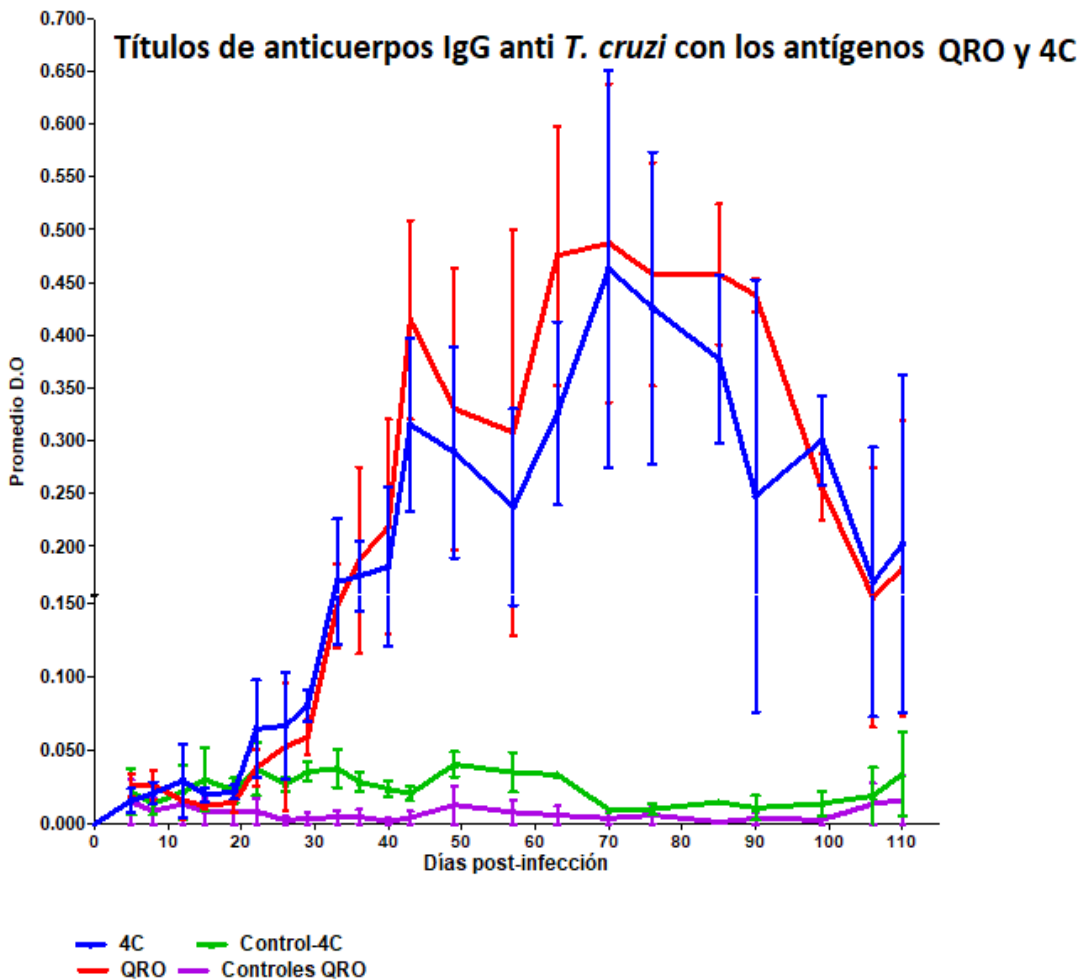
Gráfica 2. Determinación del título de corte para el antígeno QRO.



Gráfica 3. Determinación del título de corte para el antígeno 4C.

10.2.2. ELISA indirecta en suero de ratones infectados

En la gráfica 4 se muestra el promedio de D.O. de los anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en un periodo de 110 días de infección, así como el promedio de D.O. en sueros de ratones no infectados (controles); ambos evaluados con los 2 antígenos donde se aprecia que no existe diferencia en los valores de los sueros reactivos con un incremento progresivo en la reactividad a partir del día 40 posterior a la infección; del día 50 al 90 se aprecian las reactividades más altas (0.400-0.500 D.O.), para finalmente mostrar una disminución progresiva hasta el día 110 con reactividades de 0.200 D.O. que se mantienen hasta el día 110 en los sueros de los ratones infectados.

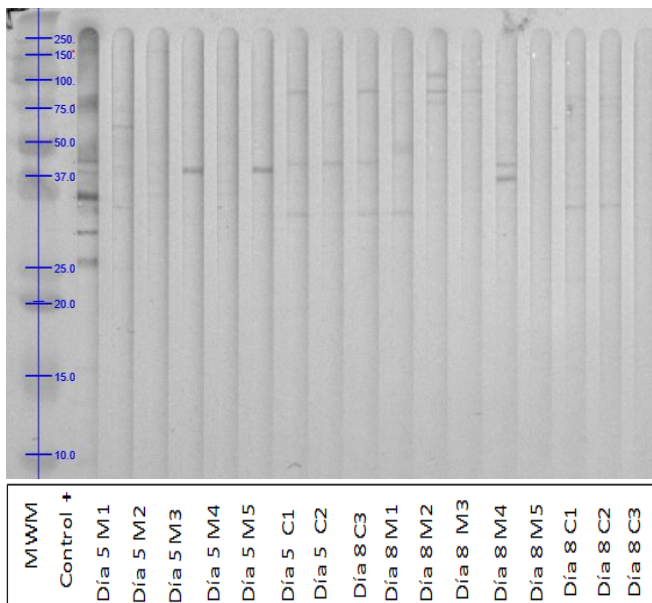


Gráfica 4. ELISA Indirecta en sueros de ratones infectados y no infectados. **Reactivos:** ≥ 0.181 (D.O. 490 nm). **No reactivos:** ≤ 0.160 (D.O. 490 nm).

10.2.3. Western blot en sueros de ratones infectados

Se realizó la técnica de Western blot con cada extracto antigénico donde se puede observar la detección del inicio y de la evolución de la reactividad proteica, con predominio de algunas glicoproteínas inmunodominantes específicas a partir del día 23 dpi en el caso de QRO y 16 dpi en el caso de 4C; el análisis comparativo se presenta en las figuras 10 a 19.

Western-blot de los extractos antigénicos



Ag. QRO, Día 5 al 15

Frecuencia de detección de componentes Inmunodominantes Ag QRO Día 5-15

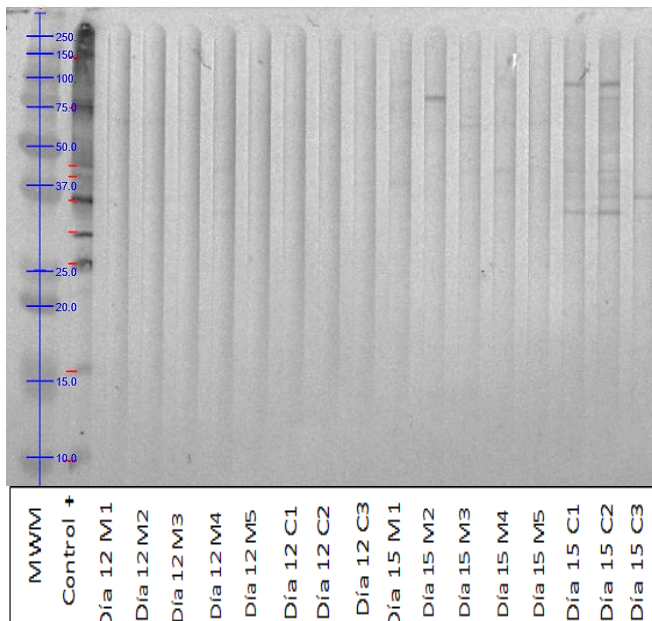
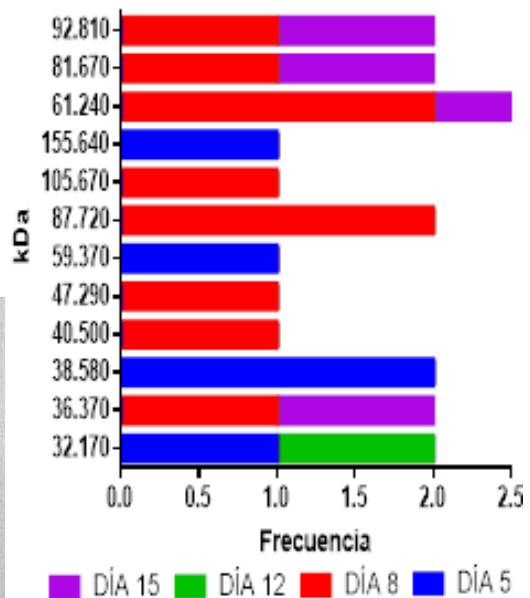
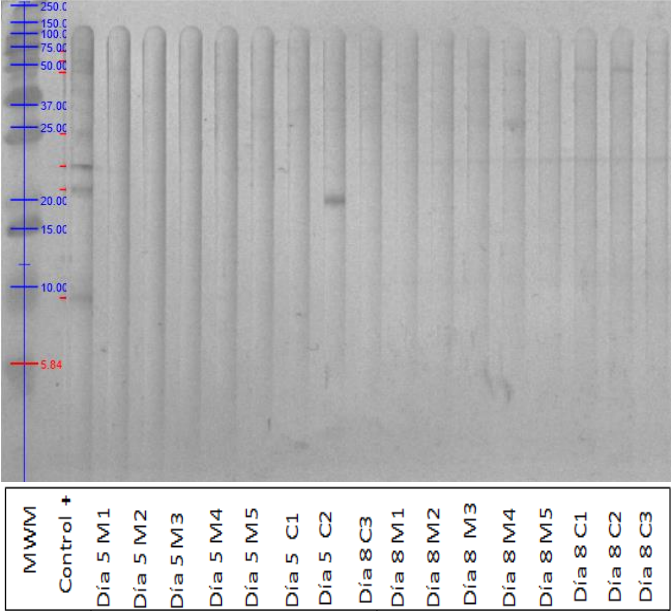


Figura 10. Revelado con 3'3 DAB; MWM- Marcador de pesos moleculares, M1 a M5-Sueros de ratones infectados, C1 a C3-Controles no infectados. **DERECHA-** Frecuencia de detección de componentes en la evolución de la infección.

Western-blot de los extractos antigénicos

Ag. 4C, Día 5 al 15



Frecuencia de detección de componentes Inmunodominantes Ag 4C Día 5-15

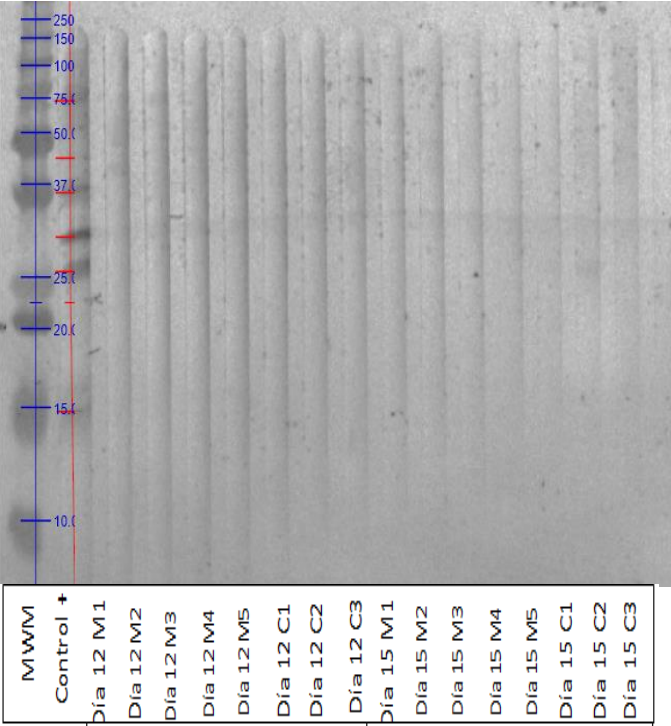
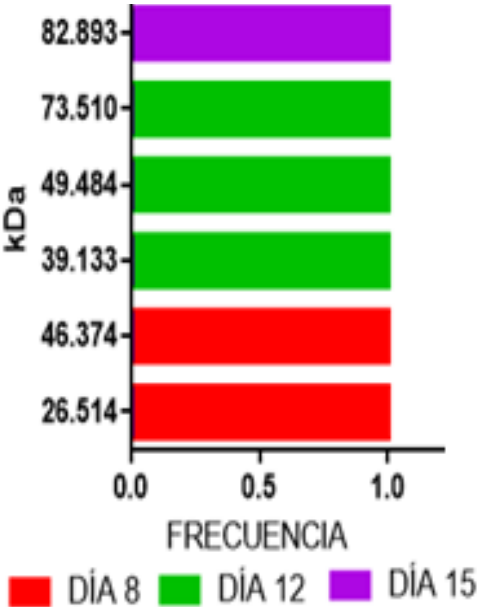
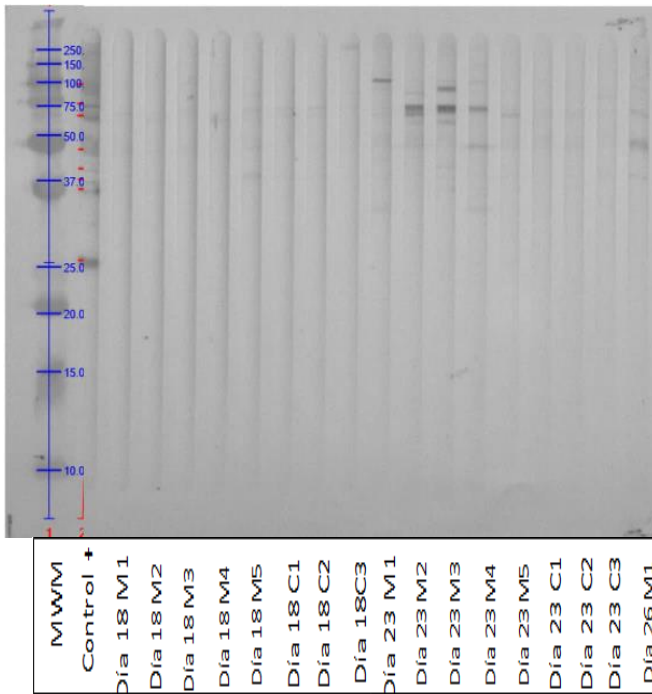


Figura 11. Revelado con 3'3 DAB; **MWM**- Marcador de pesos moleculares, **M1 a M5**-Sueros de ratones infectados, **C1 a C3**-Controles no infectados. **DERECHA**- Frecuencia de detección de componentes en la evolución de la infección.

Ag QRO. Días 18 al 33

Western-blot de los extractos antigénicos



Frecuencia de detección de componentes Inmudominantes Ag QRO

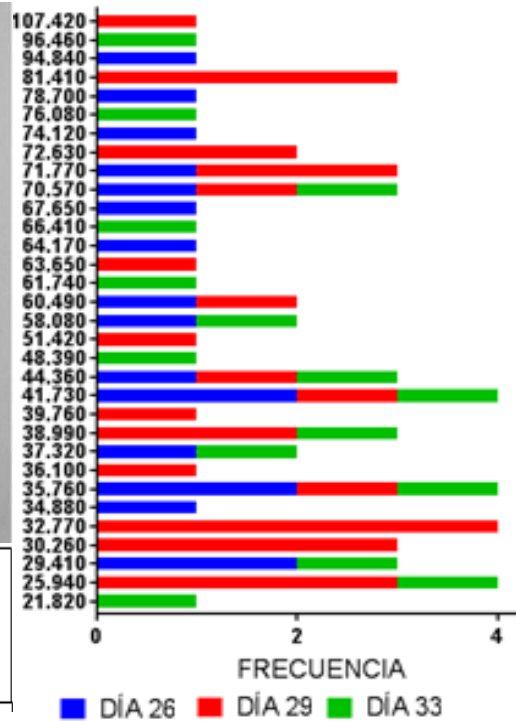
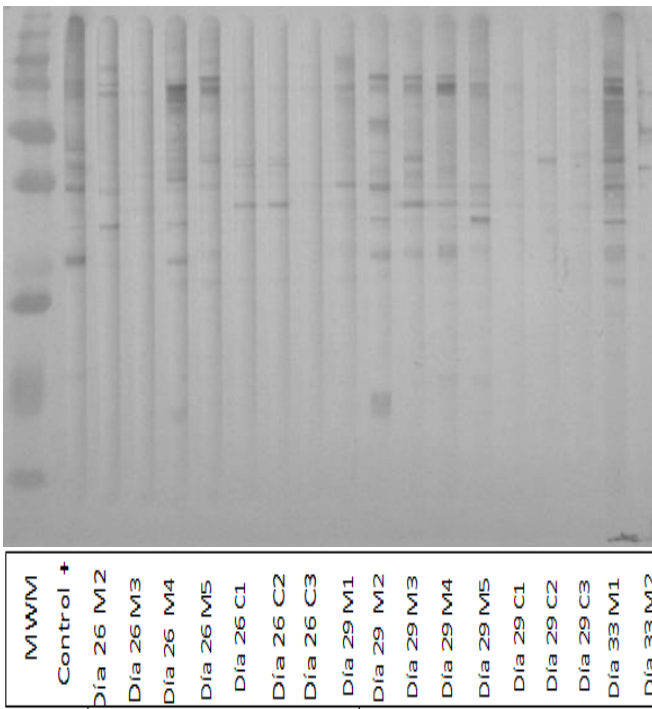
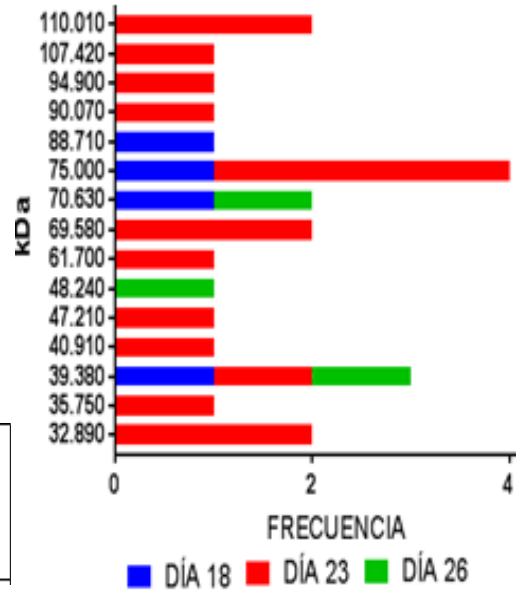
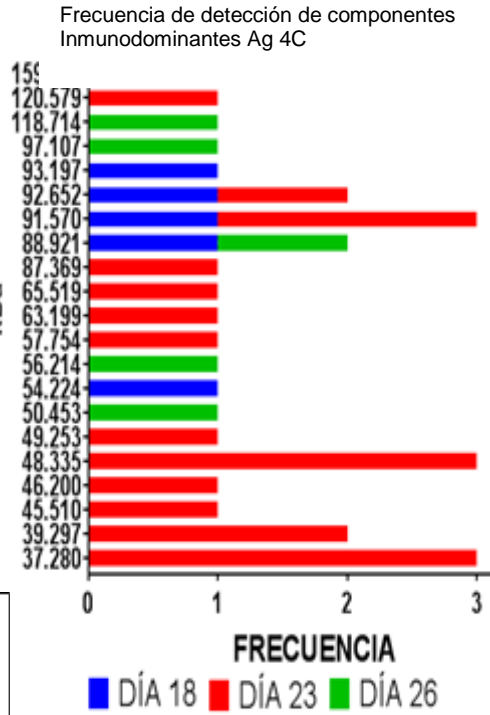
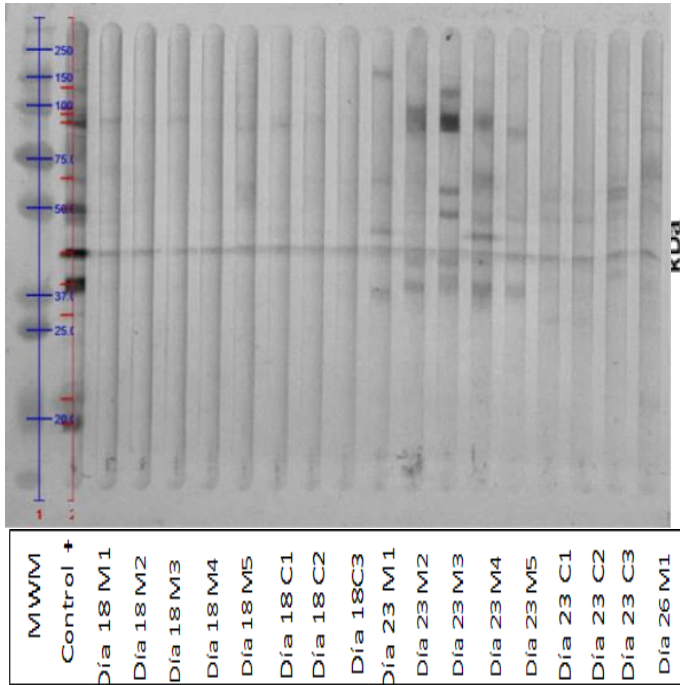


Figura 12. Revelado con 3'3 DAB; **MWM**-Marcador de pesos moleculares, **M1 a M5**-Sueros de ratones infectados, **C1 a C3**-Controles no infectados. **DERECHA**-Frecuencia de detección de componentes en la evolución de la infección.

Western-blot de los extractos antigénicos

Ag 4C. Días 18 al 33



Frecuencia de detección de componentes Inmunodominantes Ag 4C

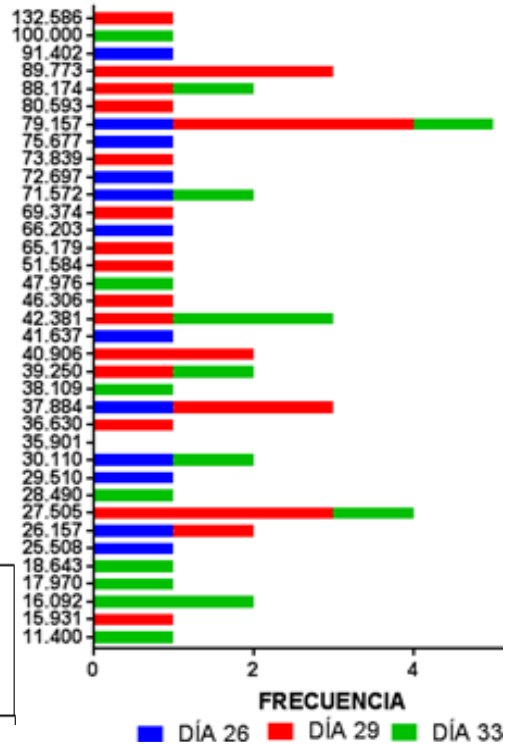
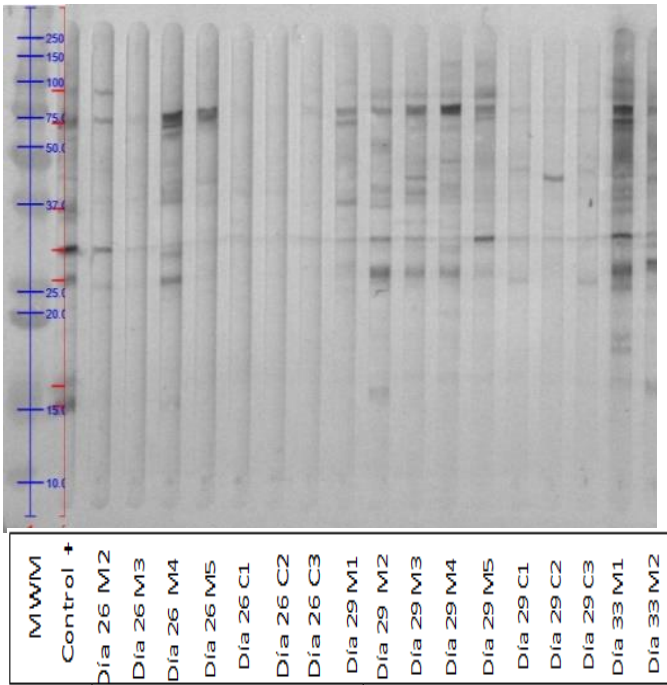
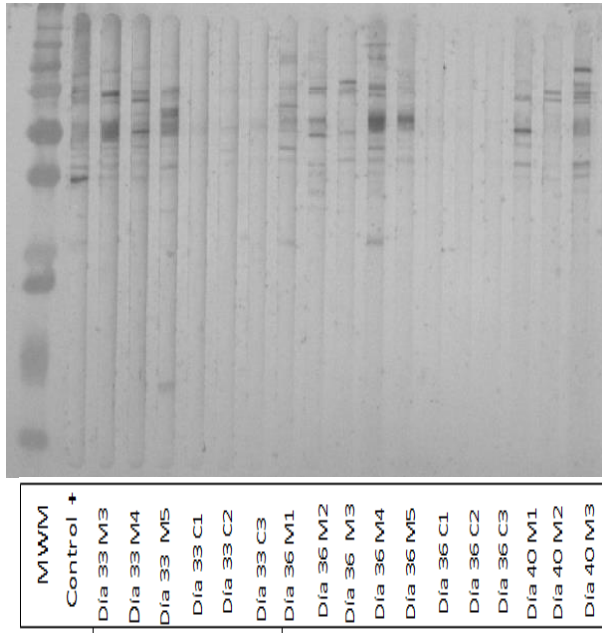


Figura 13. Revelado con 3'3 DAB; **MWM**-Marcador de pesos moleculares, **M1 a M5**-Sueros de ratones infectados, **C1 a C3**-Controles no infectados. **DERECHA**-Frecuencia de detección de componentes en la evolución de la infección.

Western-blot de los extractos antigénicos

Ag QRO. Días 33 al 49



Frecuencia de detección de componentes
Inmunodominantes Ag QRO

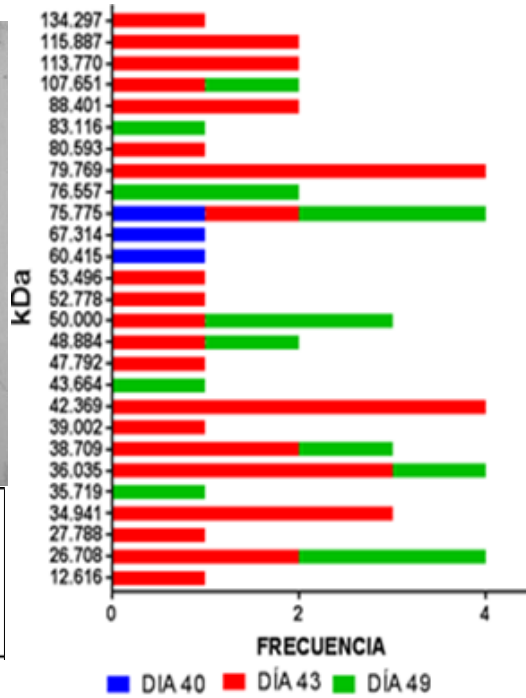
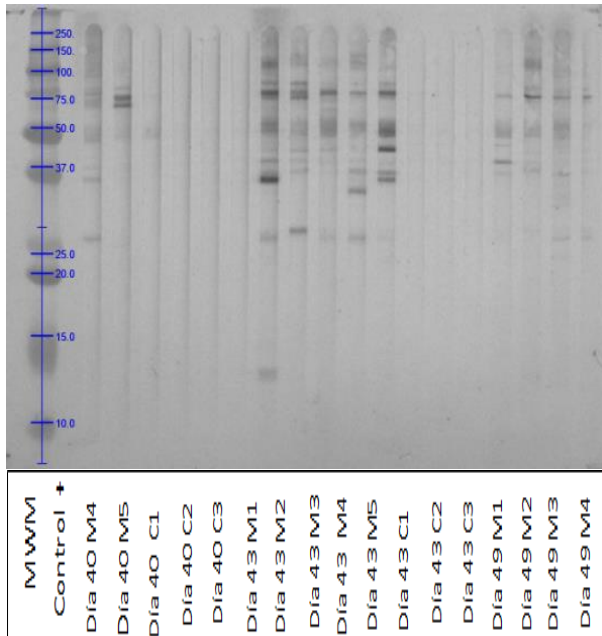
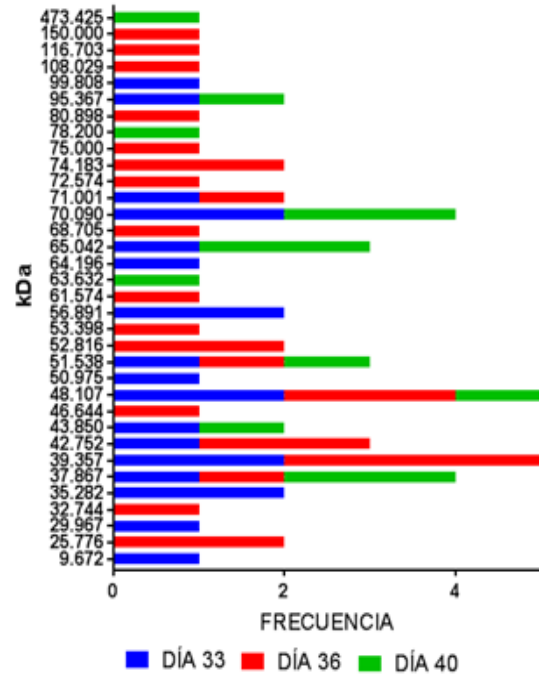
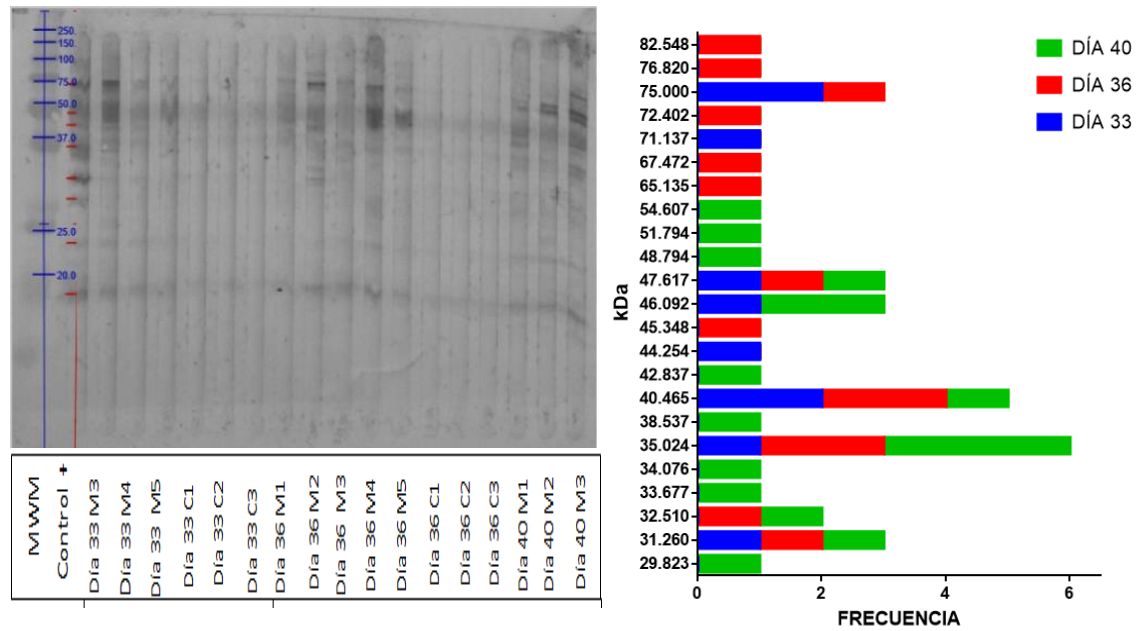


Figura 14. Revelado con 3'3 DAB; **MWM**-Marcador de pesos moleculares, **M1 a M5**- Sueros de ratones infectados, **C1 a C3**-Controles no infectados. **DERECHA**-Frecuencia de detección de componentes en la evolución de la infección.

Western-blot de los extractos antigénicos

Ag 4C. Días 33 A 49



Frecuencia de detección de componentes Inmunodominantes Ag 4C

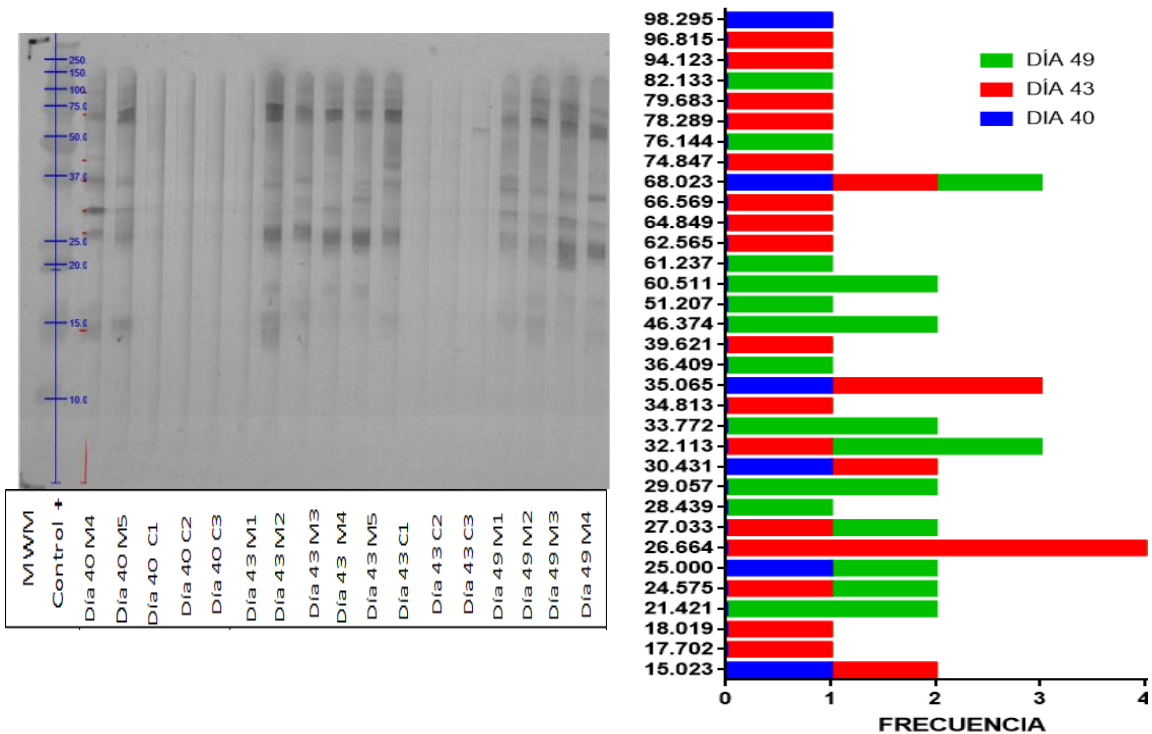


Figura 15. Revelado con 3'3 DAB; **MWM**-Marcador de pesos moleculares, **M1 a M5**- Sueros de ratones infectados, **C1 a C3**-Controles no infectados.
DERECHA- Frecuencia de detección de componentes en la evolución de la infección.

Ag QRO Días 49 al 85

Western-blot de los extractos antigénicos

Frecuencia de detección de componentes Inmunodominantes Ag QRO

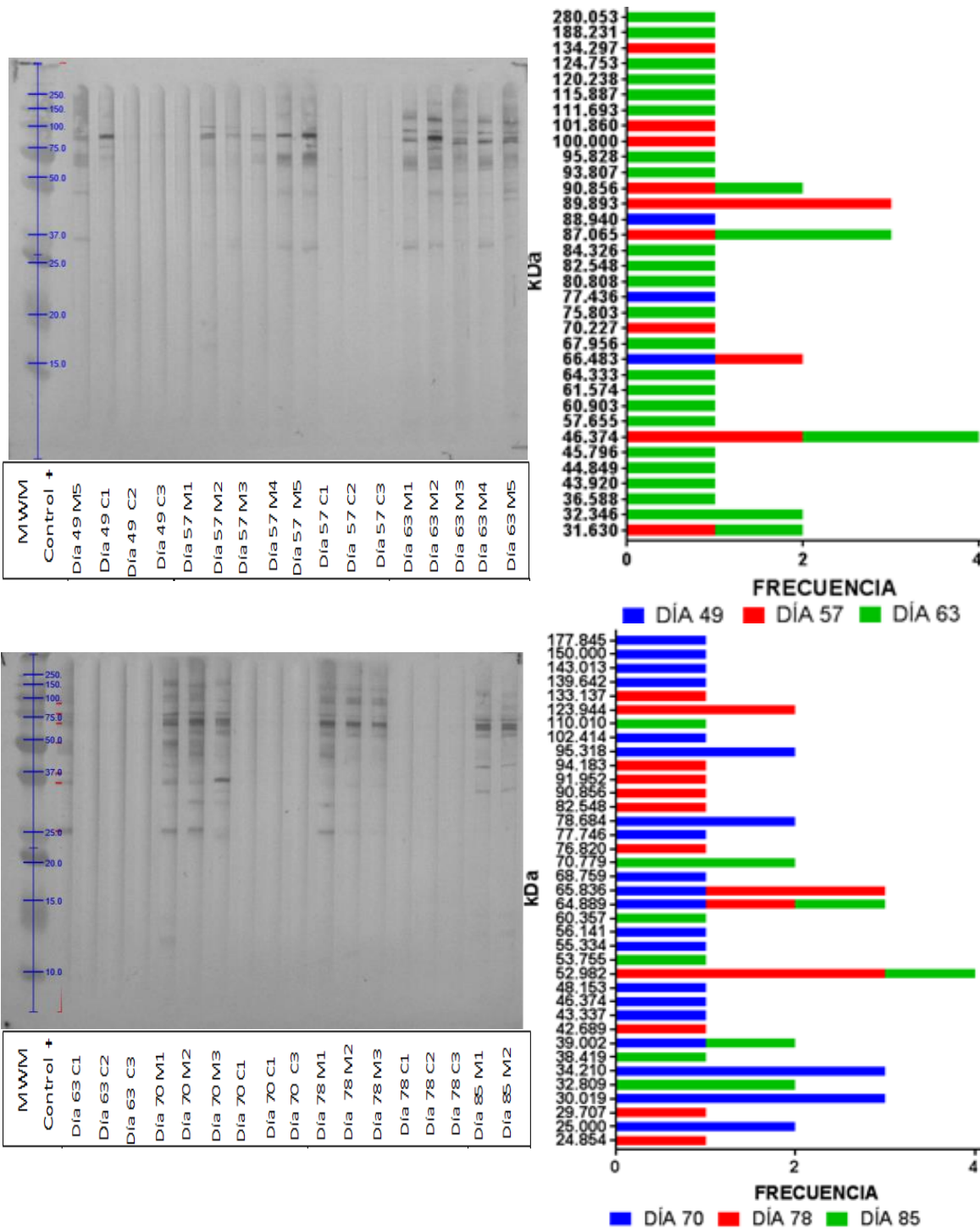


Figura 16. Revelado con 3'3 DAB; **MWM**-Marcador de pesos moleculares, **M1 a M5**-Sueros de ratones infectados, **C1 a C3**-Controles no infectados. **DERECHA**- Frecuencia de detección de componentes en la evolución de la infección.

Western-blot de los extractos antigénicos

Ag 4C Días 49 al 85

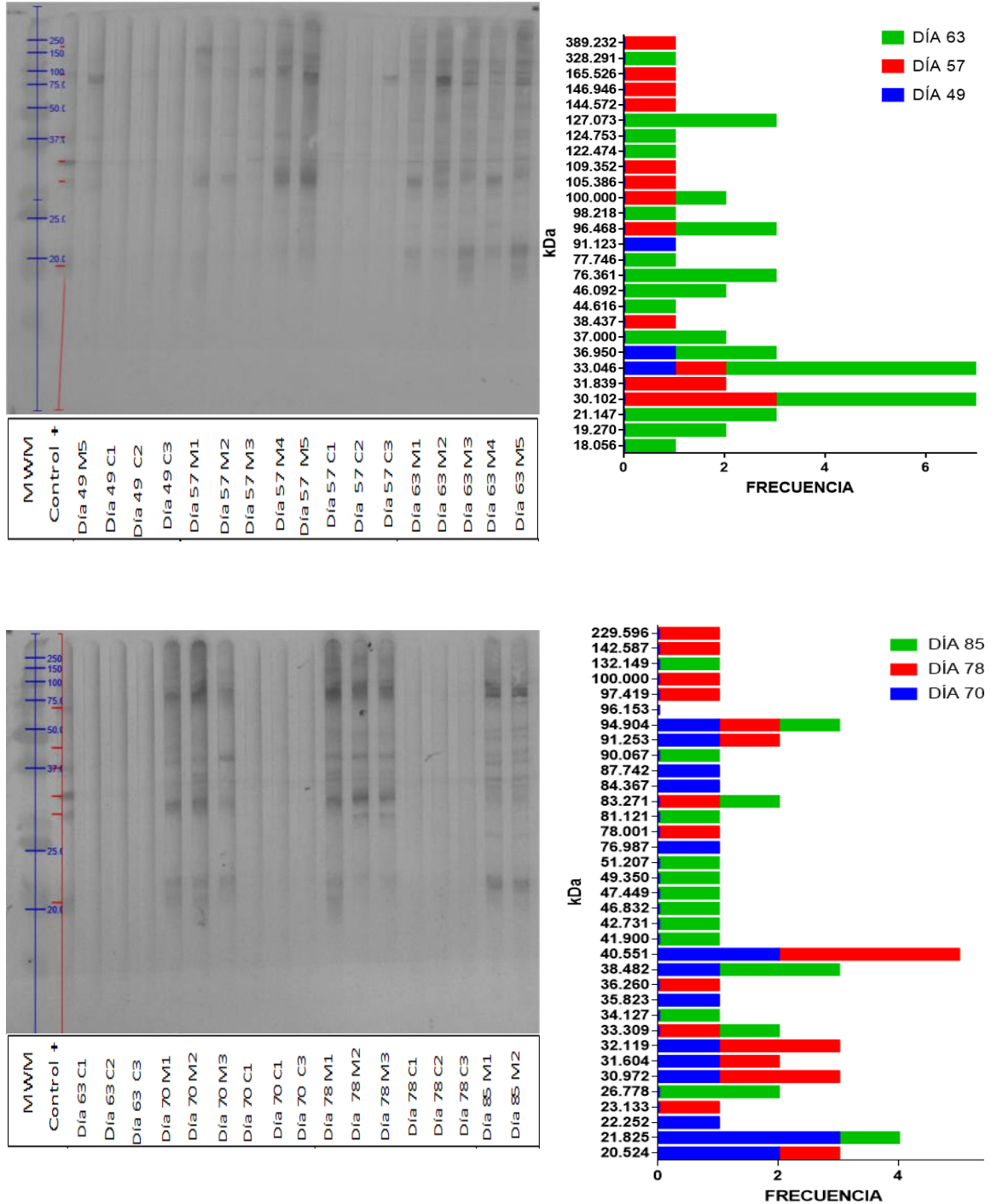
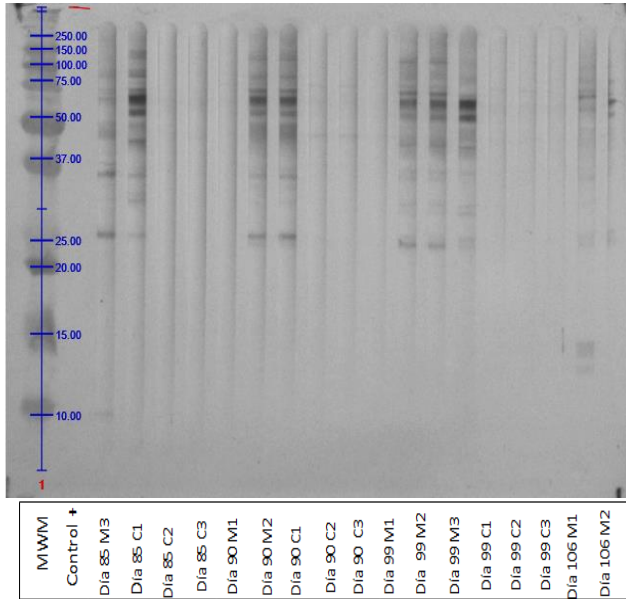


Figura 17. Revelado con 3'3 DAB; **MWM**-Marcador de pesos moleculares, **M1 a M5**-Sueros de ratones infectados, **C1 a C3**-Controles no infectados. **DERECHA**- Frecuencia de detección de componentes en la evolución de la infección.

Western-blot de los extractos antigénicos

Ag QRO Días 85 al 110



Frecuencia de detección de componentes Inmudominantes Ag QRO

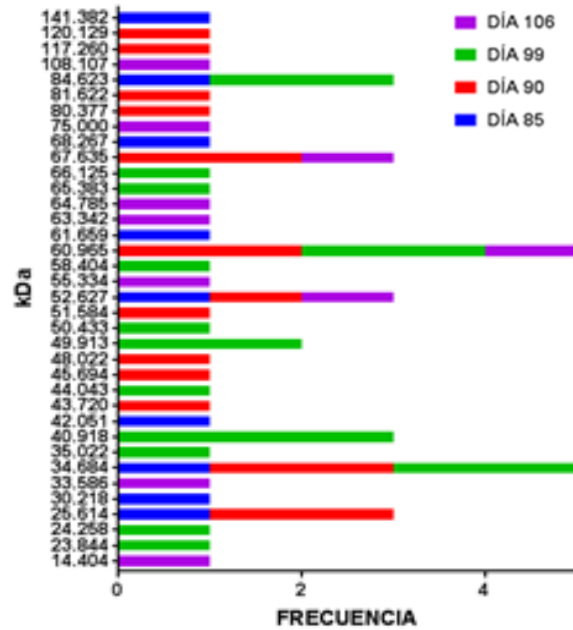
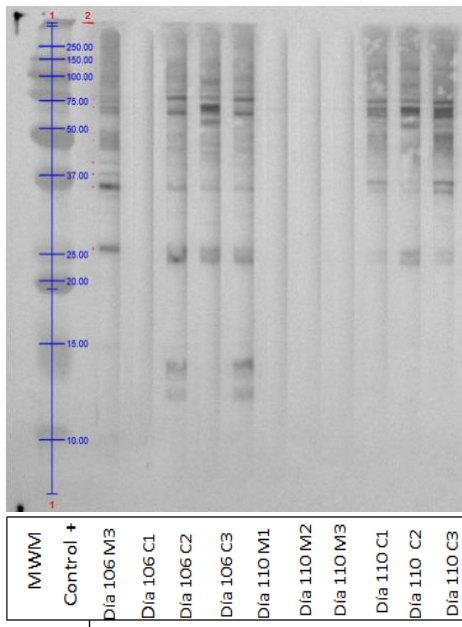


Figura 18. Revelado con 3'3 DAB; MWM-Marcador de pesos moleculares, M1 a M5-Sueros de ratones infectados, C1 a C3-Controles no infectados. DERECHA- Frecuencia de detección de componentes en la evolución de la infección.

Western-blot de los extractos antigénicos

Ag 4C Días 85 al 110

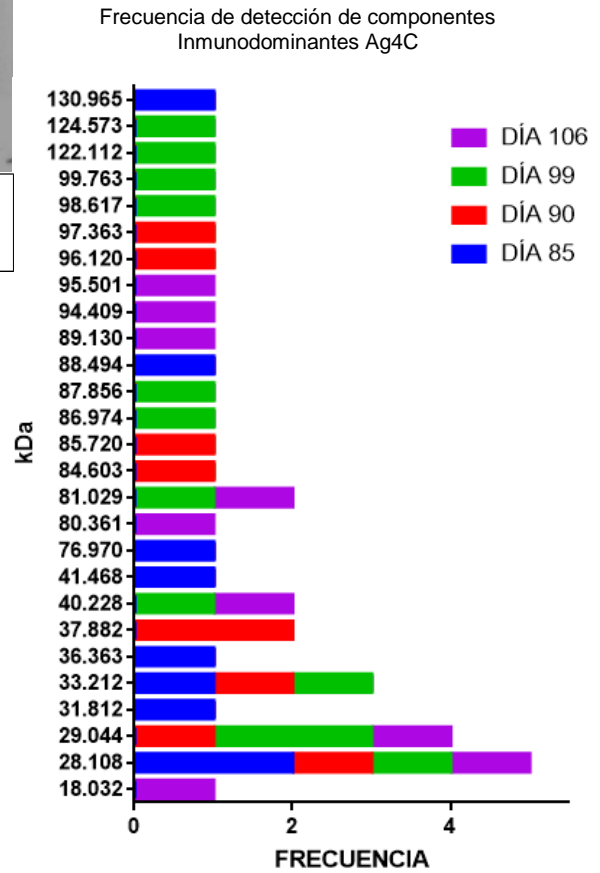
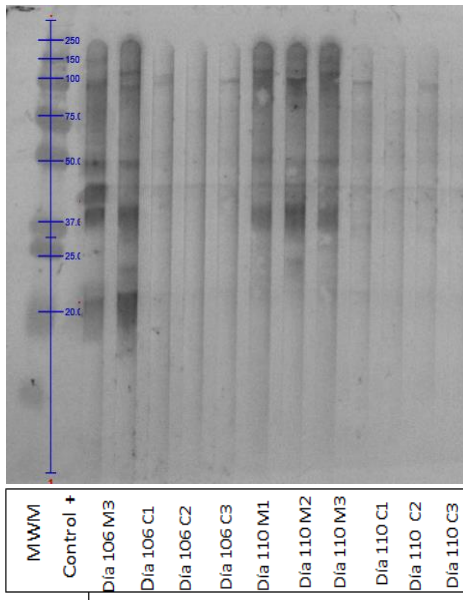
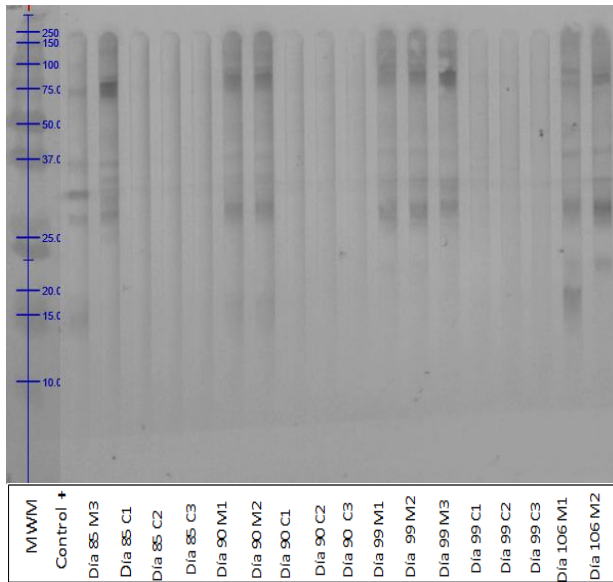


Figura 19. Revelado con 3'3 DAB; **MWM**-Marcador de pesos moleculares, **M1 a M5**- Sueros de ratones infectados, **C1 a C3**-Controles no infectados. **DERECHA**- Frecuencia de detección de componentes en la evolución de la infección.

11. DISCUSIÓN

La cepa QRO ha sido reportada como altamente virulenta al presentar una mortalidad en modelo murino a partir de los 18 días posteriores a la infección con un inóculo de 1×10^6 parásitos con un máximo de parasitemia al día 15 (De Haro, 1997); con este antecedente y con la finalidad de obtener sobrevivencia hasta la cronicidad en los ratones, en esta tesis se utilizó un inóculo de 1000 parásitos, se observó un máximo de parasitemia al día 33; estos resultados coinciden con lo descrito por Silva, en 1999 y Lavín en 2017, usando un inóculo de 1000 parásitos y encontrando un máximo de parasitemia entre los días 30 y 33 posterior a la infección; esta disminución del inóculo nos permite dar un seguimiento de la evolución de la infección-enfermedad y, así, poder observar la fase aguda y el inicio de la fase crónica. En el análisis estadístico Kruskal-Wallis, se puede inferir que el comportamiento de la parasitemia en el modelo murino, fue homogéneo a pesar de utilizar una cepa genéticamente abierta, como teóricamente ocurre en el humano en el transcurso de la infección natural.

Los primeros anticuerpos que aparecen en la enfermedad de Chagas son los del tipo IgM, alcanzado un pico máximo en la semana dos posterior al periodo de infección, y desaparecen por completo entre las 4 y 8 semanas, seguidos de un aumento paulatino de anticuerpos IgG; estos permanecen por años, razón por la cual son utilizados como herramientas importantes no sólo para el serodiagnóstico, sino además como marcadores biológicos con diversos fines; por esta razón, en este trabajo se estandariza del sistema de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos del tipo IgG siguiendo en términos generales la metodología descrita para estos procedimientos en la serología convencional con sueros de origen humano (Cura E.; Wendel S, 1994).

Una vez establecidos los valores de títulos de corte, se determinó que coinciden al título de corte establecido en el Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina en sueros humanos lo que permite tener un modelo semejante al humano y permitir el análisis de similitudes entre ambas especies.

Los valores de D.O. obtenidos por medio de la técnica de ELISA para sueros de ratones infectados muestran reactividad similar, a pesar de las naturalezas de los antígenos ya que el antígeno 4C tiene una mayor versatilidad antigénica, a diferencia de QRO que presenta mayor sensibilidad en ocasiones con detrimento de la especificidad, según ha sido señalado por la OPS con otras pruebas serológicas con antígenos similares en estudio epidemiológicos masivos (2005-2007 OPS OMS).

Al evaluar los resultados de las curvas de parasitemia y los títulos de anticuerpos, se propone considerar que en el periodo de los días 1 a 40 dpi, probablemente se presenta la fase aguda en modelo murino, debido a que en estos días se encuentra una elevada parasitemia característica de esta fase; así mismo, se determinó como el probable inicio de la fase crónica al intervalo de 40-50 días posterior a la infección que se caracterizó por la incipiente detección e incremento en los títulos de anticuerpos del tipo IgG, acompañado de la disminución de parásitos en sangre hasta llegar a no ser detectables, y finalmente, se podría determinar como la fase crónica a los días posteriores al día 50 de infección, con parasitemia no detectable y títulos de anticuerpos elevados.

Con base en lo anterior, de forma paralela se realizó la Técnica de Western-blot para determinar el perfil de reconocimiento proteico a lo largo de la infección; este procedimiento ha sido empleado en un gran número de trabajos para la identificación y detección de proteínas y glicoproteínas inmunodominantes específicas en el serodiagnóstico. El análisis de las glicoproteínas prevalentes en el transcurso de la enfermedad de Chagas continúa en estudio; varios autores, como Silveira y Umezawa, proponen que ciertas proteínas son inmunodominantes dependiendo de la fase en la que se encuentra el paciente, debido a la amplia oferta antigénica de *T. cruzi* respecto al huésped vertebrado siendo las más comunes las mucinas y transialidasas (De Lima Rivero, 2001); sin embargo, se han utilizado poco en diagnóstico convencional y aun no se han definido como proteínas específicas de fase, tema que aún continúa en estudio.

Con base en lo anterior se resumen en el siguiente cuadro, los componentes inmunodominantes en el transcurso de la infección durante el período comprendido entre el día 5 y 110.

Probable:	QRO		4C
	Días	kDa	kDa
Fase Aguda	5-8	-	-
	12-15	-	-
	18-26	-	48, 88
	26-33	44	79, 89
	33-40	48	-
Inicio de la Fase Crónica	41-49	50	47
Fase Crónica	50-63	46, 87, 90	21, 30, 77, 127
	70-85	30, 52, 90, 95, 127	20, 21, 30, 90, 94
	85-106	52, 60, 84	90
	106-110	90, 127	20, 30, 90, 127

Cuadro 7. Componentes inmunodominantes durante el transcurso de la infección-enfermedad

Existen trabajos en los cuales se describen componentes específicos para *T. cruzi* con el empleo de sueros humanos, en el trabajo realizado en 1999 con la cepa QRO se encontraron 5 proteínas inmunodominantes de 74, 44, 31, 25 y 18 kDa sin presentar cruce inmunológico con *Leishmania* (Bucio, 1999); respecto a lo anterior, en esta tesis se encontraron componentes de 74, 44 31 y 25 kDa con ambos antígenos lo cual sugiere que existen glicoproteínas prevalentes compartidas en humanos y en modelo murino, por lo cual el modelo de ratón puede ser considerado representativo de la infección en humanos.

En la fase aguda, se observaron los primeros componentes específicos de la infección usando el antígeno QRO, estos son detectados a partir del día 26 posterior a la infección. Se consideraron como relevantes los componentes de 44 y 48 kDa, debidos a que presentaron una frecuencia mayor de detección, además de estar presentes exclusivamente en el intervalo de tiempo 1 a 40 días. Respecto el antígeno 4C, la detección ocurrió a partir del día 16 de infección con la detección de 4 componentes (48, 79, 88 y 89 kDa) en este mismo intervalo de días. Esta diferencia puede deberse a la naturaleza del antígeno 4C, extraído de diversas cepas

mexicanas y una obtenida de un paciente humano, por lo que presenta mayor variabilidad antigénica.

Es importante destacar que los componentes de 44 y 48 en este trabajo solamente fueron detectados al inicio de la infección, mientras que los componentes de 79, 88 y 89 kDa, son orientadores para determinar las fases de la infección-enfermedad en este modelo murino.

Estos componentes han sido descritos por diversos autores como se muestra en el cuadro 8.

kDa	Función	Fase	Observaciones	Autor
44	Diagnóstico serológico		Imunodominante en el extracto de epimastigotes, sin cruce inmunológico con <i>Leishmania mexicana</i> .	Bucio, 1999
48		Crónica	Pacientes crónicos con miocardiopatía y asintomáticos	Gazinelli, 1990
			Imunodominante en el extracto de epimastigotes	De Lima, 2001
79, 88, 89	Estructural	Aguda	Proteínas implicadas en el reconocimiento e invasión de células huésped del vertebrado.	Burleigh, 1995

Cuadro 8. Principales componentes reportados en humanos.

Posterior a estos días, se determinó el probable inicio de la fase crónica con base en la detección del componente de 50 kDa para QRO y el de 47 kDa para 4C (Cuadro 7); estos componentes han sido descritos por diversos autores; por un lado, Cerban en 1992 identificó al de 50 kDa para IgG1 como específica de tripomastigotes en la cepa EA 4.5, y Ruíz en 1993 determinó una glicoproteína de superficie de aproximadamente 50 kDa, la cual es usada por el parásito para favorecer la invasión de células diana, lo que nos da un indicio del inicio de la fase crónica.

Dentro de la probable fase crónica, el número de componentes específicos aumenta considerablemente, se encuentran 9 componentes para QRO y 7 componentes para el antígeno 4C (Cuadro 7). En los cuadros 9 y 10 se resume información de las proteínas de interés para QRO y 4C respectivamente.

kDa	Función	Fase	Observaciones	Autor
30	Proteína de unión a glutatión	Crónica	Expresadas por amastigotes.	Plumas-Marty, 1992
46	Proteínas de unión a glutatión	Crónica	Expresadas por amastigotes.	Plumas-Marty, 1992
		Crónica	Específicos para la enfermedad de Chagas.	Morgado, en 1989
52	Metaloproteasas		Se expresa en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos.	1991 Bonaldo
	Tio-disulfuro oxidoreductasa		Tc52, crucial para la supervivencia y virulencia del parásito.	Ouaissi, 2002
60	Contribuyente principal a la reactividad cruzada con <i>Leishmania</i>		Excretada por tripomastigotes.	Berrizbeitia, 2006
84	Antígeno de superficie de la superfamilia de las transialidasas	Aguda	Tripomastigotes sanguíneos.	Kahn, 1991
87	Antígeno de superficie de la superfamilia de las transialidasas	Aguda	Tripomastigotes sanguíneos.	Kahn, 1991
90		Aguda, Crónica	Amastigotes y tripomastigotes sanguíneos.	Nogueira, 1981
	Antígeno de superficie, proteína de choque térmico		Tripomastigotes	Beard, 1998
	Inhibir el funcionamiento de la geldamicina		<i>Leishmania donovani</i> y en el caso de <i>T. cruzi</i> .	Grafene, 2002
95			Epimastigotes y tripomastigotes.	Zingales en 1982

Cuadro 9. Principales componentes detectados por el antígeno QRO reportados en humanos.

kDa	Función	Fase	Observaciones	Autor
20	Componente de excreción (transialidasas).	Fase Crónica		Berrizbeitia, 2010; Escalante, 2014
21	Proteína hipotética involucrada en la invasión de células huésped.	Humanos en fase Crónica	Amastigotes extracelulares	da Silva, 2009
30	Proteínas de unión a glutatión.	Crónica	Expresadas por amastigotes	Plumas-Marty, 1992
	Cistein proteasa	Fase crónica		García, 1998
	Proteínas de superficie	Fase crónica	Expresadas por amastigotes	Moody, 2000
77		Presente al día 21 de la infección	modelo murino C57B1 / 6	Rowland 1992
90	Proteína de choque térmico	Fase aguda y crónica	Amastigotes y tripomastigotes sanguíneos	Nogueira, 1981
	Antígeno de superficie, proteína de choque térmico.		Tripomastigotes	Beard, 1998
	Inhibir el funcionamiento de la geldamicina	Fase crónica	Presente también en <i>Leishmania donovani</i>	2002, Grafene

Cuadro 10. Principales componentes detectados por el antígeno 4C.

Al analizar los componentes obtenidos en este trabajo, descritos por diversos autores en humanos, se infiere que el modelo de ratón se ajusta al comportamiento de la infección por *T. cruzi* en humanos.

Además se encontraron componentes específicos, presentes durante el transcurso de la infección, 16 para QRO (25, 26, 29, 32, 34, 36, 38, 39, 40, 42, 43, 65, 67, 70, 75 y 80 kDa) y 12 para 4C (27, 29, 32, 33, 35, 37, 38, 39, 40, 42, 68, y 75 kDa); en el caso del componente de 25 kDa, descrito por Santos-Büch, en 1985 como un componente específico para casos con miocardiopatía Chagásica y para los de 34 y 25 kDa, que en 1998 Riche y en el 2000 Perera son propuestos con fines de diagnóstico en humano y Torres que en 2011 lo reporta como un componente inmunodominante con alta prevalencia en sueros humanos de pacientes crónicos reconocidos en Western blot.

El componente de 29 kDa, ha sido descrito como compartido entre *T. rangeli* y *T. cruzi* con una fuerte homología, debido a que participa en la unión al calcio flagelar, no presente en *Leishmania* (Porcel, 1996).

Respecto al componente de 70 kDa, descrito en 1992 por Yeyati como una proteína de choque térmico, muestra reacción cruzada con *Leishmania braziliensis*, y el de 75 kDa, en 1983, lo describe Scharfstein junto con otros en un intervalo de 39-41 kDa y Nogueira por otro lado, en 1981, el componente de 75 kDa en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos.

El componente de 27 kDa ha sido identificado como la enzima triosafosfato isomerasa, la cual, al ser purificada, el análisis de la porción N-terminal reveló una alta homología con *Leishmania mexicana* y proteínas de *T. brucei* (Bourguignon, 1998).

En resumen, respecto al reconocimiento antigénico, QRO mostró una mayor detección de componentes, respecto al antígeno 4C, esto puede deberse a que el extracto es obtenido de la cepa con la que se inocularon los ratones y por ende presenta más afinidad con estos antígenos, lo cual ha sido señalado en diversos estudios donde se concluye que las cepas regionales incrementan la sensibilidad con fines de estudios epidemiológicos masivos (OPS/OMS, 2005).

Finalmente, la caracterización proteómica de las proteínas aquí mostradas, puede brindar un amplio panorama en el estudio de su función dentro de la evolución clínica de la enfermedad de Chagas.

12. CONCLUSIONES

- Se propone que la fase aguda en modelo murino termina en el día 50, ya que la parasitemia es inversamente proporcional al incremento de títulos de IgG.
- Del día 26 al 40 con el Ag QRO se obtienen los componentes específicos de 44 y 48 kDa. En el periodo de 18 a los 40 días posterior a la infección con el Ag 4C se encontraron los componentes de 48, 88, 79 y 89 kDa se proponen como probables marcadores de **una probable fase aguda**.
- Se proponen como marcadores del **inicio de la fase crónica**, los componentes de 50 y 47 kDa.
- Se proponen como marcadores **de fase crónica**, los componentes de 20, 21, 30, 52, 60, 77, 80, 84, 87, 90, 94, 95 y 127 kDa.
- Se proponen como proteínas de interés diagnóstico 25, 26, 27, 29, 32, 35, 38, 39, 40, 75 y 80 kDa, las cuales se detectan durante todo el transcurso de la enfermedad reconocidas con ambos antígenos.
- Se comprueba que el modelo de ratón muestra una respuesta inmune similar a la descrita en humano ante la enfermedad de Chagas.

13. PERSPECTIVAS

- Dar seguimiento a la infección por un periodo más largo de tiempo para determinar si los componentes propuestos en una posible fase crónica se mantienen.
- Dar un seguimiento al título de anticuerpos y proteínas prevalentes durante un periodo posterior a día 110.
- Realizar la caracterización proteica en 2D de los componentes antigénicos prevalentes que pudiesen ser marcadores específicos en la evolución clínica de la enfermedad como indicadores de eficacia terapéutica o incluso determinar reactividad en la lesión miocárdica.
- Realizar el análisis de estos resultados conjuntamente con las imágenes histopatológicas de las lesiones para determinar con precisión la fase clínica de la enfermedad.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Biagi F, Arce GE. Los primeros casos de miocarditis Chagásica comprobados en México. *Arh Inst Cardiol Mex* 1965;(35):611-623
2. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Aché 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* Feb; 44(2): 291–296.
3. Berrizbeitia, Mariolga, Figuera, María, Hermoso, Tomás, Ward, Brian, Jorquera, Alicia, Narváez, María de los Ángeles, Guilarte, Del Valle, & Ndao, Momar. (2010). Purificación de una fracción de antígenos de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30(2), 134-139.
4. Bonaldo MC, Escoffier LN, Salles JM, Goldenberg S. 1991. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Vol. 73, Issue 1, Pag. 44-51
5. Bourguignon Saulo C. Wanderley de Souza. Localization of lectin-binding sites on the surface of *Trypanosoma cruzi* grown in chemically defined conditions October 1998, Vol 110, Issue 5, pag 527-534, *hiztochemistry and Cell Biology*.
6. Brodskyn CI, Silva AMM, Takehara HA and Mota I. 1989. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol. Cell Biol.* 67, 343-348.
7. Brumpt E, Mazzotti L, Brump LC. 1939. Enquetes Apidemiologiques sur la Maladie de C. Chagas au Mexique. *Reduvides Vecteurs. Animaux reservoirs de virus. Cas humains.* *Ann Parasitol*; 17:299-312
8. Buch A.M. Acosta, H.J. Zweerink M. Sadigursky, O. F. Andersen. B.F. von Kreuter C.I. Brodskyn. C. Sadigursky, R. J. Cody. Primary muscle disease: Definition of a 25-kDa polypeptide myopathic specific Chagas antigen. *Clinical Immunology and Immunopathology*, Vol. 37, Issue 3, 1985, Pag 334-350.
9. 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
10. Burleigh BA, Andrews N. (1995). The mechanisms of *trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Ann rev microbiol*; 49: 175-200.
11. Campetella, O, Sánchez D, Cazzulo J.J, Frasch A.C.C. 1992, A superfamily of *Trypanosoma cruzi* Surface antigens. *Parasitology Today*, vol 8, no. 11, pp 378-381.
12. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion *Microbes and Infection* 11 563e570.

13. Cerban F, Gruppi A and Vottero-Cima E. 1992. *Trypanosoma cruzi*: Involvement of IgG isotypes in the parasitemia control of mice immunized with parasite exoantigens of isoelectric point 4.5. *Experimental parasitology* 75, 137-145.
14. Ceridorio Correa, Esteban Mauricio Cordero, Luciana Giroto Gentil, Ethel Bayer-Santos, and José Franco da Silveira Genetic Structure and Expression of the Surface Glycoprotein GP82, the Main Adhesin of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes, Vol. 2013, Article ID 156734
15. 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. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*; 1: 159-218.
16. Corral Rs, Anders Orn,² Hector L. Freilij,¹ Tomas Bergman,³ And Saul Grinstein, Purification and Characterization of an 80-Kilodalton *Trypanosoma cruzi* Urinary Antigen, *Journal Of Clinical Microbiology*, Jan. 1989, p. 145-151, Vol. 27, No. 1
17. da Silveira F, Umezawa E, Luquetti 2001. A. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol.*; 17: 286-91.
18. da Silva CV, Kawashita SY, Probst CM, Dallagiovanna B, Cruz MC , da Silva EA, Souto-Padro'n T, Krieger MA, Goldenberg S, Briones MRS , Andrews NW , Mortara RA, (2009). Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion, Vol. 11 pag. 563-570
19. De Haro, I 1997. Enfermedad de Chagas en una comunidad del altiplano mexicano. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. UNAM.
20. De la Cruz Pech-Canul Ángel, Monteón Victor. Solís-Oviedo Rosa-Linda, A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi* *journal of Parasitology Research*, Volume 2017 (2017), Article ID 3751403, pages 13.
21. De lima Riveiro AR, Farias Tamoy MN, Tortolero Leal E, Navarro Aguilera MC, Contreras lvarez VT. 2001. Partial purification and use of *Trypanosoma cruzi* glycosidic fractions for Chagas disease diagnosis. *Acta Cient Venez* 52: 235-47.
22. Escalante H, Jara C, Iglesias M, Benites A, Espinoza R, (2014). Western blot technique standardization for specific diagnosis of Chagas disease using excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes *Rev Peru Med Exp Salud Pública*; 31(4):644-51.
23. Galvão C, Carcavallo R, Da Silva D, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic studes notes. *Zootaxa*. 2003 ;(202):1-36.
24. Gazzinelli RT, Leme VM, Cancado JR, Gazzinelli G, Scharfstein J (1990). Identification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T cells and immune sera from patients with Chagas' disease. *Infectar. Immun.* Mayo vol. 58 no. 51437-1444

25. Guerreiro C, Machado A. Da reação de Bordet-Gengou na molestia de Carlos Chagas como lemento de diagnóstico. *Brasil Medico*. 1913; 23: 225.
26. Hoffmann CC. Nota acerca de un probable transmisor de la tripanosomiasis humana en el estado de Veracruz. *Rev. Mex Biol* 1928; 8:12-8.
27. J Scharfstein, M Rodríguez, CA Alves, W de Souza, J O Previato and L, Mendonca-Previato. Trypanosoma cruzi: description of a highly purified Surface antigen defined by human antibodies, *J Immunol* August 1, 1983, 131 (2) 972-976.
28. Kahn S, Colbert TG, Wallace JC, Hoagland NA, Eisen Harvey. 1991. The major 85-kDa surface antigen of the mammalian-stage forms of Trypanosoma cruzi is a family of sialidases. *Proc. Nadl. Acad. Sci. USA* Vol. 88, pp. 4481-4485, May. *Cell Biology*.
29. Krautz GM, Galvão LM, Cançado JR, Guevara-Espinoza A, Ouaiissi A, Krettli AU, Use of a 24-Kilodalton Trypanosoma cruzi recombinant protein to monitor cure of human Chagas ´disease, 1995, *J Clinic Microbiol*; Aug 33(8):2086-90.
30. Lavín, J. (2017). Determinación de la parasitemia y alteraciones histopatológicas en miocardio de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. Tesis para obtener el título de Bióloga Facultad de Ciencias. UNAM.
31. Lidani Kárita CF, Bavia L, Altair RA, Messias-Reason LJ. 2017. The Complement System: A Prey of Trypanosoma cruzi. *Front. Microbiol* 8:607
32. Marin-Neto J, Cunha-Neto E, Maciel B y Simoes M. 2007. Phatogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. American Heart Association, Inc. Brazil. 115: 1109-11123.
33. Mazzotti, L. 1940. Dos casos de a enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca. *Gaceta Médica*. México; 70: 417-420.
34. Mejía AJ, Palaú MT, and Zúñiga CA. (2004). Protein Profiles of Trypanosoma cruzi and *Trypanosoma rangeli*. *Parasitología latinoamericana*, 59(3-4), 142-147.
35. Monteón Victor M. P., Angélica Ramos E. y Pedro A. Reyes L. Reactividad de sueros de pacientes chagásicos crónicos con extractos de aislamientos mexicanos de Trypanosoma cruzi Laboratorio de Inmunología, Instituto Nacional de Cardiología "1: Chávez" Juan Badiano No.I, México D.E C.P. 15600, México. (Rec. 17-Vill-1992. Acep. 14-V11-1993).
36. Moody TN, Ochien J, Villalta F. (2000). Novel mechanism that Trypanosoma cruzi uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3 *Mar* 31; 470(3):305-8.
37. Morgado MG. Ivo-Dos-Santos J. Pinho RT, Argüelles E, Rezende JM and Galvao-Castro B. 1989. Trypanosoma cruzi: identification of specific epimastigote antigens by human immune sera. *Mm. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 84 (3): 308-314
38. 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.

39. Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. Disponible en <https://www.gob.mx/cnts/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-253-ssa1-2012-para-la-disposicion-de-sangre-humana-y-sus-componentes-con-fines-terapeuticos>
40. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf
41. O’Daly JA, Carrasco H, Fernandez V and Rodríguez MB. 1994. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Acta Trop 56: 265-87
42. 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 pag.
43. Organización Mundial de la Salud. 2017. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> el 27 de Septiembre del 2017.
44. Organización Mundial de la Salud 62° Asamblea Mundial de la Salud (OMS/A62/17/2009). Disponible en http://apps.who.int/bq/ebwha/pdf_files/A62/A62_17-sp.pdf
45. Organización Panamericana de la Salud. 2015. Enfermedad de Chagas. Recuperado de: http://www.paho.org/uru/index.php?option=com_content&view=category&id=663&layout=blog&Itemid=232 el 23 de septiembre de 2017
46. OMS/OPS: Informe general de la enfermedad de Chagas. 2016. Recuperado de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856%3A2011-informacion-general-enfermedad-chagas&catid=3591%3AChagas-disease&Itemid=0&lang=es
47. Ouaisi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N, Thieblemont N, Jeannin P.(2002). The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. J Immunol. Jun 15;168(12):6366-74.
48. Perrin, T.G.; Dias, E. and Brenes, M. 1947, Nota previa sobre as primeiras comprovações sorologicas da doença de Chagas no México. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 45(2): 395-400.
49. Plumas-Marty B, Verwaerde C, Loyens M, Velge P, Taibi A, Cesbron MF, Capron A, Ouaisi MA. (1992). *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins: immunogenicity during human and experimental Chagas' disease. Parasitology Feb; 104 Pt 1:87-98.
50. Porcel BM, Bontempi EJ, Henriksson J, Rydake M, Aslund L, Segura EL, Pettersson U, Ruiz AM. (1996). *Trypanosoma rangeli* y *Trypanosoma cruzi*: caracterización

molecular de genes que codifican supuestas proteínas de unión al calcio, altamente conservadas en tripanosomátidos. *Exp Parasitol. Dec*; 84 (3): 387-99.

51. Rowland EC, Mikhall KS, McCormick TS. 1992. Isotype Determination of Anti-*Trypanosoma cruzi* Antibody in Marine Chagas' Disease. *J. Parasitol* 78(3) pag. 557-561
52. Ruef, B and Manning JE. (1993). Isolation and characterization of the TSA/transialidase family gene from the Silvio strain of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62 pag 117-120.
53. Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, Brusca RC, Cavalier-Smith T, Guiry MD and Kirk PM. 2015. A higher-level classification of all living organisms. *PLoS One*, 10(4).
54. Salazar S PM, Castrejón J, Rodríguez H, Tay J L. Miocarditis Chagásica crónica en México. Tercer caso comprobado por exámenes parasitológicos. *Prensa Med Mex* 1979; vol 44: pag 115-120.
55. Salazar Schettino PM, Haro I de, Jiménez J, García E. 1983. Dos nuevas localizaciones de transmisores de Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Sal. Pub. Mex* 25(1): 77-82.
56. Salazar Schettino PM, Tay J, Bucio MI, Haro I de, Anzures ME y Flores-Ayala S. 1984. Primer caso de megaesófago con serología positiva a *Trypanosoma cruzi*. *Salud Pública Mex*; 26: 452-455.
57. Salazar-Schettino PM, Barrera M, Bucio MI. 1989 Transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión sanguínea, Primer caso humano en México, *Rev Mex Patol Clin*; 36: 57-59.
58. Salazar Schettino PM, De Haro A, Bucio Torres MI, Cabrera Bravo M. 2005. Tres especies de triatóminos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México *Med B. Aires.*; (65):63-69.
59. Salazar Schettino PM, Rojas Wastavino GE, Cabrera Bravo M, Bucio Torres MI, Martínez-Ibarra A, Monroy-Escobar MC, Rodas-Retana A, Guevara-Gomes Y, Vences-Blanco MO, Ruiz-Hernández AL y 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): 57-80.
60. Salazar Schettino PM, Cabrera Bravo M, Bucio Torres MI y Haro Arteaga I. (2011). Diagnóstico morfológico de las parasitosis. 3a. ed. México: Méndez Editores, SA de CV. ISBN 978-607-7659-16-7. Tiraje: 1 000 ejemplares. 328
61. Snary David, Receptors and recognition mechanisms of *Trypanosoma cruzi*, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 79, Issue 5, 1985, pag. 587-590
62. Sánchez B, Monteón V, Reyes PA and Espinoza B. 2011. 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.
63. Scott MT, Goss-Sampson M. 1984. Restricted IgG isotype profiles in T. cruzi infected mice and Chagas' disease patients. Clin. Exp. Immunol. 58, 372-379
 64. Secretaría de Salud. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem01.pdf>, <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE01.pdf> <http://pda.salud.gob.mx/cubos/cmortalidadxp.htm>
 65. Silva Pinto PL, Takami R, Nunes EV, Guilherme CS, Cruz Oliveira O Jr, Gama-Rodrigues J and Okumura M. 1999. Life cycle of Trypanosoma cruzi (Y strain) in mice. Rev. Hosp. Clín. Fac. Med, S.Paulo 54(5): 141-146, 1999.
 66. Snary D, Hudson L. 1979. Trypanosoma cruzi cell Surface proteins: identification of one major glycoprotein. FEBS Lett 100: 166-70.
 67. Tay, J.; Goyocolea, O. and Biagi F. 1961. Observaciones sobre enfermedad de Chagas en la Mixteca Baja. Nuevo caso humano de la República Mexicana. Bol. Ofna. Sanit. Panamer. 51(4): 322-327.
 68. Tay J, Salazar-Schettino PM, Ontiveros A, Jiménez J, Haro I de, García Yáñez Y, Gutiérrez QM. Epidemiologic study of Chagas' disease in a town in Oaxaca. Mexico. PAHO Bulletin 1986; 20(4): 358-65.
 69. Torres-Gutiérrez, Dalia Barrios-Palacios, Adela Luisa Ruiz-Hernández, Margarita Cabrera-Bravo, Yolanda Guevara-Gómez, Gloria Rojas-Wastavino, Paz María Salazar-Schettino y Martha Irene Bucio-Torres* Identificación de componentes inmunodominantes de un aislado de Trypanosoma cruzi por inmunoblot y su estandarización con fines diagnósticos Gac Med Mex. 2015;151:6-13
 70. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications .Proc Natl Acad Sci.
 71. Verissimo da Costa GC ,Lery LM, da Silva ML, Moura H, Peralta RH, von Krüger WM, Bisch PM, Barr JR, Peralta JM. (2013). The identification and characterization of epitopes in the 30-34 kDa *Trypanosoma cruzi* proteins recognized by antibodies in the serum samples of chagasic patients. J Proteomics. Mar 27; 80:34-42.
 72. World Health Organization. The Control of Chagas Disease. WHO Technical Report Series No. 811, Geneva, Switzerland, 1991. Recuperado de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37686/1/WHO_TRS_811.pdf el 25 de Septiembre de 2017
 73. World Health Organization. 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. Recuperado de http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/

74. Yeyati L, Bonnefoy S, Mirkin G, Debrabant A, Lafon S, Panebra A, Gonzalez-Cappa E, Dedet JP, Hontebeyrie-Joskowicz M and Levin MJ. (1991). The 70 kDa heat-shock protein is a major antigenic determinant in human *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania braziliensis* mixed infection. *Immunology Letters*, 31, 27-31.
75. Zingales B, Andrews NW, Kuwajima VY, Colli W. (1982) Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: Possible correlation with the interiorization process in mammalian cells *Molecular and Biochemical Parasitology*, Vol 6, Issue 2, Pag 111-124.