

**ESTUDIO COMPARATIVO DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE CEPAS DE
TRYPANOSOMA CRUZI DE LA REGIÓN NORORIENTAL DE COLOMBIA**

YENI BUENO DUARTE

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2007**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE CEPAS DE
TRYPANOSOMA CRUZI DE LA REGIÓN NORORIENTAL DE COLOMBIA**

YENI BUENO DUARTE

Plan de proyecto de grado

Director

Rodrigo Torres

Laboratorio de Bioquímica e Ingeniería de proteínas

Codirector

Clara Isabel González

Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2007

DEDICATORIA:

Dedico este trabajo a Dios porque él dio la sabiduría, el conocimiento y la protección.

A mis padres y hermanas por su gran amor y apoyo incondicional
A los Doctores Rodrigo Torres y Clara Isabel González por su gran abnegación
por el trabajo científico.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su inmenso amor y bondad para conmigo

A mis padres y hermanas por su gran apoyo e inmensurable amor

Al Doctor Rodrigo Torres, por confiar en mí y hacer realidad el deseo de hacer
Proteómica.

A la Doctora Clara Isabel González por acogernos en su Laboratorio y por el
conocimiento impartido

A Germán Zafra por su paciencia e incondicional apoyo en el trabajo de
Laboratorio y junto a Marta Díaz por realizar el cultivo de *Trypanosoma cruzi*

A la Doctora Carmen Cecilia Cabrales por sus enseñanzas y colaboración en la
realización de este trabajo

A Tulia Mateus por sus consejos y palabras de ánimo

A la familia Barón Niño por su amistad, apoyo y colaboración

A Oveimar por su amistad y colaboración

A todos mis amigos que durante la carrera me han brindado su apoyo, respeto y
cariño, Carolina, Lina, Olivo, Gregorio, Angelita, Suguey, Nelson, Josué, Silvia,
Jenny, Adriana, Eddy.

CONTENIDO

	pág.
<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. <u>HIPÓTESIS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	2
2. <u>JUSTIFICACIÓN</u>	4
2.1 <u>VIABILIDAD</u>	4
2.2 <u>FINALIDAD</u>	5
3. <u>OBJETIVOS</u>	6
3.1 <u>OBJETIVO GENERAL</u>	6
3.2 <u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	6
4. <u>MARCO DE REFERENCIA</u>	7
4.1 <u>MARCO TEÓRICO</u>	7
4.1.1 <u>Estructuras celulares del parásito</u>	8
4.1.2 <u>Ciclo de vida</u>	9
4.1.3 <u>El proceso de invasión</u>	11
4.1.4 <u>Epidemiología</u>	14
4.1.5 <u>Vías de transmisión de la enfermedad</u>	14
4.1.6 <u>Patología clínica</u>	15
4.1.7 <u>Diagnóstico clínico y epidemiológico:</u>	16
4.1.8 <u>Diagnóstico de laboratorio:</u>	16
4.1.8.1 <u>Generales:</u>	16
4.1.8.2 <u>Métodos parasitológicos:</u>	16
4.1.8.2.1 <u>Métodos directos:</u>	16
4.1.8.2.2 <u>Métodos de concentración:</u>	17
4.1.8.2.3 <u>Metodos parasitológicos indirectos:</u>	18
4.1.8.3. <u>Métodos serológicos:</u>	19
4.1.9 <u>Problemática del diagnóstico serológico</u>	22

4.2.10 <u>Técnicas empleadas en el estudio:</u>	22
4.2 <u>ESTADO DEL ARTE</u>	34
5. <u>METODOLOGÍA</u>	43
5.1 <u>CULTIVO DE LOS TRIPANOSOMATIDOS</u>	43
5.2 <u>EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS</u>	43
5.3 <u>DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS UTILIZANDO EL MÉTODO DE BRADFORD</u>	43
5.4 <u>DETERMINACIÓN DEL PATRÓN PROTEICO UTILIZANDO ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA</u>	44
5.5 <u>COMPARACIÓN DE LOS PÉRFILES PROTEÍCOS DE LOS DOS PARÁSITOS Tc. I Y Tc. II.</u>	49
5.6 <u>DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS:</u>	49
5.7 <u>COMPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE LOS DOS PARÁSITOS <i>T. cruzi</i> I y <i>T. cruzi</i> II:</u>	55
6. <u>RESULTADOS</u>	56
6.1 <u>EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS</u>	56
6.2 <u>DETERMINACIÓN DEL PÉRFIL PROTEÍCO DE CADA PARÁSITO</u>	56
6.3 <u>DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS</u>	58
6.3.1 <u>Inmunotransferencia utilizando antígenos de los 4 parásitos estudiados:</u>	59
6.3.2 <u>Inmunotransferencia con los antígenos de interés <i>T. cruzi</i> cepa Y y cepa 338</u>	60
7. <u>DISCUSIÓN</u>	97
8. <u>CONCLUSIONES</u>	107
9. <u>RECOMENDACIONES</u>	110
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	112
<u>ANEXOS</u>	124

LISTA DE TABLAS

		pág.
Tabla 1.	Absorbancia de los patrones de albúmina	43
Tabla 2.	Componentes y volúmenes para el gel de separación	44
Tabla 3.	Componentes y volúmenes para el gel de concentración	45
Tabla 4.	Composición y concentración del buffer de separación	46
Tabla 5.	Composición y concentración del buffer de carga para muestras	46
Tabla 6.	Composición y concentración de la solución colorante	47
Tabla 7.	Composición y concentración de la solución decolorante	48
Tabla 8.	Composición buffer de transferencia	49
Tabla 9.	Composición del Buffer salino TBS	50
Tabla 10.	Composición de la solución de bloqueo	51
Tabla 11.	Composición de la solución de lavados	51
Tabla 12.	Composición de la solución de dilución	52
Tabla 13.	Composición del buffer para el sustrato de la fosfata alcalina	53
Tabla 14.	Cantidades de NBT y BCIP utilizadas para el buffer PA	53
Tabla 15.	Masas moleculares (kDa) de las proteínas obtenidas para <i>Crithidia, T. rangeli, T. cruzi I</i> de referencia (339), <i>T. cruzi I, T. cruzi II</i> (Y) y <i>T. cruzi I</i> (338).	57
Tabla 16.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomático (S) y asintomático (A) en presencia de diferentes tripanosomátidos.	59
Tabla 17.	Códigos y densidades ópticas obtenidas con la prueba de ELISA de pacientes chagásicos sintomáticos en fase II.	60
Tabla 18.	Proteínas reconocidas por los pacientes sintomáticos fase II (1, 2, 28-34) con la cepa Y.	61
Tabla 19.	Proteínas reconocidas por los pacientes sintomáticos fase II (35, 109, 110, 111, 114, 139, 146 y 147) con la cepa Y.	61
Tabla 20.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase II (1, 2, 28-34) con la cepa 338.	62
Tabla 21.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase II (35, 109, 110, 111, 114, 139, 146, 147) con la cepa 338.	63

Tabla 22.	Pacientes sintomáticos fase III, códigos y densidad óptica.	63
Tabla 23.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase III (5-7, 21-26) con la cepa Y.	64
Tabla 24.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase III (27, 105, 112, 126, 127, 140-142) con la cepa Y.	65
Tabla 25.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase III (5-7, 21-26) con la cepa 338.	67
Tabla 26.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase III (27, 105, 112, 126, 127, 140-142) con la cepa 338.	67
Tabla 27.	Pacientes sintomáticos fase IV, códigos y densidad óptica.	68
Tabla 28.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase IV (3, 4, 8, 36-40) con la cepa Y.	69
Tabla 29.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase IV (103, 104, 113, 117, 122, 124) con la cepa Y.	70
Tabla 30.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase IV (3, 4, 8, 36-40) con la cepa 338.	71
Tabla 31.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase IV (103, 104, 113, 117, 122, 124) con la cepa 338.	72
Tabla 32.	Pacientes asintomáticos, códigos y densidad óptica.	72
Tabla 33.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (9-15, 43-45) con la cepa Y.	74
Tabla 34.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (46-55) con la cepa Y.	74
Tabla 35.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (56-65) con la cepa Y.	75
Tabla 36.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (91-100) con la cepa Y.	76
Tabla 37.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (101, 102, 115, 116, 118, 119, 125, 148 - 150) con la cepa Y.	77
Tabla 38.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (9-15, 43-45) con la cepa 338.	78
Tabla 39.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (46-55) con la cepa 338.	79
Tabla 40.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (56-65) con la cepa 338.	80
Tabla 41.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (91-100) con la cepa 338.	80

Tabla 42.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (101, 102, 115, 116, 118, 119, 125, 148-150) con la cepa 338.	81
Tabla 43.	Pacientes seronegativos, códigos y densidad óptica.	82
Tabla 44.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (16-20, 66-70) con la cepa Y.	83
Tabla 45.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (71-80) con la cepa Y.	84
Tabla 46.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (81-90) con la cepa Y.	85
Tabla 47.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (106-108, 120, 121, 123, 128-131) con la cepa Y.	85
Tabla 48.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (132-138, 143-145) con la cepa Y.	86
Tabla 49.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (16-20, 66-70) con la cepa 338	88
Tabla 50.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (71-80) con la cepa 338	88
Tabla 51.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (81-90) con la cepa 338.	89
Tabla 52.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (106-108, 120, 121, 123, 128-131) con la cepa 338.	90
Tabla 53.	Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (132-138, 143-145) con la cepa 338	91
Tabla 54.	Frecuencia de reconocimiento de los tres grupos de pacientes con los dos antígenos (cepa Y y cepa 338).	92
Tabla 55.	Frecuencia de bandas reconocidas por los grupos de pacientes sintomáticos, asintomáticos y seronegativos analizados por inmunotransferencia.	94

RESUMEN

TITULO: ESTUDIO COMPARATIVO DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* DE LA REGIÓN NORORIENTAL DE COLOMBIA*

AUTOR: BUENO DUARTE, Jenny

PALABRAS CLAVES: Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma Cruzi*, proteínas, diagnostico**

DESCRIPCIÓN:

La enfermedad de Chagas es una enfermedad que afecta a millones de personas en Latinoamérica. El *Trypanosoma Cruzi*, causante de esta enfermedad, se clasifica en dos grupos T. cruzi I y T. cruzi II se asocia a daños cardíacos y digestivos en países del cono sur, mientras que en el norte de Suramérica el grupo I es predominante y la patología es de tipo cardíaco. La composición proteica podría ser la respuesta a las diferencias en la patología de los dos tipos de T. cruzi.

Este estudio comparativo de proteínas antigénicas, comprendió: una aproximación al perfil proteico mediante electroforesis SDS – PAGE de los extractos proteicos de los parásitos, la cepa 338 (T. cruzi I) y la cepa Y (T. cruzi II), en el cual encontramos 29 bandas proteicas para el T. cruzi I entre 100 y 13 KDa y 30 proteínas para el T. cruzi entre 174 a 13 KDa.

La inmunotransferencia de 150 pacientes, 50 asintomáticos, 50 sintomáticos y 50 seronegativos, con los extractos proteicos de los dos parásitos. En general encontramos 84 componentes antigénicos en el rango de 256 a 7 KDa, 63 reconocidas con la cepa 38 y 65 con la cepa Y.

Al establecer las diferencias en las proteínas antigénicas encontramos mayor reconocimiento por los pacientes asintomáticos y en presencia de la cepa Y. se destaca la proteína de 36 KDa reconocida por los pacientes sintomáticos solo con la cepa 338, esta podría estar implicada en el tráfico intracelular de membranas. Dentro del estudio aparecen proteínas reportadas en la literatura relacionadas con la invasión, desarrollo de parásito y diagnóstico de la enfermedad.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. TORRES SAÉZ Rodrigo. GONZÁLEZ Clara Isabel

ABSTRACT

TITLE: STUDY COMPARATIVE OF ANTIGENICS PROTEIN OF STRAINS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* OF THE NORTHEASTERN REGION DE COLOMBIA*

AUTHOR: BUENO DUARTE, Jenny

KEY WORDS: Disease of Chagas, *Trypanosoma Cruzi*, proteins, diagnose**

DESCRIPTION:

The disease of Chagas is a disease that affects to millions of people in Latin America. *Trypanosoma Cruzi*, causing of this disease, you classifies in two groups T. cruzi I and T. cruzi II you associates to heart and digestive damages in countries of the south cone, while in the north of Suramerica the group I is predominant and the pathology is of heart type. The proteic composition could be the answer to the differences in the pathology of the two types of T. cruzi.

This comparative study of antigenics protein, understood: an approach to the proteic profile mediating electrophoresis SDS – PAGE of the proteics extracts of the parasites, the strain 338 (T. cruzi I) and the strain Y (T cruzi II), in which we find 29 proteics bands for T. cruzi I between 100 and 13 KDa and 30 proteins for T. cruzi among 174 to 13 KDa.

The immunotransfer of 150 patients, 50 asymptomatic, 50 symptomatic and 50 seronegativs, with the proteics extracts of the two parasites. In general we find 84 antigenics component in the range from 256 to 7 KDa, 63 acknowledge with the strain 38 and 65 with the strain Y.

When establishing the differences in the antigenics proteins we find bigger recognition for the asymptomatic patients and in presence of the strain Y. Its stands out the protein of 36 KDa recognized by the symptomatic patients alone with the strain 338, this it could be implied in the intracelular traffic of membranes. Inside of the study proteins reported in the literature related with the invasion appear, parasite development and diagnose of the disease.

* Graduation Project

** Science Faculty. Chemistry School. TORRES SAÉZ Rodrigo. GONZÁLEZ Clara Isabel

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del Chagas, producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*, representa un problema de salud pública en el centro y sur de América. Cerca de 20 millones de personas están en la fase crónica de la enfermedad y aproximadamente 100 millones están en riesgo de infección. Hasta ahora no se ha desarrollado una vacuna contra esta enfermedad, los mecanismos utilizados para su diagnóstico no son confiables y pueden presentar falsos positivos y reacciones cruzadas con otros *triptanosomátidos*, además el tratamiento de la enfermedad en su fase crónica no es adecuado y presenta múltiples efectos perjudiciales. Por otro lado, el parásito que produce la enfermedad, el *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), presenta dos subtipos: I y II los cuales presentan diferencias en la patología. En Colombia la mayoría de casos reportados corresponden al tipo I, al cual no se le han realizado estudios de proteínas específicas que puedan estar relacionadas con las diferencias en la patología, virulencia, desarrollo de la enfermedad y que permitan el diseño de pruebas de diagnóstico más específicas y confiables.

El estudio comparativo de proteínas antigénicas de cepas de *trypanosoma cruzi* de la región nororiental de Colombia, comprende la determinación del perfil proteico de cada cepa, cepa 338 (*T. cruzi I*) y cepa Y(*T. cruzi II*), el perfil antigénico de 150 pacientes recolectados en zonas endémicas del departamento de Santander; encontrar las diferencias en las proteínas reconocidas por los pacientes estudiados con la cepa 338 y aquellas reconocidas con la cepa Y, y establecer la relación entre las proteínas inmunodominantes de cada cepa y aquellas cuyo papel en la enfermedad haya sido reportado en la literatura, que puedan ser útiles en el estudio de la enfermedad del Chagas en nuestra región.

1. HIPÓTESIS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Enfermedad del Chagas (EC) es una patología que presenta dos fases en su desarrollo clínico, una fase aguda y una crónica. La fase aguda se desarrolla a pocas semanas de la infección siendo usualmente asintomática y la fase crónica se caracteriza por daño a nivel cardíaco o en el tracto digestivo. El compromiso gastrointestinal o cardíaco muestra una distribución geográfica preferencial, generalmente con predominio de una de ellas (Macedo, 1998). En Colombia la falla cardiaca debida a la cardiomiopatía chagásica (CC) es la manifestación clínica más severa y frecuente de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, la incidencia de CC entre la población infectada por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es desconocida y los mecanismos que llevan de la infección al desarrollo de la misma son inciertos (Hagar 1995, Rossi 1995).

El parásito responsable de la Enfermedad del Chagas el *T. cruzi* pertenece al orden Kinetoplastida, es diploide y su modo de replicación es predominantemente clonal (Tibayrenc 1986). *T. cruzi* constituye una población heterogénea que circulan entre reservorios. Estas poblaciones muestran comportamientos diferentes en términos de parasitemia, virulencia y sensibilidad a los fármacos. Por lo tanto, aunque se ha descrito como un taxón (Dvorak 1984, Guhl 1999), análisis bioquímicos de isoenzimas clasificaron las poblaciones del parásito en tres grupos denominados zimodemas (Z1-Z3) (Miles 1978, Ready 1980) y estudios moleculares los clasificaron en dos grupos principales 1 y 2, (Souto 1993, Souto 1996) y en la actualidad por consenso internacional se adoptó la denominación de *T. cruzi I* y *II* para su clasificación (Momen 1999). Respecto a la distribución general se ha descrito a *T. cruzi I* circulando en América central y Suramérica hasta Bolivia y Brasil y el grupo II se solapa en Brasil y Bolivia y se presenta en Chile y Paraguay (Jaramillo 1999). En Colombia, por análisis de aislados

provenientes de distintas zonas endémicas del país se ha descrito el *T. cruzi I* como el grupo predominante (Ruiz-García 2000, Montilla 2002, Cuervo 2002, Rodríguez 2002). En estudios realizados en el departamento de Santander, a partir de aislados de vectores del parásito y en humanos infectados, se encontró que todos pertenecen al grupo *T. cruzi I* (Devia 1999, Jaramillo 2004).

La importancia de las proteínas en los mecanismos de defensa, en el desarrollo de las funciones vitales y en el soporte estructural de los organismos, podría ser la respuesta a las diferencias en la presentación de la enfermedad de los dos tipos de *T. cruzi*. Aunque se han realizado numerosos análisis inmunológicos, bioquímicos y funcionales de proteínas relevantes en la interacción hospedero-parásito y en la patogénesis de la enfermedad, la mayoría de ellos involucran cepas pertenecientes al grupo *T. cruzi II*. Por lo tanto, este proyecto plantea el estudio comparativo preliminar de las proteínas de *T. cruzi I* con respecto a aquellas que componen el *T. cruzi II* de referencia, como una aproximación inicial en la búsqueda de diferencias en los perfiles electroforéticos de las proteínas de los dos parásitos que podrían estar implicadas en las diferencias en tropismo, virulencia, patogenicidad y otras características del parásito. Del mismo modo, al no encontrar diferencias en los perfiles proteicos, el estudio comparativo utilizando como controles otros *trypanosomátidos*, es útil al momento de encontrar proteínas propias de los dos tipos de *trypanosoma cruzi* que podrían ser utilizadas para el diseño de métodos diagnósticos más sensibles y específicos al involucrar las cepas autóctonas.

2. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas (EC) afecta aproximadamente a 20 millones de personas en América del Sur, con una población en riesgo, cercana a 100 millones (TDR/WHO). En Colombia hay aproximadamente 1300.000 habitantes infectados con *Trypanosoma cruzi*, y 3.000.000 más en riesgo de infección (Guhl 1999). En el departamento de Santander 46 municipios están en riesgo de infección, lo que representa 47.638 viviendas, de las cuales, tan sólo el 10.2% ha sido fumigada contra el insecto trasmisor del parásito. Estudios electrocardiográficos realizados en municipios endémicos del departamento, muestran que la morbilidad de esta enfermedad en fase crónica es alta, mostrando un porcentaje del 44.7% (<<http://www.ops-oms.org> 2001). Estudios biológicos y epidemiológicos realizados en Brasil determinaron que el *T. cruzi I*, está presente en el ciclo selvático afectando a animales como marsupiales y edentales (Zingales 1998) y raramente afectaba a los humanos (Briones 1998). Esto confirma la necesidad de realizar estudios comparativos de proteínas de *T. cruzi I* con respecto a las proteínas de *T. cruzi II*, que nos permitan encontrar proteínas propias de *T. cruzi I* involucradas en la patogénesis de la enfermedad y en la severidad de la misma. Adicionalmente, estas proteínas podrían ser las responsables de las diferencias en la distribución geográfica de la patología, el tropismo diferencial del parásito y del mismo modo constituir potenciales herramientas de diagnóstico de la enfermedad.

2.1 VIABILIDAD:

Para llevar a cabo la caracterización de las proteínas del parásito de acuerdo al peso molecular y la determinación de la capacidad antigénica de éstas, contamos con un equipo de electroforesis SDS- PAGE y un equipo de inmunotransferencia y

un equipo ELISA para realizar pruebas serológicas. Esta investigación constituye el estudio preliminar del proyecto aprobado por Colciencias titulado: “Análisis comparativo de expresión génica entre parásitos del grupo *Trypanosoma cruzi I* aislado en la región nororiental de Colombia y Chile y parásitos del grupo *Trypanosoma cruzi II*”, el cual se llevará a cabo por tres años.

2.2 FINALIDAD:

La determinación de proteínas antigénicas propias del *Trypanosoma cruzi I*, se convierten en una herramienta muy útil al momento de determinar las diferencias en la patología, la distribución geográfica, la severidad de la enfermedad, y para sintetizar de forma racional nuevos medicamentos, pruebas de diagnóstico o desarrollar una vacuna contra esta enfermedad.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio comparativo relacionado con el perfil proteico y la antigenicidad de una cepa de *T. cruzi I* proveniente de un aislado autóctono de la región nororiental colombiana, con una cepa *T. cruzi II* de referencia. Estos parásitos presentan características genotípicas particulares que podrían estar determinando las diferencias en la distribución geográfica, la forma de presentación y la severidad de la enfermedad de Chagas y adicionalmente podrían ser utilizadas para estudios posteriores relacionados con su funcionalidad, papel en la infección, patogenicidad del parásito y utilidad diagnóstica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar una aproximación preliminar del perfil proteico, mediante electroforesis SDS-PAGE de una cepa de *T. cruzi I* autóctonas de la región nororiental y de una cepa *T. cruzi II* de referencia.

Determinar la capacidad antigénica de las proteínas de *T. cruzi I* y *T. cruzi II*.

Establecer las diferencias en el perfil proteico y antigenicidad de las cepas *T. cruzi I* y *T. cruzi II*.

4. MARCO DE REFERENCIA

4.2 MARCO TEÓRICO

“La tripanosomiasis americana es una enfermedad parasitaria que afecta a 20 millones de personas y representa un problema de salud pública en América Latina. El parásito que la produce, el *Trypanosoma cruzi*, es un protozoo flagelado microscópico, el cual se transmite a los hospedadores vertebrados por medio del contacto de la piel y las mucosas con heces u orina del vector, insectos hemípteros hematófagos de la subfamilia Triatomino (*Rhodnius*, *Triatoma* y *Pastrogylus*) infectados con *T. cruzi*.

La clasificación sistemática de estos parásitos es la siguiente:

- Reino: Protozoo
- Phylum: Euglenozoa
- Clase: Kinetoplastida
- Orden: Trypanosomatida
- Género: trypanosoma

Entre los kinetoplástidos, se reconocen varios géneros que incluyen trypanosomas de vida libre (*Proleptomas*), parásitos de invertebrados solamente (*Crithidia* y *Leptomonas*), parásitos de plantas e invertebrados (*Phytomonas*), y parásitos de vertebrados e invertebrados (como *Trypanosoma* y *Leishmania*). Dentro de la familia Trypanosomatida, el género *Trypanosoma* es uno de los más importantes por incluir la serie de especies que ocasionan enfermedades en humanos, como *T. cruzi*, agentes causal de la enfermedad de Chagas y *T. gambiensi* y *T.*

rhodesiense, agentes causales de la enfermedad del sueño, y en animales, como es el caso de *T. brucei*, *T. equiperdum* y *T. equinum*.

Los Kinetoplastidos son organismos flagelados con 1 o 2 flagelos que se originan de una abertura conocida como bolsa flagelar, normalmente contienen una estructura prominente y paraflagelar conocida como kinetoplasto que corresponde a una condensación de ADN localizado en el interior de una única mitocondria que esta ramificada por todo el cuerpo del parásito, la cual contiene maxicírculos y minicírculos de ADN, los primeros tienen una longitud perimetral de 30.000–50.000 pb y los segundos de 100 a 2500 pb. Otras estructuras características de estos organismos son organelos especializados, tipo peroxisomas, conocidos como glicosomas y la presencia de microtubulos subpeliculares.

En función del comportamiento del parásito, principalmente en el vector, el género *Trypanosoma* se ha dividido en dos grupos. El primero, llamado Stercoraria, incluye los *Trypanosomas* que se desarrollan en el tubo digestivo del vector, progresando en el sentido de la porción intestinal con liberación de las formas infectivas con las heces. En este grupo tenemos a *T. cruzi* y *T. lewisi*. El segundo grupo, llamado Salivaria, incluye trypanosomas que se desarrollan inicialmente en el tubo digestivo y posteriormente atraviesan el epitelio digestivo y llegan a las glándulas salivales, donde las formas infectivas son inoculadas mecánicamente. En este grupo se encuentran: *T. brucei*, *T. congolense* y *T. rangeli*.

4.2.1 Estructuras celulares del parásito

El *Trypanosoma cruzi* presenta diferentes morfologías en cuanto a la forma general de la célula, la posición del flagelo y de acuerdo al ambiente en el cual se encuentre. El **amastigote** es esférico u ovalado, de 2-4 μm de diámetro, y constituye la forma de división intracelular en los tejidos del huésped mamífero,

formando los llamados pseudoquistes. Los **epimastigotes**, son alargados de aproximadamente 20 μm de longitud, tienen un flagelo libre, siendo la forma de división encontrada en el tracto digestivo del vector también como en los cultivos en medios artificiales. Los **tripomastigotes**, se encuentran en la sangre del vertebrado y son la forma infectante presente en el vector, su longitud es de 20 μm , tiene un flagelo y una membrana ondulante a lo largo de su cuerpo. La forma tripomastigote no se divide.

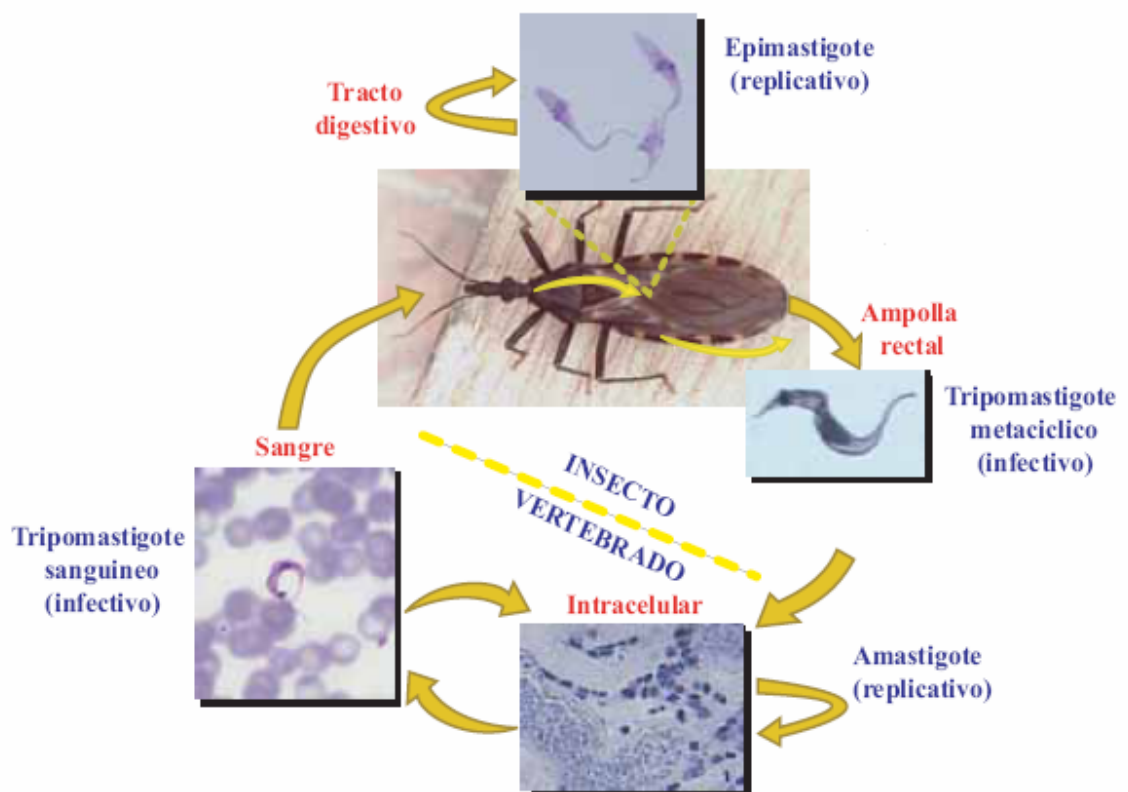


Fig. 1 Fases del *Trypanosoma cruzi*.

4.2.2 Ciclo de vida

El *T. cruzi* presenta dos ciclos de vida de acuerdo al hospedador que posea. El ciclo biológico de *T. cruzi* con el hospedador invertebrado se inicia cuando el insecto ingiere sangre de animales infectados. Al llegar al estómago, las formas

tripomastigotes se transforman a esferomastigotes y posteriormente en epimastigotes. En el intestino posterior, los epimastigotes se unen a la membrana que cubre la superficie de las células intestinales, llamada membrana perimicrobiliar y se multiplican. Una vez en el recto, los epimastigotes se transforman, en tripomastigotes metacíclicos, los cuales son liberados con las heces y la orina y son capaces de infectar células de mamífero.

Una fase interesante de la interacción de *T. cruzi* con el hospedador invertebrado es la adhesión de las formas epimastigotes a la superficie del epitelio del intestino medio y posterior, así como a la capa cuticular del epitelio de la glándula rectal y del saco rectal, lo que puede observarse 8 días después de la infección. Estudios “*in vitro*” usando fragmentos de tubo digestivo, muestran que solo las formas epimastigotes son capaces de adherirse y que la adhesión ocurre predominantemente por el flagelo, lo cual sugiere que la glicoproteína Gp72 podría estar concentrada en el flagelo, puesto que se ha establecido que esta proteína interacciona con las células del intestino del insecto, facilitando la adhesión del parásito a la superficie. Por otro lado se ha observado que la adición de soluciones diluidas de GIPLs (Glicoinositolfosfolípidos) al insecto inhibe la adhesión de epimastigotes al intestino del vector (Pereira 1990).

El segundo ciclo del *T. cruzi*, se lleva a cabo en el hospedero vertebrado, éste comienza cuando las formas tripomastigotes son inoculadas en la piel o mucosas del vertebrado. Los tripomastigotes pueden penetrar en cualquier tipo celular que encuentre en el sitio de la inoculación, menos en eosinófilos y neutrófilos. Después de penetrar en la célula hospedera, los tripomastigotes pueden encontrarse en el interior de una vacuola, llamada vacuola parasitófora. Después de algún tiempo se transforman en amastigotes, los cuales se encuentran ahora libres en el citoplasma de la célula hospedera. Transcurridas 35 horas después de la infección, se inicia el proceso de división celular binaria, que prosigue por varios días dependiendo de la cepa de *T. cruzi* y de la célula hospedera. El tiempo de

generación es de aproximadamente 14 horas; después de 5 días aproximadamente, cuando la célula hospedera contiene alrededor de 500 amastigotes, se inicia un proceso casi sincronizado de transformación a la forma tripomastigotes, pasando por un estado intermedio. Cuando las formas tripomastigotes tienen un flagelo más largo, comienzan un movimiento intenso que parece ser el responsable de la ruptura de la célula hospedera, con la liberación subsiguiente de cientos de tripomastigotes al espacio intercelular.

estudios disponibles sugieren que en la primera fase del proceso de interacción de *T. cruzi* con la superficie de la célula hospedera, se produce un proceso de reconocimiento celular, en el que están involucradas *glicoproteínas* y proteínas tipo *lectina*, las cuales están presentes tanto en la superficie del parásito como en la célula hospedera. La participación del ácido siálico en el proceso de adhesión de las formas tripomastigotes a las células hospederas es evidente. Sin embargo, la presencia del ácido siálico, dificulta la adhesión de estas formas a los macrófagos. Otras proteínas importantes en el proceso de adhesión son las proteínas con actividad *transialidasa* y *neuraminidasa* presentes en las formas tripomastigote.

4.2.3 El proceso de invasión:

En cuanto al proceso de invasión, los estudios disponibles sugieren que luego de la adhesión ocurren modificaciones importantes a nivel de la membrana del parásito y de la célula hospedera. Todo sugiere que las proteasas del parásito, entre ellas la *cruzipaina*, están involucradas en el proceso. Del mismo modo sugieren que la entrada del parásito dentro de la célula puede considerarse como un proceso de endocitosis con algunas características especiales. En el caso de la interacción de las formas tripomastigotes con macrófagos, el proceso es fagocítico.

Independientemente del proceso usado para la invasión, a medida que el parásito va penetrando en la célula hospedera, va siendo envuelto por una membrana formada inicialmente a partir de la membrana plasmática de la célula hospedera, que rápidamente recibirá componentes de membranas de organelos del sistema endolisosomal, formando la vacuola parasitófora.

Una vez dentro de la vacuola ocurren tres procesos:

1) las organelas del sistema lisosomal de la célula hospedera se aproximan a la vacuola y se funden con ella incorporando sus membranas a la membrana de la vacuola parasitófora y descargando su contenido al interior de la vacuola que se torna ácida. En esta fase la vacuola corresponde a un gran fagolisosoma. En el caso de epimastigotes la activación de la NAD(P)H oxidasa que lleva a la formación de radicales oxígeno y agua oxigenada que conducen a la lisis del parásito. Esa enzima se mantiene en la membrana de la vacuola, de tal forma que los derivados de oxígeno continúan siendo producidos y vertidos en el espacio intravacuolar, llevando a la destrucción y posterior digestión del parásito.

2) El segundo proceso, consiste en el cambio gradual de las formas tripomastigote hacia la forma amastigote, la cual se inicia con el cambio hacia una forma redondeada, que hace que el flagelo quede todo asociado al cuerpo, seguido por el acortamiento del flagelo y cambios en la estructura del cinetoplasto, que adquiere forma de bastón.

3) El tercer proceso se inicia a las dos horas después del contacto inicial, consiste en la fragmentación de la membrana de la vacuola, posiblemente por la acción de enzimas liberadas por el parásito. Este proceso requiere de la presencia de un compartimiento ácido que parece favorecer la secreción, por parte del parásito de una molécula sensible a tripsina conocida como Tc-Tox, que tiene la capacidad en ambientes acídicos de incorporarse a la membrana de la vacuola, llevándola de

esta manera a su lisis. Algunas evidencias también sugieren que el ácido siálico puede interferir en este proceso de rompimiento.

Con la fragmentación de la membrana de la vacuola y su posterior desintegración, las formas amastigotes de *T. cruzi* pasan a vivir en el citoplasma de la célula hospedera. Una vez en el citoplasma, las formas amastigote permanecen un tiempo prolongado (24-35 horas) en estado de latencia y posteriormente se inicia el proceso de división celular. Durante la división celular el proceso de citocinesis es relativamente rápido (aprox. 25 min.). Divisiones sucesivas llevan a la formación de docenas de amastigotes que van ocupando todo el citoplasma de la célula hospedera. Después de sucesivas divisiones, los amastigotes inician el proceso de transformación a tripomastigotes que dura algunas horas, aparentemente se inicia con el crecimiento del flagelo acompañado de cambios en la forma de la célula y en la estructura del cinetoplasto. El proceso de transformación es sincronizado para la mayoría de los parásitos, pero aún no se conocen las señales que disparan el proceso de transformación.

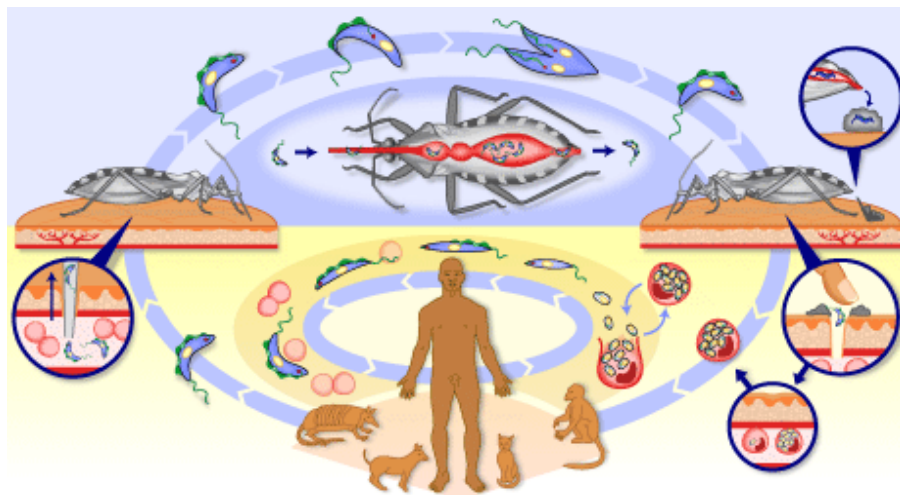


Figura 2. Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi. Tomada de Curso Latinoamericano de enfermedades infecciosas 2004 (Rodríguez 2004)

4.2.4 Epidemiología

La infección se localiza en América, desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile. Según la Organización Mundial de la Salud esta enfermedad afecta a 18 millones de personas en 15 países endémicos, con una incidencia anual de 200.000 nuevos casos.

En la naturaleza, *T. cruzi* se mantiene principalmente en un ciclo selvático que involucra a ciertas especies de triatomíneos que actúan como vector, y a varios mamíferos salvajes, como zarigüeyas, mapaches y ratas. Sin embargo, la invasión humana de la selva ha facilitado el contacto de los insectos y los animales salvajes infectados con el hombre, introduciendo así un ciclo peri-doméstico. Ciertas especies de triatomíneos como *Triatoma infestans* y *Rhoniulus prolixus*, tienen mayor propensión a invadir y anidar casas, por lo que con mayor frecuencia son responsables de la transmisión de la infección al hombre. La colonización de hábitat humano se encuentra frecuentemente ligada a la pobreza rural. Varios factores se encuentran involucrados. En construcciones por debajo de los estándares recomendados, las grietas y hoyos de las paredes sin recubrimiento y los techos de paja, proveen escondite adecuado para los insectos, facilitando la infestación. Además la localización de los pesebres para animales cerca de la casa-habitación y la proximidad con la naturaleza contribuye a la transmisión de la enfermedad.

4.2.5 Vías de transmisión de la enfermedad

La principal vía de transmisión del *Trypanosoma* entre sus hospedadores es la transmisión vectorial, a través de los insectos antes mencionados. Además de la vía vectorial (que representa del 80-90 % de transmisión), existen la transmisión transfusional (5-20 %) y la vía congénita (0.5-8 %). Las otras vías de transmisión son excepcionales (accidental, transplante de órganos, entre otras).

4.2.6 Patología clínica

La **enfermedad de Chagas** lleva a la muerte a largo plazo, pero a veces puede ser fulminante. Noventa y cinco por ciento de las veces, la infección no produce síntomas, o son tan leves, que no se perciben. Los periodos a destacarse son: agudo, crónico asintomático (portador sano), y crónico.

El periodo agudo, puede presentar signos de entrada como el signo de romaña o el chagoma de inoculación, las manifestaciones clínicas son más frecuentemente observadas en niños, donde la enfermedad puede ser mortal. En el adulto se pueden observar casos de mortalidad, pero con mayor frecuencia puede pasar desapercibida o presentarse en forma moderada. Esta etapa se inicia con una elevada parasitemia, la cual es limitada por la respuesta inmune del hospedero. Los síntomas para este periodo, en orden de prevalencia, son: fiebre, abatimiento, vómitos, diarrea, tos, palpitaciones, cefaleas, raquialgias, nerviosismo, y convulsiones. Una vez que la enfermedad avanza, si no lleva a la muerte, pasa a un periodo de sintomatología o portador crónico, los pacientes en esta fase crónica presentan niveles subpatentes de parasitemia, lo que dificulta en gran medida el diagnóstico parasitológico. Aproximadamente el 70% de los pacientes asintomáticos permanece así durante toda su vida. Sin embargo, un 30 % de ellos, después de permanecer por años asintomáticos, desarrollan lenta pero progresivamente *problemas cardíacos* que se manifiestan con un aumento del tamaño del corazón y una insuficiencia cardíaca general, lo que origina la llamada miocardiopatía chagásica crónica, la patología que se observa en nuestro país. Al sur de nuestro continente además de las alteraciones cardiológicas se puede observar *trastornos digestivos* que consisten inicialmente en dificultad para tragar. Más tarde los enfermos son afectados de mega vísceras, que consiste en un gran aumento del tamaño de las mismas, desintegración de las fibras musculares y desaparición de células nerviosas.

4.2.7 Diagnóstico clínico y epidemiológico:

Debido a la deficiencia en el diagnóstico de la enfermedad, el análisis debe complementarse con los antecedentes epidemiológicos y clínicos. Es importante conocer la procedencia actual y pasada del paciente, el tipo de vivienda donde habita, el hecho que haya sido picado o que conozca el vector. Adicionalmente, debe averiguarse si existen antecedentes de transfusión sanguínea o padres con la enfermedad.

En el examen físico, durante la fase aguda, son importantes los hallazgos referentes a edema, fiebre, hepatoesplenomegalia, adenopatías, taquicardia, arritmias y signos de insuficiencia cardíaca. En la fase crónica: alteraciones del ritmo y trastornos de conducción del músculo cardíaco (cardiopatía chagásica crónica) con o sin signos de insuficiencia cardíaca congestiva.

4.2.8 Diagnóstico de laboratorio:

4.2.8.1 Generales:

La vía más específica para el diagnóstico es la detección o visualización del parásito en sangre, a través de examen directo. Sin embargo, el diagnóstico parasitológico es difícil, por lo cual se realiza el diagnóstico serológico de rutina. A continuación se presentan brevemente las técnicas empleadas para el diagnóstico parasitológico (directos e indirectos) y los métodos serológicos.

4.2.8.2 Métodos parasitológicos:

4.2.8.2.1 Métodos directos:

Las técnicas que se describen a continuación, presentan niveles de sensibilidad variables que dependen del nivel de parasitemia que presenten los pacientes durante la fase aguda de la enfermedad. Con elevados niveles de parasitemia, los métodos directos presentan suficiente sensibilidad para garantizar el diagnóstico parasitológico. Sin embargo, el paciente durante la fase aguda puede presentar

niveles de parasitemia no tan elevados al estudiarlo, por lo que se recomienda el empleo de métodos que concentran la muestra de manera de tratar de incrementar la probabilidad de observar el parásito en sangre.

Estos métodos pierden considerablemente la sensibilidad cuando se ensayan en pacientes que se encuentran en la fase crónica, por lo que se recomienda el uso de métodos parasitológicos indirectos para poder realizar el diagnóstico.

A continuación se describen algunas de las técnicas empleadas para el diagnóstico parasitológico directo o indirectos y algunos de las ventajas y desventajas que presentan.

➤ Examen de sangre al fresco:

Con esta técnica se pretende visualizar la presencia de parásitos circulantes en la sangre del paciente. La sensibilidad durante el pico de parasitemia, en la fase aguda, es menor al 50% para un sólo examen y debe ser repetido varias veces para diferentes muestras de sangre de un mismo paciente, para aumentar su sensibilidad.

➤ Extendido coloreado:

Con este método se pretende identificar morfológicamente la especie de *Trypanosoma*. Se realiza cuando el examen al fresco resulta positivo.

➤ Gota gruesa:

Con este método se pretende concentrar un mayor número de parásitos en un área reducida. Durante la fase aguda la sensibilidad puede alcanzar el 66% y la probabilidad de éxito se incrementa en función de número de veces que se repita.

4.2.8.2.2 Métodos de concentración:

- Análisis del extendido de la “capa blanca”:

Consiste en centrifugar la sangre heparinizada del paciente y observar al microscopio una fracción leucocitaria enriquecida. Este método aumenta la sensibilidad del examen al fresco en la fase aguda.

- Triple centrifugación:

Consiste en remover paulatinamente los eritrocitos de la sangre heparinizada, mediante centrifugaciones a baja velocidad. Luego se centrifuga el plasma recolectado a mayor velocidad para buscar los parásitos en el sedimento. La sensibilidad puede alcanzar hasta un 70% en fase aguda.

4.2.8.2.3 Métodos parasitológicos indirectos:

- ⊕ Xenodiagnóstico:

Consiste en la demostrar la presencia de *T. cruzi* en el hospedador intermediario, previamente alimentado con sangre del paciente sospechoso. Este método permite amplificar el número de parásitos que se encontraban presentes en la sangre, debido a la fácil multiplicación del parásito dentro del vector. Para realizarlo, se usan ninfas de triatominos no infectados. Con el fin de constatar la presencia del protozoo dentro del vector, se analiza el contenido intestinal de los triatominos alimentados con la sangre del paciente (Jaramillo 2004). El análisis debe realizarse entre 30 y 45 días después de la ingestión. En las mejores condiciones se ha reportado que la sensibilidad del método, durante la fase crónica podría alcanzar el 60%

- ⊕ Hemocultivo:

Consiste en colocar muestras de sangre del paciente, en tubos con medio de cultivo. Las muestras son revisadas a los 20, 30 y 45 días, buscando formas epimastigotes (Jaramillo 2004). En la fase aguda, su sensibilidad podría alcanzar el 100%. Durante la fase crónica, presenta niveles de sensibilidad inferiores al xenodiagnóstico, pero permite aislar más fácilmente cepas del parásito.

- ⊕ Inoculación en animales sensibles:

Se usa principalmente el ratón o el cobayo, a los cuales se les inocula sangre del paciente tratada con anticoagulantes o con una porción de la “capa blanca”. El período de observación es variable, desde 3-4 semanas. Se buscan los parásitos en sangre de animales por el método del examen al fresco y se colorean en extendidos.

✦ Diagnóstico Parasitológico Molecular:

El desarrollo de una prueba de amplificación de ADN, podría llenar los requisitos para tener una prueba de diagnóstico parasitológico. En términos generales, si los primers son específicos y son empleados a la temperatura de reconocimiento adecuada, el producto de amplificación debería ser específico. Como todos los Eucariotes, *T. cruzi* presenta dos genomas distintos, situados en dos compartimientos celulares bien definidos como el núcleo y la mitocondria. El genoma de *T. cruzi* es relativamente superior ($100-200 \times 10^6$ pares de base (pb)) al de otros parásitos tales como el de *Leishmania* ($45-65 \times 10^6$ pb), o *T. brucei* (25×10^6 pb). La cantidad de ADN, varía entre diferentes aislados y entre clones de un mismo aislado. La prueba consiste en la amplificación del ADN del Cinetoplasto y del ADN nuclear en una muestra de ADN del paciente.

4.2.8.3. Métodos serológicos:

Desde hace más de 50 años se han diseñado una serie de reacciones serológicas que detectan anticuerpos circulantes anti-*T. cruzi* tales como: la reacción de fijación de complemento o prueba Machado Guerreiro, técnica difícil de estandarizar, razón por la cual ha sido reemplazada por técnicas más sencillas y reproducibles tales como la reacción de Hemaglutinación (HA). Algunas de estas técnicas aun son usadas ampliamente, porque no requieren de equipos especiales y son económicas (Camargo y col, 1992). A continuación se describen algunas de estas técnicas.

● Reacción de fijación del complemento:

Un anticuerpo específico en presencia de antígenos de *T. cruzi* es capaz de unirse formando la unión antígeno-anticuerpo, la cual es capaz de fijar complemento, por

la fracción Fc de la inmunoglobulina. Esta unión “no visible”, es puesta en evidencia por un sistema indirecto a través del empleo de glóbulos rojos de carnero, sensibilizados con antígenos del parásito. La sensibilidad está alrededor del 87%.

- Hemoaglutinación indirecta:

Consiste en la adherencia de antígenos específicos sobre la superficie de glóbulos rojos, que luego aglutinarán al producirse la reacción entre el antígeno y el anticuerpo homólogo existente en el suero inactivado del paciente. Esta reacción tiene una sensibilidad comparable a la reacción de fijación del complemento, pero es más sencillo su desarrollo e interpretación y no requiere de equipos especiales para su implementación.

- Reacción de anticuerpos líticos:

Consiste en incubar el suero de paciente con tripomastigotes sanguíneos purificados y vivos. La reacción se revela por la adición de complemento y se determina la lisis de los parásitos por recuento en cámara de Neubauer. La existencia de anticuerpos líticos se ha asociado a un efecto inmunoprotector, al postularse que cuando el paciente está curado, los títulos de este tipo de anticuerpos desaparecen. Esta reacción se hace negativa en ausencia de parásitos (esterilidad parasitaria), de ahí que se proponga como criterio de curación después del tratamiento. Esta técnica consume mucho tiempo, esfuerzo y recursos económicos

- Acoplamiento a los anticuerpos:

Dada la necesidad de incrementar la sensibilidad de las técnicas de detección, se desarrollaron una serie de cambios que amplifican las señales obtenidas. Fundamentalmente estos cambios ocurren en el segundo anticuerpo que a su vez reconoce al anticuerpo primario que es el que confiere la especificidad. Entre las más relevantes y en orden creciente de sensibilidad se encuentran: IFI, anticuerpo acoplado con molécula de fluoresceína; ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), una enzima acoplada al anticuerpo, o si se requiere de más sensibilidad, anticuerpo Biotinado y amplificado con avidina, la cual a su vez posee acoplada

varias moléculas de la enzima. A continuación se describen algunas de estas técnicas, basadas en detectar anticuerpos de pacientes chagásicos:

- Reacción de inmunofluorescencia Indirecta (IFI):

Esta técnica posee más sensibilidad que las pruebas serológicas descritas. La reacción detecta la existencia de anticuerpos dirigidos a *T. cruzi*, frecuentemente formas epimastigotes de cultivo, que son reconocidos por los anticuerpos de las personas infectadas. Un segundo anticuerpo marcado con un fluorocromo que reconoce al anticuerpo específico que ha reconocido al parásito, nos permite detectarlos, cuando son observados en un microscopio para fluorescencia, equipado con luz ultravioleta. El fluorocromo se excita, permitiendo la identificación visual de las reacciones positivas. Los principales problemas que presenta esta técnica son: 1) la posible subjetividad en la interpretación de los resultados. 2) requiere el uso de equipos especializados. 3) requiere un personal entrenado. 4) Los resultados son cualitativos.

- Reacciones inmunoenzimáticas:

Esta técnica conocida bajo el nombre ELISA se basa en la posibilidad de inmovilizar el antígeno a una fase sólida, sobre la cual se permite en una primera etapa la unión del anticuerpo. En una segunda etapa de la reacción, se añade un segundo anticuerpo acoplado a una enzima, permitiéndose la visualización de la reacción cuando se agrega el sustrato correspondiente. La reacción, luego de detenida con los reactivos adecuados, se puede leer por un cambio de color cuya intensidad es proporcional a la cantidad de anticuerpos que han reconocido el antígeno fijado. Entre las ventajas que ofrece esta técnica se encuentran: la gran capacidad para procesar un número importante de muestras, sus resultados son cuantitativos, evitando la subjetividad a la hora de interpretar los resultados, fácil manejo y un bajo costo. Esta reacción es considerada como la de más alta sensibilidad, parámetro que varía dependiendo de la calidad y características de los antígenos empleados. Por ejemplo, los antígenos completos presentan altos niveles de sensibilidad, pero confieren baja especificidad. Los péptidos o proteínas recombinantes pueden ser muy específicos, pero disminuyen la sensibilidad,

pudiendo diagnosticarse falsos negativos. Obviamente, la solución debería ser intermedia, sugiriéndose el empleo de varias proteínas recombinantes (Oelemann 1999, Ferreira 2001, Pereira 1990), pero aun así, se recomienda el empleo de varias pruebas para tener un diagnóstico certero. Aún cuando esta técnica podría alcanzar un 100 % de sensibilidad, la prueba con anticuerpos de pacientes Chagásicos presenta serios problemas de reactividad cruzada con otras enfermedades.

4.2.9 Problemática del diagnóstico serológico:

Un problema común para todos estos ensayos, a pesar de los niveles de sensibilidad de las técnicas empleadas, es la persistencia de resultados falsos, como consecuencia de la gran capacidad que presentan los anticuerpos de pacientes que padecen otras enfermedades, tales como Leishmaniasis, Sífilis, Fiebre Reumática, Malaria, Toxoplasmosis, o infección con *T. rangeli*, de reaccionar con los antígenos de *T. cruzi* (Frasch 1990, Chiaramonte 1996). En este contexto, en un área endémica, se pueden presentar en los Bancos de sangre problemas importantes de falsos positivos, que conducen a un descarte substancial de unidades de sangre, en sitios donde el problema económico es constante. Además, del problema de especificidad, el inconveniente más importante es la existencia de donantes con diagnósticos falsos negativos, los cuales son los casos más peligrosos, debido a la posibilidad de transmitir la enfermedad por una transfusión de sangre. Talleres realizados por diferentes laboratorios Latinoamericanos han demostrado que el empleo de una sola prueba no garantiza un diagnóstico certero independientemente de la preparación antigénica. Por ello, para que el diagnóstico de laboratorio sea certero, se recomienda emplear por lo menos tres reacciones serológicas. Sin embargo, debido a que la mayoría de los países donde la enfermedad es endémica, poseen pocos recursos económicos, se sugiere el empleo de al menos dos metodologías diferentes, con antígenos diferentes. Si ambas pruebas resultan positivas, se

considera al individuo infectado. En el caso que exista disparidad entre ambas pruebas es necesario realizar una tercera técnica o repetir alguna de las pruebas, para que se pueda definir el status del paciente” (Rodríguez 2004).

4.2.10 Técnicas empleadas en el estudio

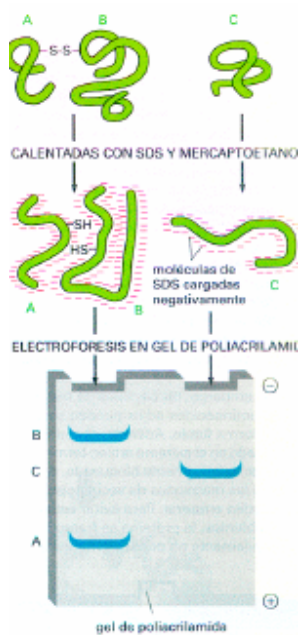
Este estudio comparativo de proteínas antigénicas entre los dos parásitos *Trypanosoma cruzi I y II*, es importante en la investigación sobre la enfermedad del Chagas, para ello se utilizó una serie de métodos y técnicas que nos permitirán llevar a cabo el estudio. Para llevar a cabo la extracción de las proteínas de los parásitos utilizó **Sonicación**, cuyo método consiste en la aplicación de una corriente eléctrica a un sistema mecánico que produce ondas de ultrasonido que a su vez generan millones de burbujas microscópicas, las cuales se expanden y colapsan contra las células causando la ruptura de su membrana. Dependiendo de la frecuencia, la intensidad y la energía aplicada se pueden destruir las estructuras subcelulares e incluso solubilizar complejos proteicos.

La determinación de la composición proteica de cada extracto de parásito se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de *poliacrilamida* con *sodio dodecil sulfato* (SDS-PAGE), la composición y formación del gel se ilustra a continuación: Los compuestos usados para formar la poliacrilamida son monómeros de acrilamida y N,N'-metilen-bisacrilamida. La estructura química de los monómeros y el polímero se muestran en la figura 4.

La reacción de co-polimerización de la acrilamida y la bisacrilamida está catalizada por un sistema iniciador químico o fotoquímico que genera radicales libres. La polimerización química en nuestro caso es iniciada por el TEMED (tetrametiletildiamina) y persulfato de amonio. Cuando el persulfato es disuelto en agua, éste forma radicales libres de persulfato, los cuales activan el monómero acrilamida. El TEMED es adicionado para servir como un catalizador para

acelerar la reacción de polimerización. El monómero activado de acrilamida puede entonces reaccionar con los monómeros inactivados y producir cadenas de polímeros que se enlazarán cruzadamente con la bisacrilamida para formar el gel de poliacrilamida.

Fig. 3. Separación de proteínas en SDS-PAGE



En SDS-PAGE, la mezcla de proteínas es desnaturizada por calentamiento a 100°C en presencia de un exceso de SDS y 2-mercapto-etanol que se emplea para romper los enlaces disulfuro. Bajo estas condiciones, todos los polipéptidos se enlazan a la misma cantidad de SDS en un peso base de 1.4 gramos de SDS por gramo de polipéptido, independientemente de la composición amino ácida y la secuencia de la proteína, el SDS quita la carga de las proteínas y les confiere una carga negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas viajen al ánodo.

La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional a la masa de la proteína, lo cual permite conocer el peso de las proteínas obtenidas, al comparar con patrones de peso molecular, puesto que las movilidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones lineales del logaritmo de su peso molecular. De este modo es posible separar las proteínas de un cultivo celular como el de *T cruzi* (Qinwei 1998).

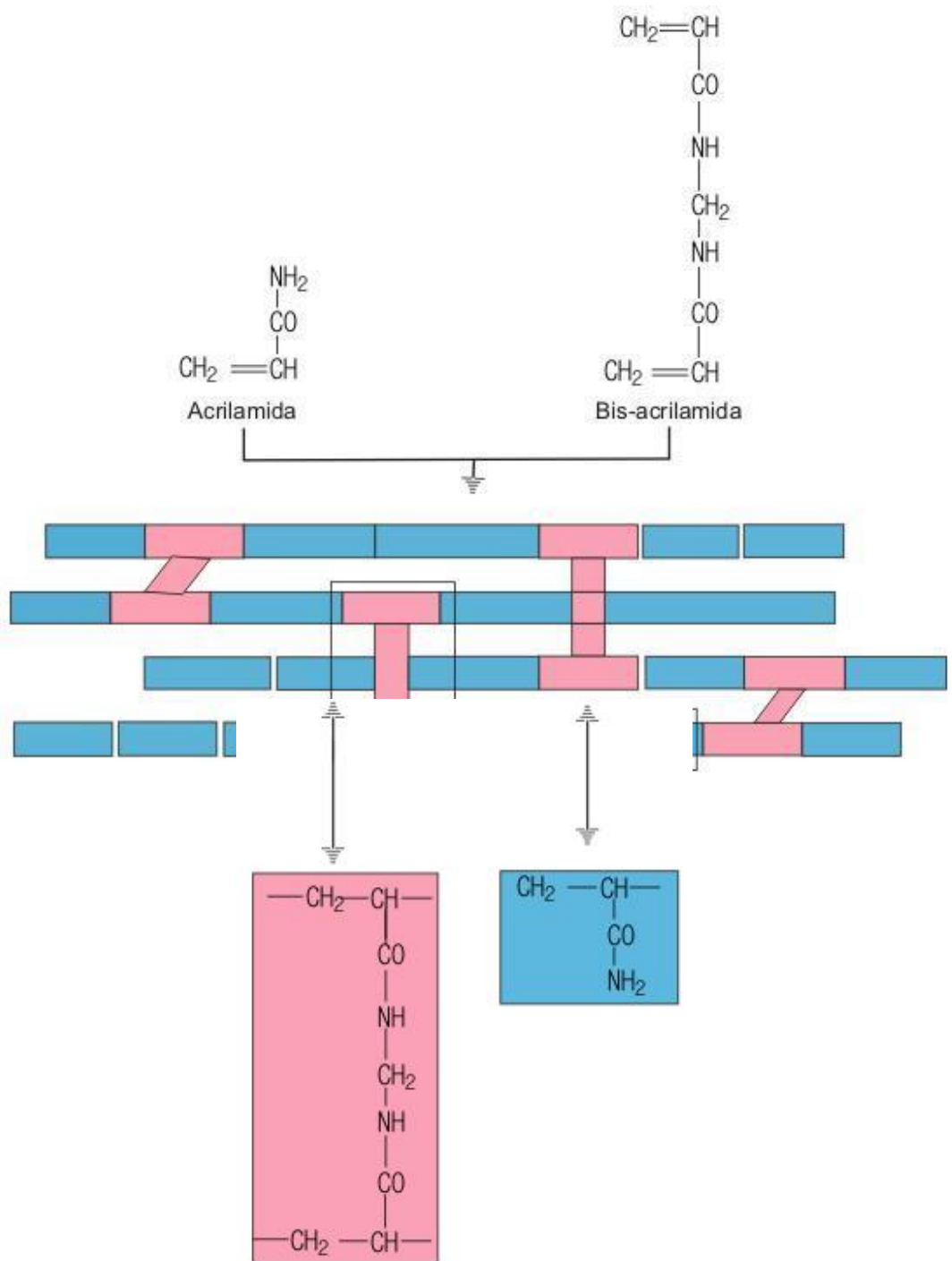


Figura 4. Estructura química del gel de poliacrilamida

La determinación de la capacidad antigénica de las proteínas presentes en cada parásito se realizó utilizando una inmunotransferencia. La cual implica la transferencia de macromoléculas biológicas desde un gel hasta una membrana y su posterior detección en la superficie de la misma. Este proceso es necesario ya que todas estas macromoléculas están embebidas dentro de la matriz que forma el gel, lo que imposibilita realizar su detección, mientras que en la membrana, se encuentran accesibles al estar adheridas sobre la superficie de la misma. Esta técnica fue descrita por primera vez por Towbin et al. en 1979 y en la actualidad es una técnica de rutina en todos los laboratorios que realizan análisis de proteínas. La especificidad de la unión antígeno anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja de otras proteínas, lo cual hace de la inmunotransferencia un criterio de identificación de proteínas, que además permite obtener datos cualitativos y semicuantitativos sobre las mismas.

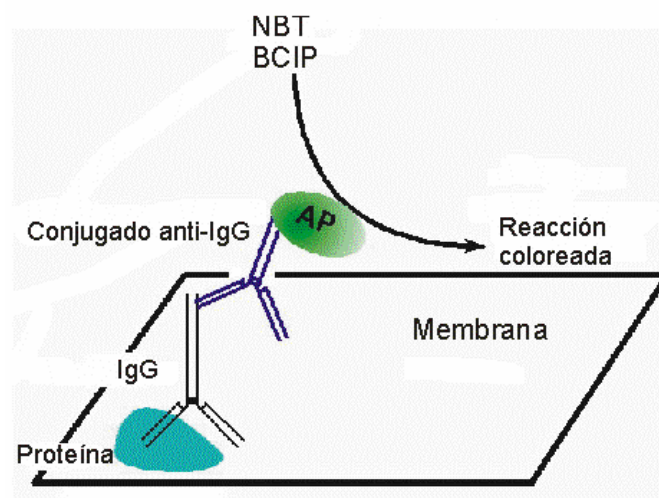


Figura 5. Representación de la reacción antígeno-anticuerpo y su detección

El primer paso de la inmunotransferencia es la separación de las macromoléculas mediante geles de electroforesis; después de esto, las macromoléculas ya separadas en función de su diferente peso molecular se transfieren a una segunda

matriz, generalmente una membrana de nitrocelulosa o PVDF (Polifluoruro de vinilideno). En la literatura hay descritos una gran variedad de métodos para este proceso, como la difusión, la capilaridad, por vacío o por electroelución (o transferencia electroforética), aunque éste último es el más ampliamente utilizado en la mayoría de las ocasiones por su rapidez y alta eficacia de transferencia. Este método se basa en la movilidad electroforética de las proteínas para transferirlas desde el gel hasta la membrana e implica poner en contacto directo el gel de poliacrilamida con las proteínas con la membrana de nitrocelulosa o de cualquier otro material adecuado para la unión de las mismas, formando un sandwich entre dos electrodos sumergidos en una solución conductora. Cuando se aplica un campo eléctrico, las proteínas migran fuera del gel de poliacrilamida hacia la superficie de la membrana donde quedan fuertemente adheridas, por lo que la membrana resultante es una copia exacta del patrón de proteínas que se tenía en el gel de poliacrilamida. La eficacia de la transferencia puede variar enormemente entre las diferentes proteínas dependiendo de la capacidad de la proteína de migrar fuera del gel, su tendencia a unirse a la membrana, la composición del gel, el completo contacto con la membrana, la presencia de detergentes. Entre otras.

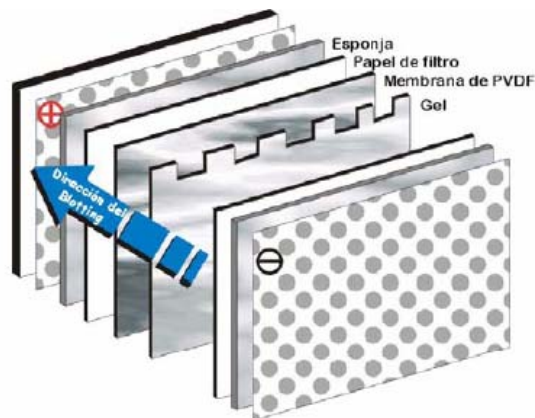


Figura 6. Transferencia de proteínas del gel a la membrana.

Posteriormente, se bloquea la membrana para evitar la unión inespecífica a su superficie de los anticuerpos que se van a utilizar para la detección de la proteína de interés. Existe una amplia variedad de tampones de bloqueo (desde la simple

leche o suero normal y corriente hasta proteínas altamente purificadas) para bloquear los sitios de la membrana que no han reaccionado. Estos tampones de bloqueo, lo que hacen es incrementar la sensibilidad del ensayo reduciendo la interferencia por el ruido de fondo (background). Sin embargo, no todos los tampones de bloqueo son compatibles con todos los sistemas, por lo que están disponibles comercialmente una gran variedad de bloqueadores tanto en tampón TBS como PBS, dependiendo la elección del bloqueador más adecuado del antígeno y la enzima que se vaya a utilizar.

En el siguiente paso, se une a dicha proteína transferida un anticuerpo primario, que en nuestro caso corresponde a la Inmunoglobulina G que se encuentra en el suero de pacientes enfermos de la enfermedad de Chagas. “La inmunoglobulina G hace parte del grupo de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD y IgE) que se encuentran en el plasma sanguíneo entre las cuales, la IgG es la más abundante y mejor conocida. Contienen cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas (H), con 430 restos aminoácidos, y dos cadenas ligeras, también idénticas entre sí, con 214 restos. Estas cadenas están unidas por enlaces disulfuro, constituyendo una estructura en forma de Y flexible, esquematizada en la figura 7 y 8. Las cadenas pesadas poseen un componente oligosacárido unido covalentemente. Cada una de las cadenas tiene una región aminoácido constante, y otra cuya secuencia es variable. La molécula de anticuerpo dispone de dos sitios de unión para el antígeno; las porciones variables de las cadenas Ly H contribuyen a esos centros de unión, que además se distinguen por poseer regiones hipervariables en las cuales se observa una elevada frecuencia de sustitución aminoácida. Los brazos de la Y pueden escindirse por acción de la papaína, enzima proteolítica, rindiendo unos fragmentos denominados Fab'. El suero sanguíneo de una persona normal contiene una mezcla de muchas inmunoglobulinas IgG diferentes, todas las cuales poseen la estructura mostrada en la figura 7 y 8. Cada tipo individual de inmunoglobulina tiene una combinación específica con determinado antígeno, para generar un ajuste óptimo para el

antígeno, los sitios de unión sufren ligeros cambios conformacionales. Estos ajustes son comunes en las interacciones proteína-ligando.

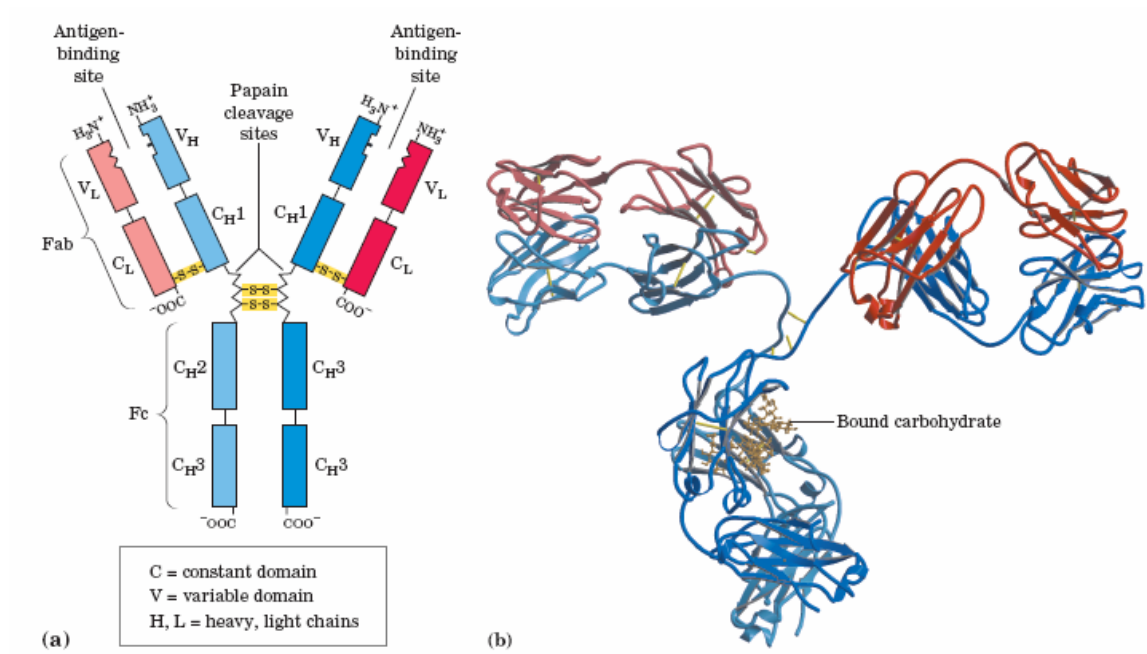


Figura 7: Estructura de la inmunoglobulina G (a) Combinación de las cadenas livianas y pesadas para formar una molécula en forma de Y. (b) Un modelo en cintas de la primera IgG completa cristalizada y analizada estructuralmente (PDB ID 1IGT). Tomada de Lehninger Principles of Biochemistry Fourth Edition (Lehninger 2000).

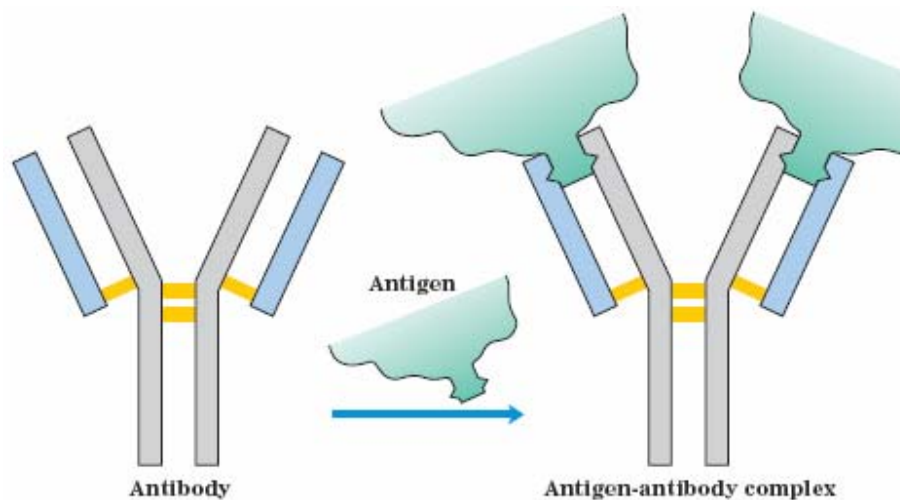


Figura 8. Enlace de la Inmunoglobulina G a un antígeno.._Tomada de Lehninger Principles of Biochemistry Fourth Edition (Lehninger 2000).

Posteriormente se añade el anticuerpo secundario con un tipo de marcaje incorporado. Hace algunos años se utilizaban radioisótopos, pero poseían una vida media muy corta, eran muy caros, requerían una manipulación especial y no ofrecían ninguna mejora de la relación señal:ruido. Como procedimientos alternativos, se han desarrollado los marcajes con biotina, fluoróforos o enzimas:

- El uso de fluoróforos requiere de menos pasos durante el proceso pero necesita de equipamiento especial para visualizar la fluorescencia, sobre todo si se desea tener un registro permanente de los resultados.
- El marcaje con enzimas se utiliza más ampliamente y, aunque necesita algunos pasos extra, suelen ser bastante sensibles. Las dos enzimas que más se utilizan son la fosfatasa alcalina (AP) y la peroxidasa de rábano (HRP) y hay una amplia variedad de sustratos cromogénicos, fluorogénicos y quimioluminiscentes disponibles comercialmente para cada enzima.

El tipo de marcaje que se utilizará en este estudio será enzimático, utilizando fosfatasa alcalina (AP), una enzima de 40 KDa de tamaño que normalmente se

aísla de intestino de carnero y que cataliza la hidrólisis de los grupos fosfato de la molécula de sustrato originando un producto coloreado, fluorescente o la liberación de luz como producto. Su actividad óptima es a un pH básico (pH 8 – 10) y puede inhibirse con cianidas, arsenatos, fosfato inorgánico y quelantes de cationes divalentes como, por ejemplo, el EDTA. Su principal ventaja es que su tasa de reacción permanece lineal por lo que se puede incrementar la sensibilidad de la detección simplemente dejando la reacción durante más tiempo.

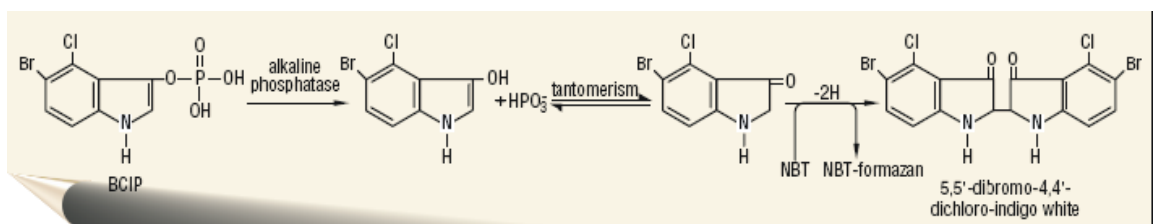


Figura 9. Acción de la fosfatasa alcalina con su sustrato específico BCIP. Tomada de www.cultek.com. (Cultek 2006)

Finalmente, como se dijo anteriormente, se añade un sustrato apropiado para dicha enzima con lo que se produce un producto detectable como, por ejemplo, un precipitado cromogénico o fluorogénico en la membrana. Al igual que ocurre con el resto de componentes de la inmunotransferencia, hay un gran número de sustratos disponibles comercialmente y su elección depende, entre otros factores, de la enzima utilizada (AP o HRP), la sensibilidad deseada y el método de detección o tipo de señal que se busque (colorimetría, fluorescencia, quimioluminiscencia, etc.).

Los sustratos cromogénicos son los más ampliamente utilizados y proporcionan el método de detección más barato y sencillo. Cuando estos sustratos entran en contacto con la enzima correspondiente, se transforman en productos insolubles coloreados que precipitan sobre la membrana, por lo que no necesitan ninguna instrumentación especial para realizar la visualización de los resultados. Para la

AP, los más utilizados son el NBT (cloruro de tetrazolio nitro-azul) y el BCIP (sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato).

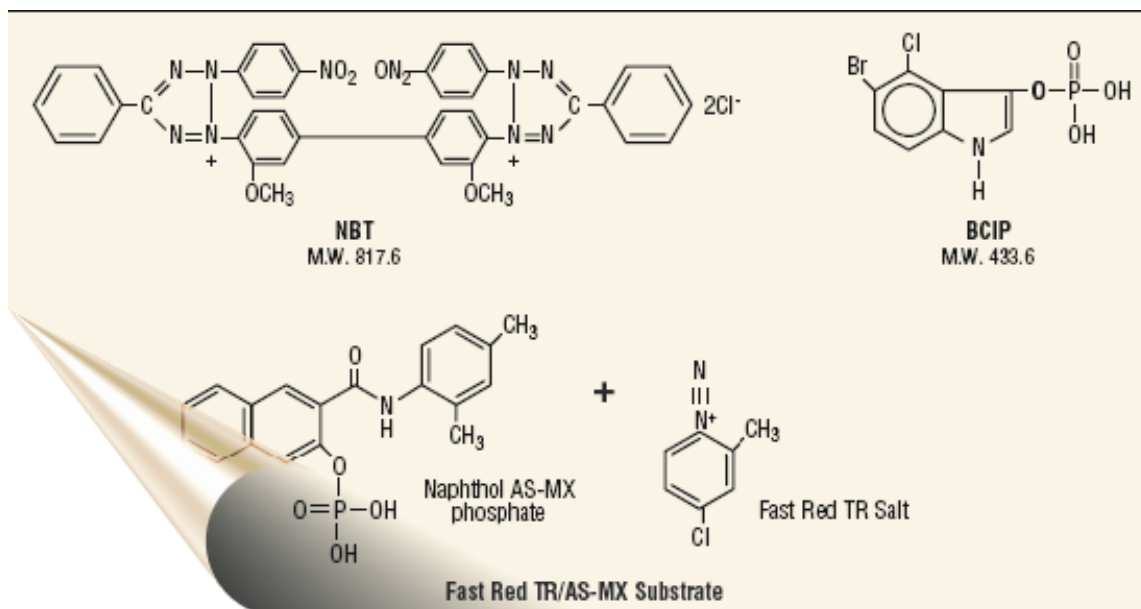


Figura 10. Sustratos específicos para la fosfatasa alcalina. Tomada de www.cultek.com. (Cultek 2006)

El NBT tiene un peso molecular de 817,6 Da y pertenece al grupo de las sales de tetrazolio; después de su reducción, da un precipitado de color azul púrpura insoluble en agua que tiene la gran ventaja de ser lineal y estable con la concentración a lo largo de un enorme rango dinámico. El BCIP tiene un peso molecular de 433,6 Da y su hidrólisis por la AP origina un precipitado de color azul púrpura que se deposita en las membranas de nylon o nitrocelulosa. Otra combinación ideal para la inmunotransferencia es la formada por el NBT y el BCIP, ya que juntos originan un precipitado negro púrpura muy intenso con mucha mayor sensibilidad que cualquiera de ambos sustratos por separado. Otra ventaja de la combinación de los dos sustratos es que proporcionan bandas mucho más definidas y con mucho menos ruido de fondo (Cultek 2006).

Del mismo modo se hará uso de los programas especializados que se encuentran en el mercado para realizar la comparación de los perfiles proteicos de cada uno de los parásitos, y de este modo determinar el rango de pesos moleculares que puedan contener proteínas propias de *T. cruzi I* o proteínas de interés especial si los perfiles proteicos son iguales.

4.1 ESTADO DEL ARTE

La gran pobreza rural, las viviendas deficientes, la tala y quema de árboles y la intromisión del hombre en el ciclo natural del parásito ha permitido la propagación de la enfermedad del Chagas en América latina (Rodríguez 2004). Desde 1909, cuando Carlos Chagas descubrió y aisló de las heces de los insectos triatomíneos el parásito responsable de la enfermedad que lleva su nombre (Coura 1966, Miles 1980), ya se tenían algunos indicios acerca de las diferencias morfológicas del parásito trasmisor de la enfermedad. Fue así como en 1966 se le asignó el nombre de complejo cruzi debido a las diferencias en la virulencia y los diferentes patrones que presenta la enfermedad (Miles 1977, Tibayrenc 1993, Fernández 1998, Vago 2000). Por medio de análisis bioquímicos de isoenzimas se clasificó el *Trypanosoma cruzi* en dos líneas filogenéticas diferentes: *Trypanosoma cruzi I* y *Trypanosoma cruzi II* (Brandão 2005). Recientemente se ha conocido una tercera división *Trypanosoma cruzi III* (Andrade 1999), y se han asociado las diferencias en la forma clínica como se presenta la enfermedad con las diferencias genéticas (Brandão 2005) que presentan los parásitos, las cuales muestran preferencia por los tejidos del corazón o del sistema digestivo (Rodríguez 2004).

En Colombia *T. cruzi I* es el grupo predominante, pero presenta una mayor heterogeneidad genética que la reportada en otros países del cono sur (Jaramillo 1999, Ruiz-García 2000, Montilla 2002, Cuervo 2002, Rodríguez 2002, Saravia 1987), y se ha encontrado asociado, tanto con ciclo doméstico como con el ciclo selvático y con la forma crónica de la enfermedad (Cardiopatía Chagásica) (Cuervo 2002). En el departamento de Santander hay una prevalencia en humanos de 80% de Z1 (*T. cruzi I*), con 20% de Z3 (*T. cruzi IIa*) (Devia 1999) y por análisis molecular los aislados de vectores y humanos pertenecen al grupo *T. cruzi I*, con variaciones genéticas claras entre los aislados del vector domiciliado y los humanos, presentándose en los primeros una mayor heterogeneidad (Jaramillo 2004). La mayor variabilidad genética observada en las cepas colombianas podría

estar afectando propiedades importantes relacionadas con la patogenicidad, inmunomodulación del sistema inmune, la resistencia a los fármacos, la distribución biológica y podrían junto con el polimorfismo natural de los humanos estar determinando las diferencias de presentación de la patología en esta región. Adicional a la variabilidad en la distribución geográfica de los distintos grupos de *T. cruzi*, en el transcurso de la diferenciación del parásito se producen cambios en el patrón de proteínas expresadas en los diferentes estadíos, algunas proteínas son específicas para cada estadío del parásito y podrían jugar un rol importante en la infectividad y supervivencia de *T. cruzi*.

En 1996 García M y Col. realizaron un estudio del perfil antigénico de *T. cruzi* mediante Western Blot, utilizaron sueros hiperinmunes obtenidos de conejos y como antígenos la cepa Y y cinco cepas yucatecas. En este estudio encontraron similitud en los patrones electroforéticos de las seis cepas. Los análisis de inmunotransferencia revelaron la presencia de 25 componentes antigénicos entre 10 y 199 KDa, además se presentó una similitud en los patrones antigénicos de las seis cepas estudiadas, especialmente en los rangos comprendidos entre 70 y 34 KDa. La reactividad de los sueros hiperinmunes de conejo fue mayor en todos los casos hacía los antígenos presentes en la cepa Y y en orden descendente hacia las otras cepas.

Se adelantó un estudio de genómica comparativa utilizando la cepa CL Brener, Silvio X10 (*T. cruzi I*) y 2 cepas de *T. cruzi II* obtenidas de un paciente asintomático y otro con presentación cardíaca y digestiva para tratar de establecer diferencias que relacionen directamente el grupo de *Trypanosoma cruzi* con la forma de presentación de la patología. Utilizando la proteómica comparativa se han publicado dos estudios con *Trypanosoma cruzi*, uno de ellos analizó la expresión proteica de epimastigotes de la cepa Dm28c y el otro determinó los cambios en la expresión génica a nivel de diferentes estadíos del parásito, además existen herramientas bioinformáticas para estudiar el parásito, tales como

la base de datos TcruziDB35 (Parodi-Talice 2004, Paba 2004, Agüero 2006, Atwood 2005).

No hay reportes en relación con análisis comparativos de proteínas entre los dos grupos de parásitos utilizando cepas pertenecientes a la región nororiental del país, ni la relación con las diferentes formas de presentación de la patología. Sin embargo, si se han realizado numerosos análisis inmunológicos, bioquímicos y funcionales de proteínas relevantes en la interacción hospedero-parásito y en la patogénesis de la enfermedad. La mayoría de ellos involucran cepas pertenecientes al grupo *T. cruzi II*, especialmente la cepa Y, debido a su adaptación a las condiciones de cultivo y algunas cepas *T. cruzi I* de referencia, como la cepa Tulahuen y la cepa Dm28c.

En 1990, se estableció que la glicoproteína gp72 está presente en la superficie de epimastigotes y trypomastigotes metacíclicos y es la responsable de interactuar con las lectinas presentes en el intestino del vector y facilitar de esta forma la adherencia del parásito (Hartl 2002).

Los procesos de invasión del parásito a la célula han sido estudiados y han determinado la presencia de una proteína de superficie de 60KDa, denominada penetrina, la cual promueve la adhesión e invasión a la célula hospedera (Ortega 1991).

En este marco, se ha estudiado la cruzipaina, una cisteína proteinasa lisosomal (aunque hay también localización de algunas isoformas minoritarias en la membrana plasmática), la cual está presente en los epimastigotes a una concentración apreciablemente mayor que en los otros estadios del parásito. Se trata de una glicoproteína con alto contenido de manosa, con un peso molecular variable entre 40-45KDa. Las funciones de la cruzipaina incluirían protección del

parásito ante la respuesta inmune y participación en las etapas de diferenciación del parásito al encontrarse en todas las fases del mismo (Cazzulo 1999).

Se han extraído también otras proteínas de la cepa Y (*T. cruzi II*), las mucinas, las cuales son un grupo de proteínas identificadas en un amplio rango de peso entre 60 y 220 KDa, y juegan un papel muy importante en la protección del parásito, la infectividad y la modulación de la respuesta inmune del hospedero a través del ciclo de vida del *T. cruzi* (Frasch 2001, Almeida 2001, Acosta 2001).

Se ha establecido que durante el ciclo de vida, el *T. cruzi* sufre gran cantidad de procesos de diferenciación, y el cambio de temperatura durante el paso del vector al hospedero induce la expresión de proteínas de choque térmico en *T. cruzi* (Rondinelli 1994). Se han identificado dos proteínas de choque térmico HSP60 y HSP10 y se ha determinado que corresponden a proteínas ubicuas, que conservan un grupo de chaperonas moleculares y proteasas esenciales para la viabilidad celular y que son requeridas por muchas proteínas para alcanzar su conformación nativa. Las HSPs han sido implicadas en una gran cantidad de enfermedades infecciosas, siendo primeramente blancos para el sistema inmune del hospedero y muchas HSP son inmunogénicas (Hartl 2002).

Se ha realizado también la purificación mediante cromatografía de afinidad de la glicoproteína LLGP de 67 KDa, la cual está presente en la fase epimastigote y tripomastigote del parásito. Esta proteína ha sido implicada en la invasión y en el reconocimiento de la célula hospedera en las células endoteliales de la arteria mamaria, aurícula y ventrículo derecho (Silber 2002). En este estudio se demostró la relevancia de la LLGP-67 como un antígeno útil en el diagnóstico de la enfermedad del Chagas, al mostrar una sensibilidad y especificidad del 98 y 98.11% respectivamente (Mancipar 2003).

Como todos los kinetoplastos, el *Trypanosoma cruzi* es caracterizado por la presencia de organelos peculiares, los glicosomas (Opperdoes 1987). Éstos corresponden a microcuerpos esféricos de 0.1-0.3 μm (Opperdoes 1984). Como lo indica su nombre, este organelo está muy involucrado en la degradación de glucosa, ya que contiene las primeras siete enzimas glicolíticas y algunas enzimas auxiliares como la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), la malato deshidrogenasa (MDH) entre otras enzimas encontradas en este organelo. Los glicosomas como los peroxisomas están envueltos por una membrana, la cual contiene como mínimo dos clases de proteínas: 1) aquellas encargadas del intercambio de metabolitos entre la matriz glicosomal y el citosol; 2) aquellas necesarias de importar nuevos polipéptidos sintetizados de la matriz del citosol. En el 2004. Quiñones y col. estudiaron la composición proteica y lipídica de la membrana del glicosoma de epimastigotes y encontraron algunas proteínas de interés, tales como: 1). La proteína de membrana GMP36 la cual probablemente corresponda a una hemoproteína que podría pertenecer a la gran familia del citocromo P450, el cual está constituido por proteínas de PM alrededor de 40KDa involucradas en reacciones redox de hidroxilación y demetilación (Concepción 1998). 2) la GMP75 una proteína de carácter hidrofílico, cuya expresión esta aparentemente bajo preciso control genético, y probablemente se relaciona con cambios en el metabolismo y la morfología del parásito cuando entra en la fase estacionaria (Urbina 1994). 3) La GMP85-100, los cuales corresponden a polipéptidos de alto peso observados en el glicosoma de *T. cruzi*, que actúan como proteínas integrales de membrana con probables dominios hidrofílicos expuestos hacia el citosol.

En enero de 2004 Diez y col. presentaron una detallada revisión acerca de la proteína KMP-11, una proteína de membrana, que está presente en otros kinetoplastos como *Leishmania* y *Crithidia*, cuya función biológica precisa se desconoce, pero su conformación estructural, homología con las apolipoproteínas y posible asociación en la membrana de los parásitos con otros componentes

anfipáticos como el LPG en *Leishmania* y las proteínas ácidas repetitivas en *T.brucei* sugieren que ella puede interactuar con la bicapa lipídica, regulando la presión e incrementando la consistencia de la membrana al permitir la estabilidad de moléculas como el LPG (Jardim 1995). Del mismo modo, mediante estudios de inmunomicroscopía electrónica se ha demostrado que la KMP-11 de *T. cruzi* se encuentra asociada al citoesqueleto del parásito, probablemente con los microtúbulos subpeliculares localizados debajo de la membrana plasmática, principalmente en el bolsillo flagelar (Thomas 2000). De manera que, los anteriores hallazgos sugieren que la proteína KMP-11 puede estar implicada tanto en la movilidad del parásito como en su unión a la célula huésped. Se le ha descrito también como un inmunoestimulador de células B e inductor de linfoproliferación y respuesta citotóxica (Marañón 2001, Thomas 2001).

Siguiendo con este estudio, en 2007 Diez y col. demostraron que el péptido sintético K1 derivado de la proteína de *Trypanosoma cruzi* KMP-11, es un inmunoestimulador de células B mostrando importantes porcentajes de reconocimiento en pacientes chagásicos.

En 2006, Mancedo y col. encontraron un antígeno reconocido por los pacientes chagásicos, de localización subcelular en cercanías de la membrana celular y en el complejo de Golgi, que presenta homología con VIP-36 una lectina de secreción, relacionada con las proteínas implicadas en el tráfico intracelular de membranas, que actúa como un receptor tipo “carga” que alterna entre el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático.

Por otro lado, la mayoría de los antígenos que se usan para el diagnóstico de *T. cruzi* son mezclas complejas de moléculas extraídas a partir de parásitos completos o fracciones del parásito. Estas muestras pueden dar reacciones de falsos positivos o reacciones cruzadas con sueros de otros patógenos tales como *Leishmania* y *Trypanosoma rangeli* (Frasch 1990, Chiaramonte 1996). Se han

reportado también variaciones en términos de la reproducibilidad de reactivos usados para el diagnóstico basado en extractos de parásitos semipurificados o completos del parásito. Además, se han realizado intentos para reemplazar extractos del parásito por proteínas purificadas del mismo, que presenten valores más altos de sensibilidad y especificidad, y para ello se han evaluado una gran variedad de moléculas nativas (Oppendoes 1987).

Desde 1978, se han descrito varias proteínas que han sido reconocidas por pacientes Chagásicos y que podrían ser empleadas en técnicas serológicas. Entre ellas destacamos: una proteína de 100KDa detectada en la orina de pacientes en fase crónica de la enfermedad (Katzin 1989); las glicoproteínas de 90 (Schechter 1983), 72 (Snary 1983), 66-70 (Pantoja 1993) y 57 (Gazzinelli 1990) KDa. En otro estudio Araujo (Araujo 1986) reporta el hallazgo de polipéptidos antigénicos comprendidos en el rango de 31-21 KDa específicos para *T. cruzi*, y finalmente el polipéptido de 25KDa, también utilizado con fines diagnósticos (Tachibana 1991).

Ante el daño causado por las proteasas del parásito y el alto costo de los inhibidores de proteasas, en junio de 2001 se realizó el estudio de las fracciones glucosídicas de *T. cruzi*, como una opción para el diagnóstico, puesto que estas fracciones no son digeridas por proteasas. En este estudio, al analizar los extractos totales encontraron proteínas comunes a los cuatro estadíos (a 160, 57, 48, 35/33, 30/28, 25 y 21/19 KDa) y en los epimastigotes proteínas propias (a 100, 88, 75, 72, 47 y 34 KDa). En las fracciones glucosídicas determinaron cuatro bandas comunes en todos los estadíos a (9, 12/14, 19 y 31/28 KDa) y en epimastigotes y metacíclicos a (95, 92, 80/75, 66/62, 60/57 y 52/48 KDa). A las fracciones glucosídicas se les realizó inmunotransferencia, utilizando suero anti-epimastigote obtenido de conejos, y encontraron en los epimastigotes proteínas antigénicas a (190, 130, 120, 72, **66/64**, **62/60**, 57, **55**, **52/50**, 48, 43, 41 KDa) de las cuales, aquellas que se encuentran resaltadas son comunes a los cuatro estadíos (Lima 2001).

Se tiene reporte de un estudio comparativo de proteínas de membrana GPI- ancladas en epimastigotes de cepas de *Trypanosoma cruzi I* y *Trypanosoma rangeli*, en el cual encontraron proteínas específicas de *T. cruzi I* a 30, 70 y 100 KDa que no estaban presentes en las cepas de *T. rangeli* analizadas. Del mismo modo, se establecieron proteínas a 56,85 y 90 KDa en los aislados de *T. rangeli* ausentes en los extractos de *T. cruzi I*. Éstas proteínas presentaron respuesta inmune y se les valora como posibles antígenos útiles en pruebas de diagnóstico en aquellos lugares donde la enfermedad del Chagas es endémica y se presentan reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos (Anez 2005).

De forma alternativa, se ha reportado una sensibilidad del 98.8% y una especificidad del 98.3% al reemplazar las fracciones de epimastigote por extractos de tripomastigote en las pruebas de ELISA (Schechter 1988). Se ha utilizado la inmunotransferencia como una técnica alternativa que puede ser utilizada cuando se tengan resultados inconclusos al utilizar otras técnicas serológicas como ELISA, IFA ó IHA. En 1998 se utilizó inmunotransferencia para analizar 136 pacientes chagásicos, 23 con resultados inconclusos, 53 pacientes con otras enfermedades y 50 pacientes sanos. Se reportaron 33 proteínas reconocidas en el rango de 1-160 KDa. Los investigadores consideraron un suero positivo cuando éste reconoció por lo menos cinco bandas antigénicas de un grupo de 10 con alta frecuencia de reconocimiento; indeterminado cuando reconocía cuatro de las 10 antes mencionadas y negativo cuando el suero no mostraba reactividad. Los estudios realizados determinaron que de los 136 sueros de pacientes chagásicos el 86.8% eran positivos por inmunotransferencia, el 11.76% presentó resultados indeterminados y el 39.13% mostró resultados negativos. Finalmente la sensibilidad y especificidad obtenida fue del 86.60% y 100% (Vissoci 1998) respectivamente.

Se han utilizado una gran variedad de antígenos recombinantes provenientes de proteínas antigénicas de *T. cruzi II*, para optimizar el diagnóstico de la infección,

particularmente en términos de lograr mejores valores de especificidad (Umezawa 2003, Pereira 2003). Sin embargo, la mayoría de ellos no fueron tan sensibles como los antígenos nativos (Oelemann 1999, Ferreira 2001).

Como se ha mostrado anteriormente, son múltiples las dificultades que se presentan en las pruebas de diagnóstico, en su mayoría por el tipo y la calidad del antígeno, es por ello que analizar la composición proteica de una cepa autóctona y evaluar su capacidad antigénica es de gran importancia, no solo en el diagnóstico de la enfermedad, sino en la determinación de proteínas relevantes expresadas por cada tipo de paciente y su relación con aquellas proteínas implicadas en los procesos de invasión del parásito a las células hospederas.

5. METODOLOGÍA

5.1 CULTIVO DE LOS TRIPANOSOMATIDOS

El cultivo en la fase epimastigote de la cepa 338 (*Trypanosoma cruzi I*), extraída de un paciente en la fase crónica de la enfermedad, se realizó en el medio NNN, el cual contiene una fuente de carbono, sales esenciales y sangre desfibrinada.

El cultivo de la cepa Y (*Trypanosoma cruzi II*), *Trypanosoma rangeli* y *Crithidia* se realizó utilizando medio RE1, el cual está compuesto por una fuente de carbono infusión de cerebro-corazón BHI, sales y hemina.

5.2 EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Los parásitos fueron extraídos del cultivo por centrifugación, lavados con buffer fosfato salino (PBS), esterilizado por autoclavado (15Lb, 20 minutos), que contenía *NaCl* 137mM, *KCl* 2.68mM, *Na₂HPO₄* 10.2mM y *KH₂PO₄* 10.6mM a pH 7.4 y ajustadas a una concentración 1mM de fenil metilsulfonyl fluoruro (PMSF). A continuación las células se lisaron mediante 4 ciclos de congelación-descongelación y dos ciclos de sonicación, bajo las siguientes condiciones (120 Khz, 30 Watt, 2 minutos). Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C y finalmente se retiró el sobrenadante que contenía las proteínas solubilizadas.

5.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS UTILIZANDO EL MÉTODO DE BRADFORD

El reactivo de Bradford se preparó mezclando 50ml de etanol al 95% (v/v), 100mg azul de Coomassie G250 y 100ml de ácido ortofosfórico al 85% (v/v).95%. Se realizó la curva de calibración, utilizando una solución de albúmina de 1mg/ml, con la cual se preparó soluciones de proteína de 0.1 -1mg/ml, utilizando como diluyente el buffer fosfato salino (PBS), tal como se muestra en la tabla 1

Para la determinación de las proteínas solubles, se mezcló 1ml de reactivo de Bradford y 20µL de patrón de proteína, se dejó reposar la mezcla durante dos minutos y se leyó la absorbancia de cada patrón de proteína a una longitud de onda de 595nm en un espectrofotómetro marca Termo Electrón Corporation, modelo Genesis 10UV (Bradford 1976).

Solución	mg/ml	Absorbancia
1	0.1	0.032
2	0.2	0.197
3	0.4	0.287
4	0.6	0.420
5	0.8	0.474
6	1.0	0.714

Tabla 1. Absorbancia de los patrones de albúmina.

Una vez conocida la curva de calibración se pasaron las muestras problema que correspondían a los extractos de proteínas de *Trypanosoma cruzi* I cepa 338, *Trypanosoma cruzi* II cepa y, *Trypanosoma rangeli* y *Crithidia*

5.4 DETERMINACIÓN DEL PATRÓN PROTEICO UTILIZANDO ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Se utilizó una cámara de electroforesis marca BIORAD, modelo Mini Protean II. Se ensamblaron los vidrios de acuerdo a las especificaciones de manufactura y se preparó 5.01 ml de gel de separación siguiendo el orden y las cantidades descritas en la tabla 2:


Gel de Separación 12%		
	Agua destilada	1.70 ml
	Acrilamida 30%-Bis acrilamida 0.8%	2.00 ml
	Tris-HCl 1.5M pH=8.8	1.25 ml
	Sodio dodecil sulfato SDS 20%	0.025 ml
	Persulfato de amonio 10%	0.025 ml
	Tetrametiletilendiamina TEMED	0.010 ml

Tabla 2. Componentes y volúmenes para el gel de separación

Se vertió el gel entre los vidrios y se cubrió con una capa de isopropanol al 60%, con el propósito de hacer más efectiva la polimerización. Una vez polimerizado el gel de corrido se lavó con agua para retirar el isopropanol y porciones de acrilamida sin polimerizar, se secó con papel de filtro y se vertió 3.165 ml del gel de concentración de acuerdo a la tabla 3:

Gel de Concentración 4%		
	Agua destilada	1.86 ml
	Acrilamida 30%-Bis acrilamida 0.8%	0.45 ml
	Tris-HCl 0.5M pH=6.8	0.75 ml
	SDS 10%	0.030 ml
	Persulfato de amonio 10%	0.060 ml
	TEMED	0.010 ml

Tabla 3. Componentes y volúmenes para el gel de Concentración

Se introdujo el peine en la solución y se dejó polimerizar. Terminada la polimerización se sacó el peine, se limpiaron los pozos, se introdujo el montaje en la cámara de electroforesis y se cubrió con buffer de corrido. La composición del buffer de separación se describe a continuación en la tabla 4:




Buffer de Separación		
Reactivos	Concentración en la solución	
 Tris Base	0.2%	
 Glicina	1.44%	
 SDS	0.1%	

Tabla 4. Composición y concentración del buffer de separación

Se preparó las muestras mezclando 10 μ L de extracto de proteínas de parásito con 10 μ L de buffer de carga, se sembraron en los pozos junto a 4 μ L de marcador de peso molecular marca FERMENTAS, que contenía proteínas en el rango de pesos comprendido entre 200 y 10KDa.

La composición del buffer de carga se relaciona en la tabla 5:

Buffer de carga para muestras		
Reactivo	Concentración en la solución	
Tris=HCl 0.5M	25%	
Glicerol	20%	
SDS 10%	40%	
2-Mercapto etanol	10%	
Azul de bromofenol	5%	

Tabla 5. Composición y concentración del buffer de carga para muestras

La figura 11 muestra la cámara de electroforesis conectada a la fuente de poder e ilustra el corrido de las muestras.



Figura 11. Cámara de electroforesis

Se aplicó un voltaje de 110V durante el paso de las muestras sobre el gel de concentración y enseguida se bajó el voltaje a 100V, se dejó correr durante 1 hora y media.

Se realizó la tinción del gel durante 12 horas en solución colorante con azul de Coomassie R250 y para observar las bandas se destiñó el gel con solución decolorante. La composición de la solución colorante y decolorante se muestra en las tablas 6 y 7

Solución colorante	
Reactivos	Concentración en la solución
Metanol	50%
Ácido acético	10%
Ázul de Comassie	0.25%

Tabla 6. Composición y concentración de la solución colorante

Solución decolorante	
Reactivos	Concentración en la solución
Metanol	50%
Ácido acético	10%

Tabla 7. Composición y concentración de la solución decolorante

5.5 COMPARACIÓN DE LOS PERFILES PROTEICOS DE LOS DOS PARÁSITOS *T. cruzi. I* Y *T. cruzi. II*.

Mediante el programa PhotoCaptMw versión 1.0, se determinó diferencias en los perfiles proteicos y el peso molecular de las proteínas de cada parásito.

5.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS:

Se determinó la capacidad antigénica de las proteínas de cada cepa, realizando la separación electroforética con las condiciones descritas anteriormente. Una vez realizada esta separación se dejó el gel durante 20 minutos en buffer de transferencia. La composición del buffer de transferencia se describe en la tabla 8.




Buffer de transferencia		
Reactivos	Concentración en la solución	
 Tris Base	0.3%	
 Glicina	1.44%	
 Metanol	15 %	

Tabla 8. Composición buffer de transferencia

A continuación se cortó una pieza de membrana de PVDF marca Biorad de 11cm de largo por 7 de ancho, se humedeció con 10ml de metanol por 3 segundos, se puso en un recipiente con agua destilada por cinco minutos y finalmente se dejó en buffer de transferencia. En un recipiente con abundante buffer de transferencia se empacó el cassette de la transferencia de la siguiente manera: se colocó el cassette abierto sobre su parte negra, se colocó la esponja y un papel de filtro marca Biorad. Se sacó el gel de la bandeja en la que se encontraba con buffer de transferencia y se colocó encima del papel de filtro, luego se colocó la membrana PDVF previamente humedecida, otro papel de filtro, la esponja y se cerró el cassette.

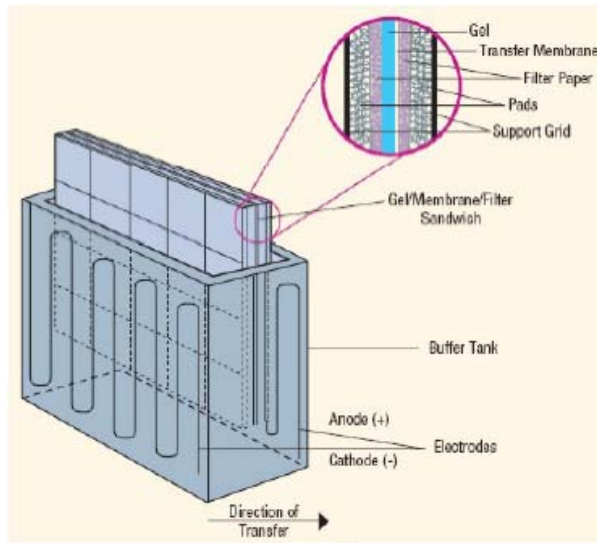


Figura 12. Cassete de transferencia

Se colocó la cubeta del electrodo en el recipiente de transferencia, sobre la plancha de agitación y se introdujo el cassette en la cubeta del electrodo colocando la parte negra del cassette junto a la parte negra de la cubeta, se introdujo la barra magnética, y se conectó a la fuente a 100V durante la hora que duró la transferencia.



Figura 13. Montaje de transferencia de proteínas

Terminada la transferencia de proteínas se sacó la membrana del cassette y se dejó en solución de bloqueo durante 12 horas a temperatura ambiente. La composición de la solución de bloqueo se describe en la tabla 9 y 10.

TBS	
Reactivos	Concentración en la solución
NaCl	0.9%
Tris-HCl 1M pH :7.4	2%

Tabla 9. Composición del Buffer salino TBS

SOLUCIÓN DE BLOQUEO	
Leche descremada	5 %
Tween 20	1 %
TBS	Aforar a 100 ml

Tabla 10. Composición de la solución de bloqueo

Terminado el bloqueo se realizó tres lavados de diez minutos a la membrana con solución de lavados. La composición de la solución de lavados se describe en la tabla 11.

SOLUCIÓN DE LAVADOS	
Tween 20	0.5%
TBS	Aforar a 100 ml

Tabla 11. Composición de la solución de lavados

Una vez terminados los lavados, se incubó la membrana con los sueros (dilución 1/200 en solución de dilución) de: 50 pacientes asintomáticos fase I, (pacientes infectados sin compromiso clínico, radiológico ni electrocardiográfico de lesión cardíaca). 50 pacientes sintomáticos de fase II (Infección chagásica con sintomatología moderada o nula, radiología normal o indicativa de hipertrofia cardíaca leve), fase III (Infección chagásica con sintomatología evidente, hipertrofia cardíaca moderada) y fase IV (Infección chagásica con sintomatología muy pronunciada con insuficiencia cardíaca) y 50 pacientes seronegativos. La cantidad incubada fue de aproximadamente 0.1 ml de suero por cm² de membrana, la incubación se llevó a cabo por una hora y media con agitación constante. La composición de la solución de dilución se muestra en la tabla 12.

SOLUCIÓN DE DILUCIÓN	
Leche descremada	0.5%
Tween 20	0.2%
TBS	Aforar a 100 ml

Tabla.12. Composición de la solución de dilución

Terminada la incubación con los sueros se realizaron tres lavados de diez minutos cada uno con solución de lavados. A continuación se incubó la membrana con el conjugado anti IgG-fosfatasa alcalina (AP) en una dilución de 1/5000 con solución de dilución, la cantidad incubada fue de aproximadamente 0.1 ml de suero por cm² de membrana, la incubación se llevó a cabo por una hora y media con agitación constante.

Igualmente, se realizaron 3 lavados de diez minutos cada uno, con solución de lavados.

Finalmente, para revelar la reacción se incubó la membrana con el sustrato de la enzima el NBT y BCIP en el buffer de la enzima (PA), La aparición de las bandas se presentó entre 5 y 15 minutos. Las cantidades específicas y la composición del buffer PA se muestran en la tabla 13 y 14.

BUFFER FOSFATASA ALCALINA	
NaCl 1 M	1%
Tris-HCl 1 M pH: 9.5	19%
MgCl ₂	0.5%

Tabla 13. Composición del buffer para el sustrato de la fosfata alcalina

SUSTRATO FOSFATASA ALCALINA		
Reactivo		
	NBT (0.5% P/V en dimetilformamida al 70%)	0.66%
	BCIP (0.5% P/V en dimetilformamida al 100%)	0.33%
Aforar con Buffer AP		

Tabla 14. Cantidades de NBT y BCIP utilizadas para el buffer PA

5.7 COMPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE LOS DOS PARÁSITOS *T. cruzi I* y *T. cruzi II*.

Se escaneron las imágenes de las membranas y posteriormente se ajustaron sus tamaños mediante el programa Corel Photo-Paint 12 y CorelDRAW, adecuando las imágenes de las tiras cortadas a distancias iguales y áreas iguales. La determinación de la curva de calibración de los pesos moleculares (PM) de las proteínas patrón y la determinación de los PM de las proteínas antigénicas se realizó con el programa PhotocaptMw.

Por otro lado, al ser la inmunotransferencia un método de diagnóstico alternativo, se estableció el estado clínico de un paciente, considerando un suero positivo si presentaba por lo menos cuatro bandas de 10 bandas que presentaran alto porcentaje de reconocimiento, e indeterminado si solo mostraban 3 bandas y negativo si no presentaba reactividad con el antígeno.

6. RESULTADOS

6.1 EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

En la Tabla 15 se muestra la concentración de proteína obtenida para cada parásito estudiado. Los valores de las concentraciones de proteína soluble fueron en torno a 0.2 mg/mL, los cuales permiten realizar los análisis mediante SDS-PAGE, ya que están sobre el límite de detección de esta técnica de electroforesis.

6.2 DETERMINACIÓN DEL PERFIL PROTEICO DE CADA PARÁSITO

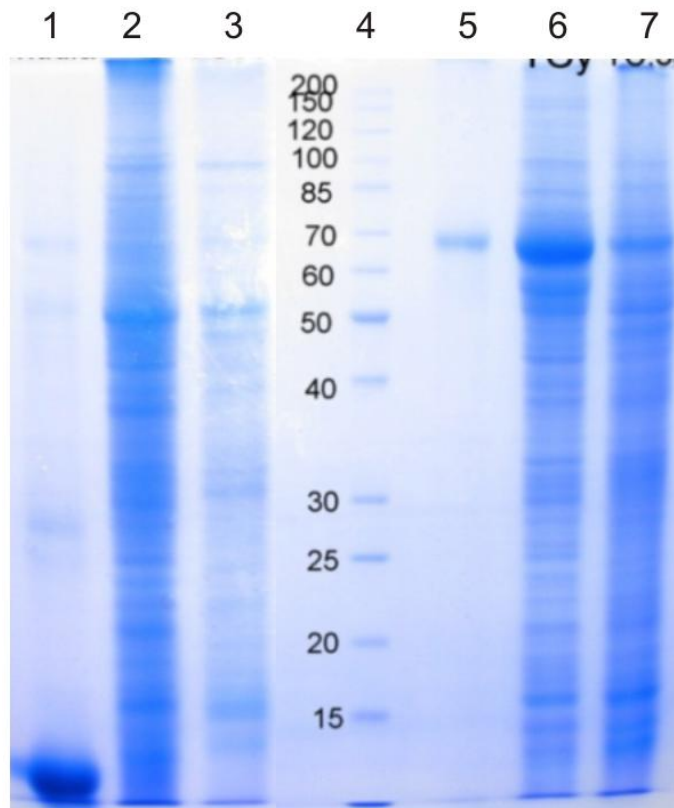


Figura 14: Gel de poliacrilamida con los extractos de los siguientes parásitos de izquierda a derecha (1.Crithidia, 2. T. rangeli, 3.T. cruzi I (cepa 339), T. cruzi I (cepa Silvio), T. cruzi II (cepa Y) y T. cruzi I (cepa 338)).

Los análisis de imágenes de las bandas obtenidas se consignan en la Tabla 15. De acuerdo a la tabla 15, fueron detectadas un total de 30 bandas en la cepa Y, en el rango comprendido entre 174 y 12 KDa. En la cepa 338 se detectaron 28 bandas entre 100 y 13 KDa. Se observan algunas diferencias en la cantidad y la intensidad de las bandas. La cepa Y presenta bandas más definidas y algunas con mayor intensidad. No se observaron bandas definidas de proteínas en la cepa 338 en el rango comprendido entre 200 y 100 KDa, mientras que en la cepa Y se detectaron cuatro bandas de proteínas en este rango. Se destaca la banda de aproximadamente 64 KDa que presenta gran intensidad en la cepa Y comparada con aquella presente en la cepa 338.

Proteínas en KDa obtenidas en SDS-page					
<i>Crithidia</i>	<i>T. rangeli</i>	<i>T.c 339</i>	<i>Silvio</i>	<i>T.c Y</i>	<i>T.c 338</i>
288.5	115.7	97.8	68.1	174.7	100.8
66.9	103.9	84.2	12.3	156.2	85.6
51.8	98.5	65.7		131.7	75.9
27.0	86.1	20.9		115.7	71.8
10.6	80.8	47.6		100.0	66.9
	75.2	43.6		84.2	59.5
	65.9	40.1		76.8	57.3
	49.3	36.8		64.5	51.8
	43.2	34.9		55.9	48.1
	40.0	32.4		51.4	44.7
	38.3	30.8		47.8	41.7
	32.3	24.4		45.6	39.1
	29.5	22.2		44.0	35.9
	27.4	19.7		39.0	34.1
	23.1	17.4		35.9	31.2
	22.1	15.3		33.5	28.3
	20.5	12.7		31.9	26.1
	19.4			31.2	24.9
	17.5			30.1	23.8
	15.7			28.1	22.6
	11.9			26.0	21.9
				25.1	21.4
				23.4	20.9
				22.0	19.3
				20.9	18.1
				19.1	16.7
				16.3	14.8
				14.5	13.1
				12.7	

Tabla 15. Masas moleculares (kDa) de las proteínas obtenidas para *Crithidia*, *T. rangeli*, *T. cruzi I* de referencia (339), *T. cruzi I*, *T. cruzi II* (Y) y *T. cruzi I* (338).

6.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS:

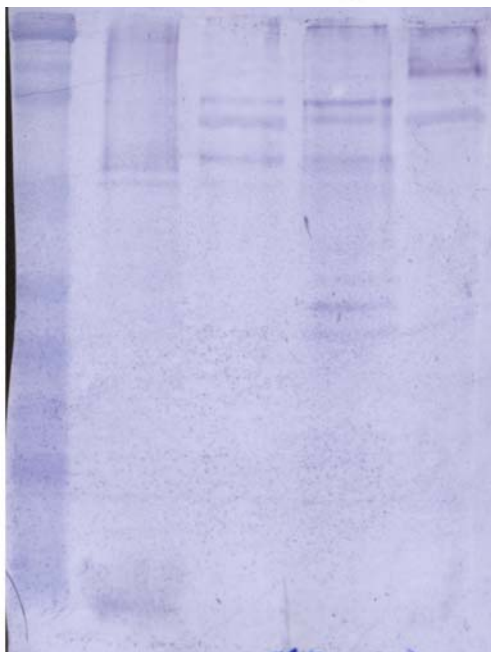
En cada uno de los ensayos realizados a continuación, se incubó un control negativo y un control positivo, con el cual se comprobó la ausencia de bandas en

aquellos pacientes sanos y la presencia de éstas en los pacientes enfermos. Estos controles demuestran la validez de los ensayos realizados y la efectividad del proceso de bloqueo de la membrana.

6.3.1 Inmunotransferencia utilizando antígenos de los 4 parásitos estudiados

Con el propósito de determinar el reconocimiento de bandas comunes que mostraran reacción cruzada con otros tripanosomátidos, se realizó una inmunotransferencia preliminar utilizando dos sueros, uno de un paciente sintomático y otro de un paciente asintomático. Estos sueros fueron incubados en presencia de los cuatro antígenos. (*T. cruzi I (cepa 338)*, *T. cruzi II (cepa Y)*, *Crithidia* y *T. rangeli*), como se muestra en la figura 15.

P.M T.c 338 T.c Y T. Rangeli Crithidia



P.M T.c 338 T.c Y T. Rangeli Crithidia

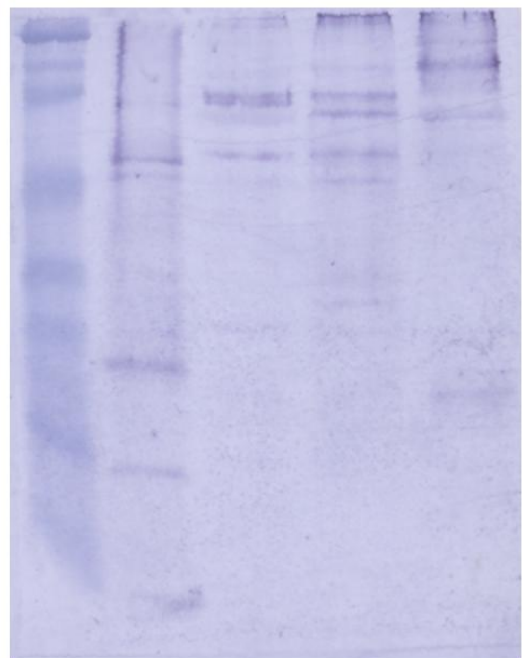


Figura 15. Izquierda, Inmunotransferencia con suero de paciente sintomático. Derecha, Inmunotransferencia con suero de paciente asintomático

<i>T.c</i> 338		<i>T.c</i> Y		<i>T.rangeli</i>		<i>Crithidia</i>	
A	S	A	S	A	S	A	S
68.9	185.9	69.8	68.9	121.0	68.6	125.8	138.9
58.8	158.4	68.9	58.0	74.5	65.8	81.2	108.3
54.8	135.4	58.9	54.8	67.2	58.3	66.8	65.8
26.5	68.5	54.1		59.8	56.1	24.4	
17.2	57.1	29.3		54.1	35.6		
	53.9			33.8	32.9		
				31.5	30.6		
				29.0			

Tabla 16. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomático (S) y asintomático (A) en presencia de diferentes tripanosomátidos.

La tabla 16 muestra que el *T. cruzi*, presenta proteínas comunes con el *T. rangeli* a 68, 65, 58, 54 y 29KDa y con *Crithidia* no presentan similitudes.

Es interesante observar que al incubar el suero del paciente sintomático en presencia de *T. cruzi* 338, éste reconoce proteínas de un peso molecular más alto, con relación a aquellas que reconoce el paciente asintomático con el mismo antígeno.

6.3.2 Inmunotransferencia con los antígenos de interés *T. cruzi* cepa Y y cepa 338

Se realizó la determinación de proteínas antigénicas a ciento cincuenta pacientes, 50 sintomáticos, 50 pacientes asintomáticos y 50 pacientes seronegativos. En las siguientes tablas se muestra, el grupo al que pertenece cada paciente, la absorbancia obtenida en la prueba de ELISA (valor indicativo de la presencia de anticuerpos contra el antígeno) y el número de identificación dado en este estudio.

Pacientes sintomáticos fase II			
Código	O. D	Código	O. D
1	1.18	35	0.868
2	0.75	109	0.33
28	1.013	110	0.35
29	1.292	111	0.829
30	0.914	114	1.163
31	0.966	139	0.703
32	0.858	146	0.392
33	0.648	147	1.021
34	1.05		

Tabla 17: Códigos y densidades ópticas obtenidas con la prueba de ELISA de pacientes chagásicos sintomáticos en fase II.

En la figura 16, Tablas 18 y 19 se presentan los resultados obtenidos para las reacciones antígeno-anticuerpo utilizando como antígeno la cepa Y y las proteínas reconocidas por los sueros de los diferentes pacientes sintomáticos en fase II. En ellas se observan diferentes perfiles proteínas reaccionantes. En este caso, se destacan aquellas proteínas que se encuentran en rangos menores a 70 kDa, las cuales fueron mayormente reconocidas por los pacientes (Ver Tabla 19).

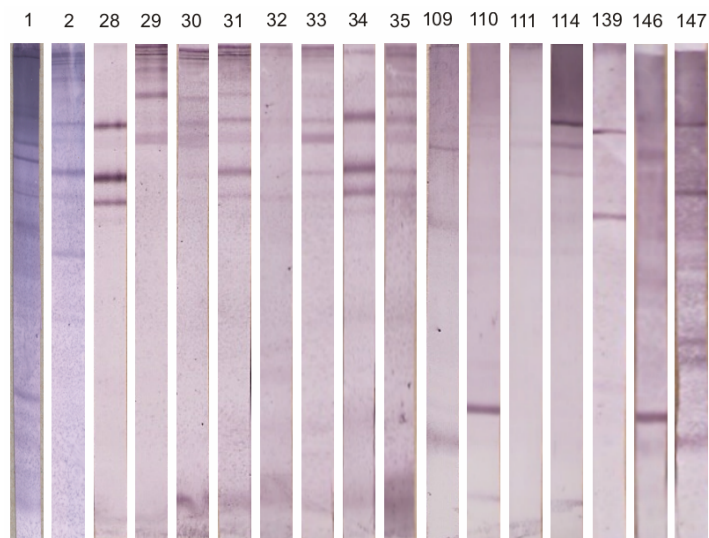


Figura 16. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes sintomáticos fase II con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente								
1	2	28	29	30	31	32	33	34
69.1	228.3	60.0	200.2	68.1	68.9	62.7	68.7	63.4
63.2	200.2	44.4	181.0	61.6	62.5	39.9	62.5	48.8
59.7	148.2	37.4	124.7	46.4	46.9		46.4	41.2
54.2	67.6		68.4		40.1			36.5
51.2	56.7							
43.0	50.8							
27.3	37.0							
21.6	30.1							

Tabla 18: Proteínas reconocidas por los pacientes sintomáticos fase II (1, 2, 28-34) con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente							
35	109	110	111	114	139	146	147
68.7	53.1	12.2	54.1	59.8	61.3	55.9	64.2
62.7	7.2			53.1	34.7	95.9	57.2
47.9				45.4	15.3		45.5
40.6							19.7
							16.9

Tabla 19. Proteínas reconocidas por los pacientes sintomáticos fase II (35, 109, 110, 111, 114, 139, 146 y 147) con la cepa Y.

En la figura 17, Tablas 20 y 21 se presentan los resultados obtenidos para las reacciones antígeno-anticuerpo utilizando como antígeno la cepa 338 y las proteínas reconocidas por los sueros de los diferentes pacientes sintomáticos en fase II. En ellas se destacan los resultados obtenidos para el paciente 2 y 110 en el cual se obtuvo una gran variedad de proteínas en el rango 7-180 KDa (Ver Tabla 20 y 21).

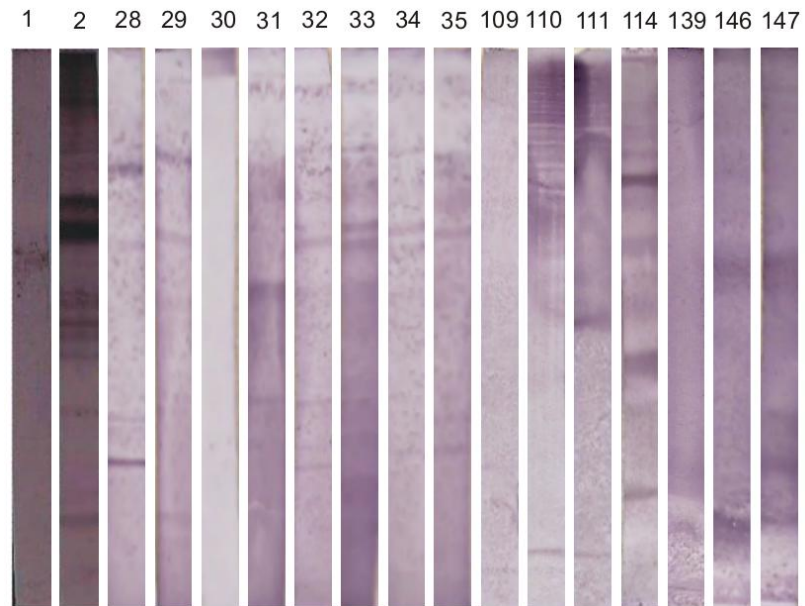


Figura 17: Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes sintomáticos fase II con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
1	2	28	29	30	31	32	33	34	
	130.2	56.7	59.0		33.4	40.2	61.8	60.9	
	105.7	40.2	42.4		19.4	19.1	43.5	43.3	
	66.3	17.5				10.7	39.7	38.9	
	56.9	11.9					19.6	11.7	
	49.5						14.7		
	35.3								
	34.3								
	32.3								
	31.0								
	29.2								
	25.0								
	9.90								

Tabla 20. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase II (1, 2, 28-34) con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente							
35	109	110	111	114	139	146	147
42.5		178.6	81.1	256.5		35.0	35.9
12.4		164.6	37.2	111.6		6.90	14.0
		138.4	6.90	72.7			6.90
		121.0		66.2			
		111.4		62.1			
		104.7		57.8			
		84.5		49.3			
		74.8		36.1			
		69.4		29.8			
		67.2		13.6			
		65.4					
		7.28					

Tabla 21. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase II (35, 109, 110, 111, 114, 139, 146, 147) con la cepa 338.

Pacientes sintomáticos fase III			
Código	O. D	Código	O. D
5	1.22	27	0.866
6	0.77	105	0.739
7	2.1	112	1.366
21	0.973	126	1.08
22	0.522	127	0.62
23	0.658	140	1.119
24	0.927	141	1.012
25	1.04	142	0.888
26	1.095		

Tabla 22. Pacientes sintomáticos fase III, códigos y densidad óptica.

En la figura 18, Tablas 23 y 24 se presentan los resultados obtenidos para las reacciones antígeno-anticuerpo utilizando como antígeno la cepa Y y las proteínas reconocidas por los sueros de los diferentes pacientes sintomáticos en fase III. Se destaca la presencia de proteínas de pesos inferiores a 70KDa.

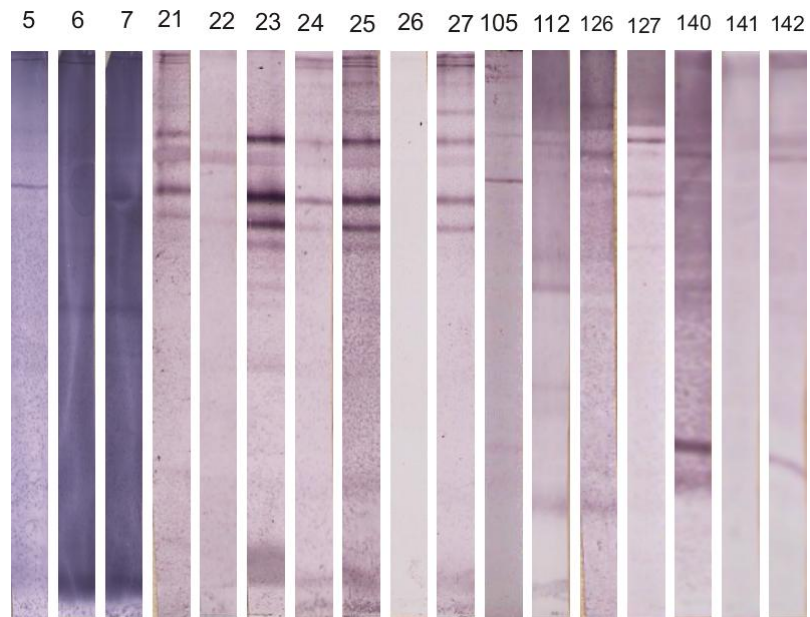


Figura 18. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes sintomáticos fase III con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente								
5	6	7	21	22	23	24	25	26
69.4	59.4	56.7	190.5	40.1	60.5	213.8	209.4	
59.0	34.7	34.5	61.9		45.4	171.6	176.3	
		29.7	48.5		39.2	90.8	109.7	
			41.0		35.1	60.0	67.4	
					30.2	44.9	60.3	
					27.7	38.3	44.9	
					21.6		38.3	
							34.8	

Tabla 23. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase III (5-7, 21-26) con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente							
27	105	112	126	127	140	141	142
231.5	68.7	63.2	67.7	63.9	64.2		64.6
181.0	62.4	59.8	63.1	60.2	60.9		60.6
67.4	60.5	33.9	56.9	57.1	35.0		9.34
60.5		30.4	50.4	45.7	32.8		
45.4		21.8	11.5	34.4	11.9		
38.3			7.13		6.90		

Tabla 24. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase III (27, 105, 112, 126, 127, 140-142) con la cepa Y.

En la figura 19, Tablas 25 y 26 se presentan los resultados obtenidos para las reacciones antígeno-anticuerpo utilizando como antígeno la cepa 338 y las proteínas reconocidas por los sueros de los diferentes pacientes sintomáticos en

fase III. Al igual que los resultados obtenidos para estos pacientes con la cepa Y, aparecen proteínas de pesos inferiores a 70 KDa, especialmente se destacan los polipéptidos reconocidos entre 30 y 40 KDa, los cuales mostraron mayor reconocimiento.

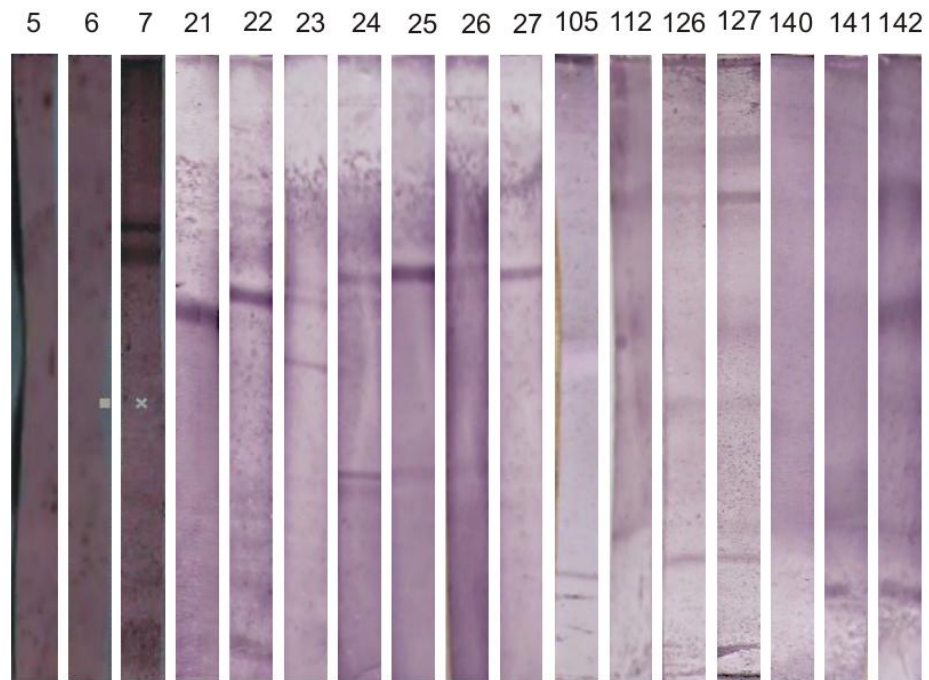


Figura 19. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes sintomáticos fase III con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
5	6	7	21	22	23	24	25	26	
		56.9	34.4	36.3	38.2	39.2	40.2		17.4
		50.8			35.9	16.9	16.9		
					29.5				

Tabla 25. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase III (5-7, 21-26) con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente							
27	105	112	126	127	140	141	142
58.3	8.50	62.2	84.3	81.2			54.7
40.6		17.1	69.3	69.6			33.7
			67.8	68.1			
			62.8	62.9			
			30.2	13.4			
			12.4				

Tabla 26. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase III (27, 105, 112, 126, 127, 140-142) con la cepa 338.

Pacientes sintomáticos fase IV			
Código	O. D	Código	O. D
3	1.2	41	0.771
4	0.77	42	0.975
8	1.7	103	1.709
36	1.011	104	1.959
37	0.802	113	1.176
38	1.081	117	1.321
39	1.513	122	1.323
40	1.116	124	1.59

Tabla 27. Pacientes sintomáticos fase IV, códigos y densidad óptica.

En la figura 20, Tablas 28 y 29 se presentan los resultados obtenidos para las reacciones antígeno-anticuerpo utilizando como antígeno la cepa Y y las proteínas reconocidas por los sueros de los diferentes pacientes sintomáticos en fase IV. Las proteínas reconocidas presentan un patrón de peso molecular similar a las obtenidas para los otros grupos de pacientes sintomáticos (II y III) y el nivel de reactividad de los sueros fue similar para los pacientes analizados.

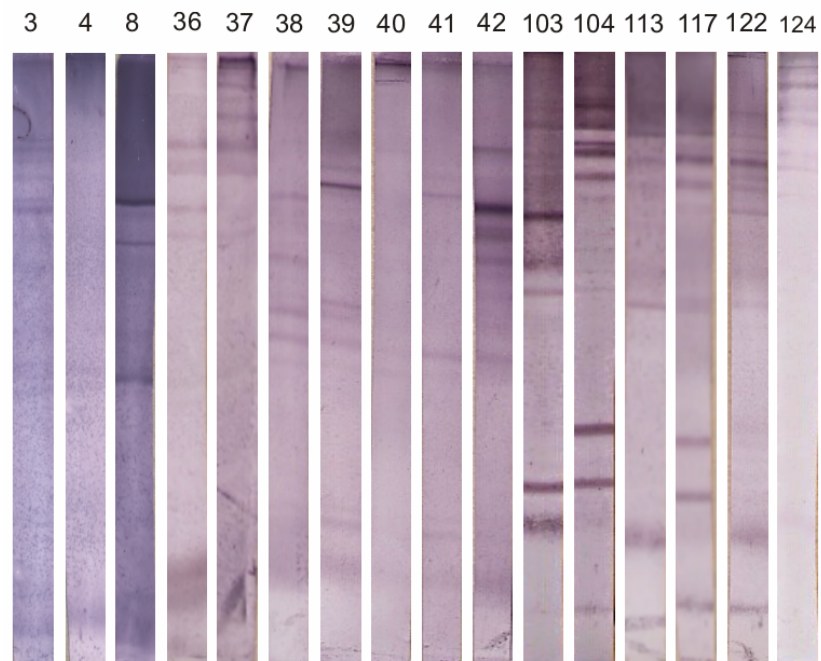


Figura 20. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes sintomáticos fase IV con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente							
3	4	8	36	37	38	39	40
69.1		58.0	62.3	124.7	207.5	63.7	
67.3		50.4	47.6	68.3	58.8	60.7	
65.1		34.5	40.9	62.3	47.3	39.2	
62.3		29.7			37.5	37.2	
58.4					34.1	34.1	
57.0						12.6	
30.6							
58.6							

Tabla 28. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase IV (3, 4, 8, 36-42) con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente							
41	42	103	104	113	117	122	124
59.3	65.9	84.5	133.6	63.6	249.5	63.8	174.7
32.9	57.1	56.4	86.7	59.1	62.7	58.0	106.4
	52.2	46.6	68.4	53.4	57.9	54.8	68.4
	47.1	40.4	66.8	33.9	52.2	52.4	65.7
	32.7	14.5	63.4	30.7	31.5	45.8	59.1
		7.89	59.8		30.3	31.2	55.8
			41.4		19.5	7.13	
			24.3		12.4		
			14.7				

Tabla 29. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase IV (41, 42, 103, 104, 113, 117, 122, 124) con la cepa Y.

En las figuras 21, Tablas 30 y 31 se presentan los resultados obtenidos para las reacciones antígeno-anticuerpo utilizando como antígeno la cepa 338 y las proteínas reconocidas por los sueros de los diferentes pacientes sintomáticos en fase IV. Se observa un nivel de reactividad menor, al obtenido con la cepa Y. Se destaca la cantidad de bandas reconocidas por el paciente 124 en el rango de .78 a 11KDa.

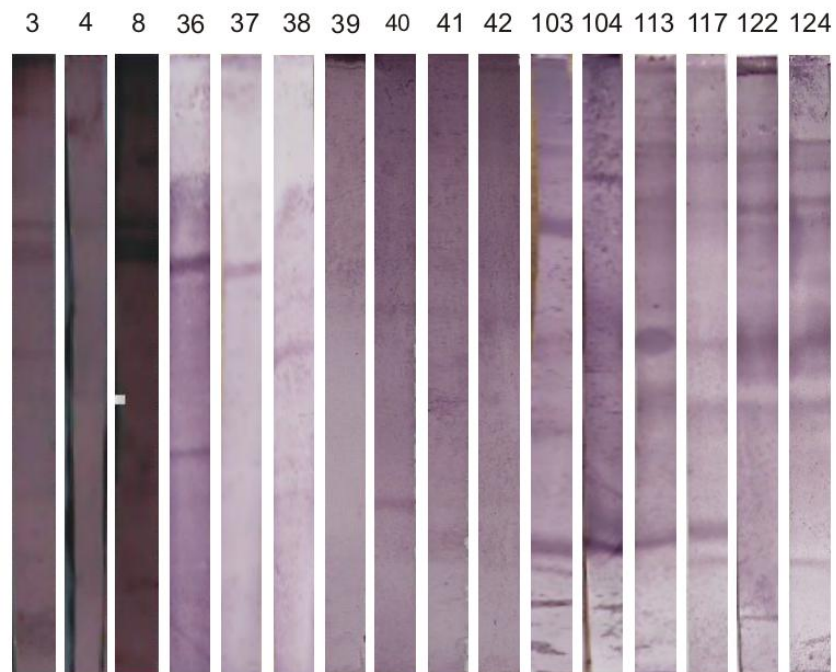


Figura 21. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes sintomáticos fase IV con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente							
3	4	8	36	37	38	39	40
56.4	56.4	56.9	41.0	40.3	30.3		36.3
50.1		51.1	18.3				12.3
33.1		8.7					

Tabla 30. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase IV (3, 4, 8, 36-40) con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente							
41	42	103	104	113	117	122	124
	34.1	66.5	62.3	145.6	68.6	68.7	78.2
		53.9	12.1	106.0	35.3	61.2	67.1
		33.6		71.3	29.1	58.2	62.4
		26.6		68.3	16.5	35.7	59.7
		12.1		29.9	11.5	30.2	36.3
		8.49		14.4			33.4
							30.0
							11.0

Tabla 31. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes sintomáticos fase IV (41, 42, 103, 104, 113, 117, 122, 124) con la cepa 338.

Pacientes Asintomáticos					
Código	O. D	Código	O. D	Código	O. D
9	1.077	53	1.123	95	0.820
10	0.485	54	1.318	96	0.803
11	0.860	55	0.721	97	0.428
12	0.730	56	1.371	98	0.685
13	0.980	57	0.706	99	0.404
14	0.600	58	0.998	100	1.084
15	0.820	59	0.990	101	0.669
43	0.938	60	0.456	102	0.798
44	0.331	61	0.534	115	0.354
45	0.794	62	0.308	116	0.979
46	0.800	63	1.030	118	0.801
47	0.801	64	0.850	119	0.959
48	1.290	65	0.627	125	0.781
49	0.659	91	0.664	148	1.553
50	0.761	92	1.228	149	0.115
51	0.556	93	1.210	150	1.050
52	0.875	94	1.023		

Tabla 32. Pacientes asintomáticos, códigos y densidad óptica.

En las figuras 22-24, Tablas 33-37 se presentan los resultados obtenidos para las reacciones antígeno-anticuerpo utilizando como antígeno la cepa Y y las proteínas reconocidas por los sueros de los diferentes pacientes asintomáticos. Se observa gran variabilidad en la cantidad de bandas reconocidas por los pacientes. Al igual que en los pacientes sintomáticos se destaca la presencia de las proteínas ubicadas en el rango de 7 a 70KDa. Dentro del grupo de pacientes analizados, sobresalen los pacientes identificados entre los códigos 91-102, por el nivel de reactividad que presentan. Especialmente se destacan las proteínas ubicadas en el rango de peso entre 60 y 70KDa, las cuales aparecen en todos los pacientes identificados con estos códigos.

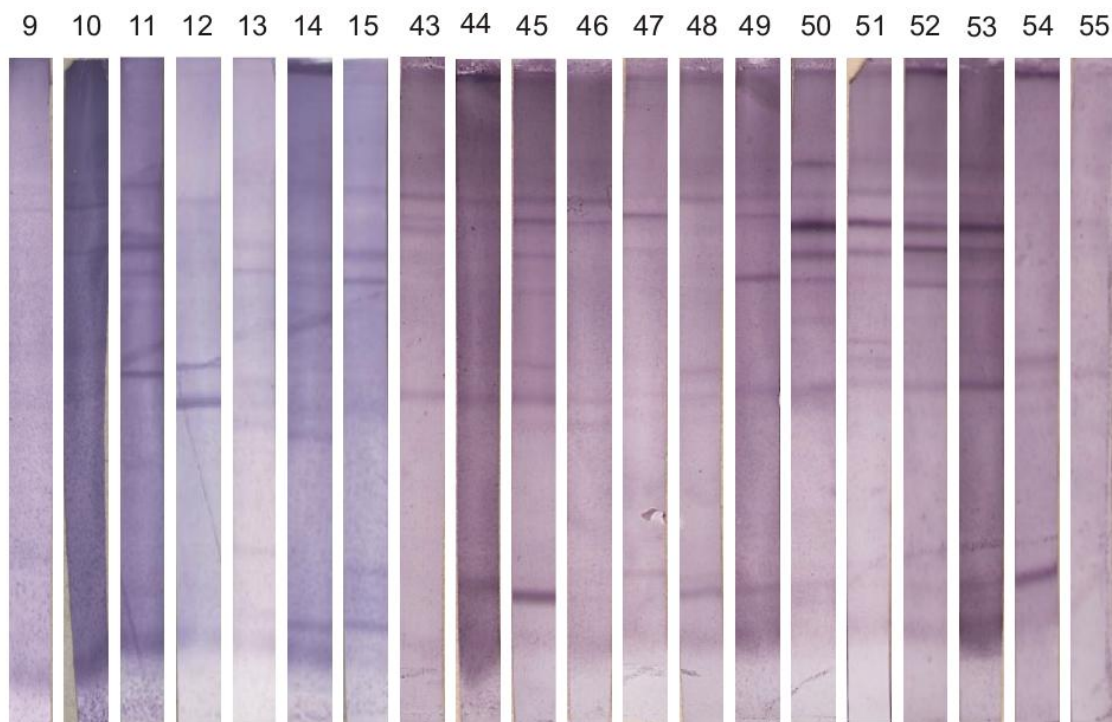


Figura 22. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes asintomáticos (9-15, 43-55) con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente										
9	10	11	12	13	14	15	43	44	45	
	60.4	67.7	64.6	57.5	56.6	223.7	62.1	61.3	61.7	
	53.4	59.5	59.8	53.0	51.4	191.9	59.1	32.2	58.6	
	35.6	57.5	35.1	33.9	45.9	67.4	56.9	13.7	53.1	
	31.9	52.7	31.6	31.7	43.6	56.6	32.4		46.5	
		34.3		29.7	31.4	51.0			34.9	
		11.3		17.7	28.8	14.7			32.3	
					6.9	10.5			30.2	
						6.9			11.4	

Tabla 33. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (9-15, 43-45) con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
61.3	59.7	199.4	62.1	212.9	62.7	212.9	66.4	35.1	34.0
57.9	54.2	61.9	59.5	66.5	57.9	62.6	62.3	33.0	
	31.1	34.2	48.8	62.6	53.6	60.1	59.5	31.2	
	15.5	12.9	32.5	57.9	37.5	57.9	57.8	15.5	
			13.7	53.4	34.8	55.8	53.8		
				48.3	32.6	54.7	47.9		
				41.1		47.7	32.6		
				32.6		32.7			
				14.5					

Tabla 34. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (46-55) con la cepa Y.

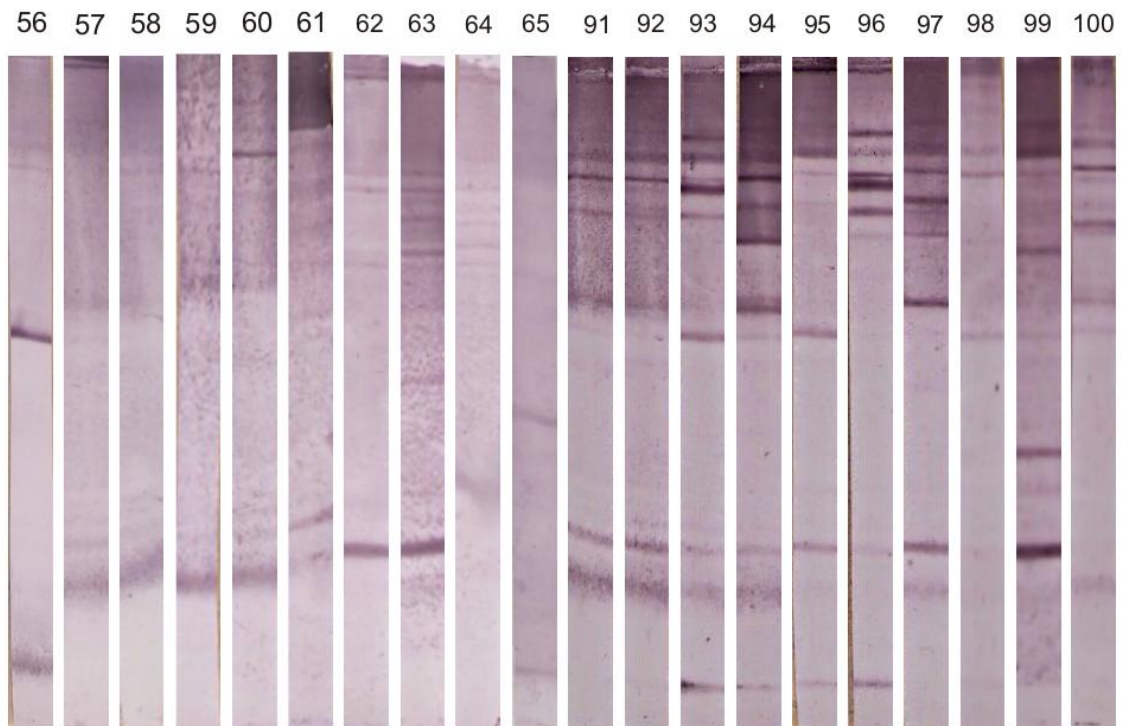


Figura 23. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes asintomáticos (56-65, 91-100) con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
64.4	30.9	63.7	7.9	62.6	14.3	205.0	62.2	65.2	63.7
60.5	12.4	60.6		8.6	9.9	62.2	59.5	59.5	36.4
30.7	7.6	7.8				59.1	56.8	52.9	8.7
						43.4	53.8	47.4	
						10.3	46.2	44.1	
							27.9	41.2	
							10.6		

Tabla 35. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (56-65) con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
69.0	95.5	80.1	65.6	68.9	91.5	69.5	196.1	69.0	105.9
65.4	68.4	68.2	61.4	67.5	69.4	66.4	141.6	66.6	71.9
60.2	65.4	66.9	55.8	66.1	67.6	62.3	69.4	63.3	66.7
43.7	60.3	65.4	44.6	38.9	66.1	60.5	66.1	54.0	65.2
15.3	43.5	63.8	42.9	14.1	64.4	56.9	62.3	38.5	58.6
7.7	14.4	59.8	38.3		60.5	44.1	38.5	27.0	44.1
	7.1	37.9	13.9		57.4	14.4		23.3	7.9
		13.9						13.4	

Tabla 36. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (91-100) con la cepa Y.

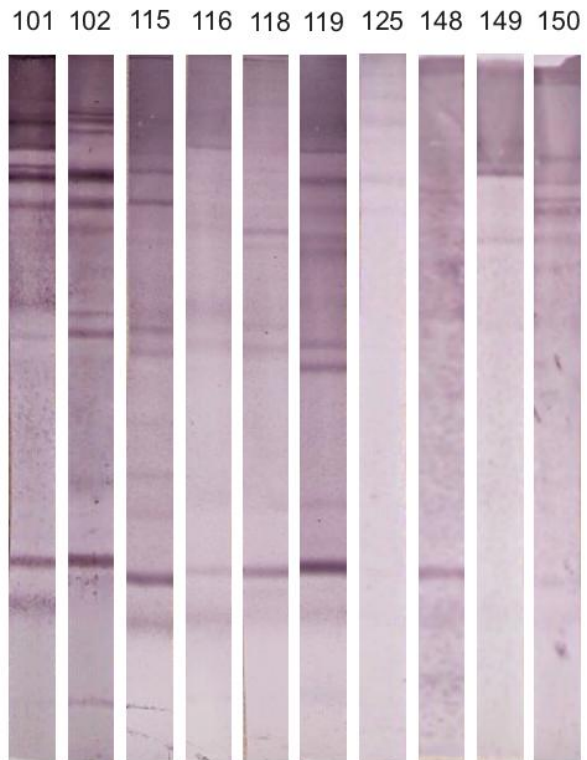


Figura 24. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes asintomáticos (101,102, 115, 116, 118, 119, 125, 148-150) con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
101	102	115	116	118	119	125	148	149	150
118.5	136.2	59.6	31.2	47.5	63.8	97.8	64.2	60.2	68.7
73.9	121.0	53.1	30.6	32.7	58.0	68.1	57.2	58.3	65.6
67.6	98.5	44.9	12.1	30.9	52.9	57.4	45.5	10.4	62.8
66.0	66.3	32.5	6.9	11.8	46.3		19.7		50.2
62.3	62.4	30.5			43.8		16.9		
53.2	58.9	21.9			31.3				
45.4	53.6	18.8			29.3				
40.2	43.9	11.5			12.0				
14.1	40.3				7.7				
7.8	14.3								

Tabla 37. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (101, 102, 115, 116, 118, 119, 125, 148-150) con la cepa Y.

En las figuras 25-27 y tablas 38-42 se presentan los resultados obtenidos para las reacciones antígeno-anticuerpo utilizando como antígeno la cepa 338 y las proteínas reconocidas por los sueros de los diferentes pacientes asintomáticos. Se observa que la cantidad de bandas reconocidas con esta cepa es significativamente menor, comparada con aquellas identificadas con la cepa Y. Sin embargo, es interesante los resultados obtenidos con los pacientes 91, 56 y 116, los cuales reconocen mayor cantidad de proteínas con la cepa 338 y no comparten proteínas antigénicas con la cepa Y (ver tabla 40, 41 y 42).

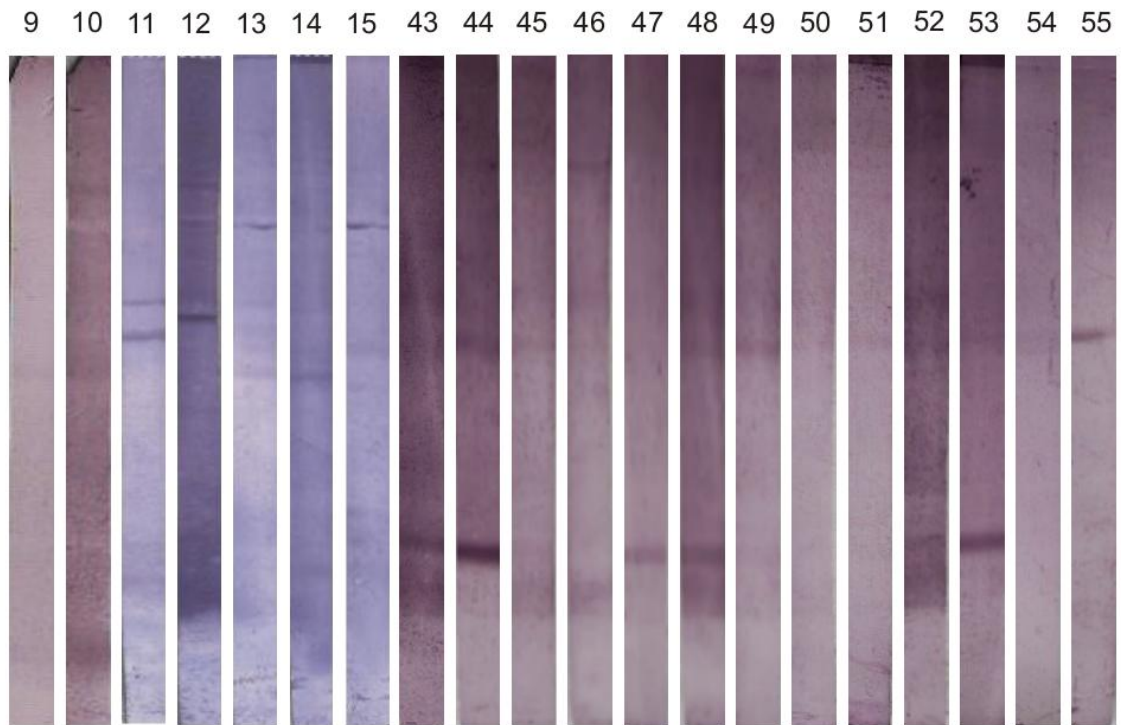


Figura 25. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes asintomáticos (9-15, 43-55) con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente										
9	10	11	12	13	14	15	43	44	45	
33.5	62.4	40.6	62.9	55.3	31.2	55.7	11.9	34.6	34.0	
	56.3	34.7	56.9	40.9		52.7		11.1		
	34.1	15.2	38.7	36.4		33.9				
	7.1			31.4		30.2				
						20.2				

Tabla 38. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos fase II (9-15, 43-45) con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
64.7	11.8	34.4	68.4	68.1	34.8	13.4	35.2		35.6
		11.7	34.3	34.6			12.9		

Tabla 39. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (46-55) con la cepa 338.

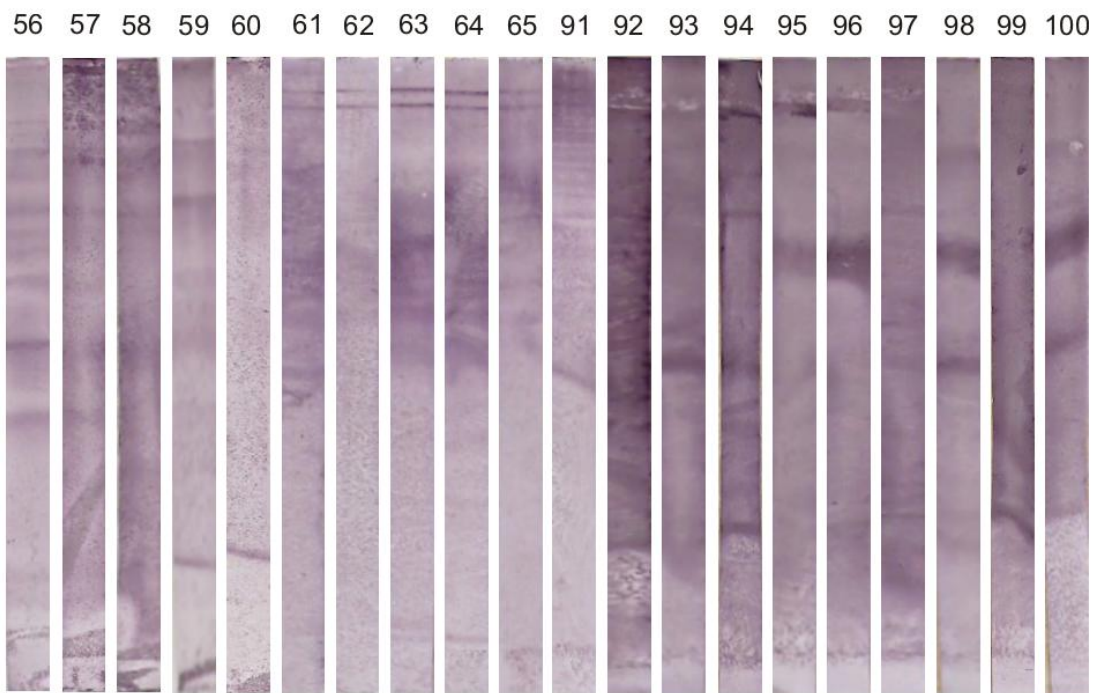


Figura 26. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes asintomáticos (56-65, 91-100) con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
117.3	61.3		82.8	15.2	220.5	178.6	180.9	173.9	178.6
94.2	29.9		71.3		169.2	146.8	144.6	142.5	144.6
71.3			63.1		138.4	61.8	53.6	53.8	65.9
62.4			60.0		49.5	60.1	52.2	52.2	64.4
58.7			13.6		36.9		49.9	50.1	62.1
55.5							8.76		52.2
49.4									
37.1									
30.0									

Tabla 40. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (56-65) con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
220.5	10.2	30.9	63.4	45.9	44.5	56.3	66.9	21.7	49.8
183.3			55.7			23.6	46.9	13.4	32.9
146.8			30.5			18.3	30.5		14.9
110.0			12.9			16.4			
92.9						14.4			
83.4						10.2			
75.8									
68.9									
67.4									
36.7									

Tabla 41. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (91-100) con la cepa 338.

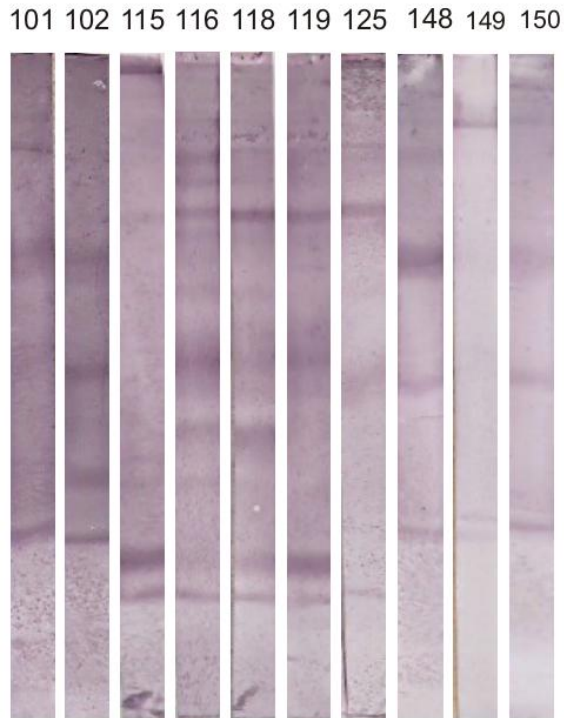


Figura 27. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes asintomáticos (101, 102, 115, 116, 118, 119, 125, 148-150) con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
101	102	115	116	118	119	125	148	149	150
114.2	48.1	61.6	109.7	69.7	70.0	78.2	86.9	81.3	47.8
49.3	31.2	17.3	69.0	66.5	61.4	69.6	66.7	18.9	30.9
17.6	23.2	11.5	65.9	61.4	16.5	67.8	47.8	16.6	18.1
	16.4		61.8	29.3	10.8	62.8	30.4		
			58.6	16.2		30.2	17.4		
			35.0	11.2		12.4			
			29.7						
			11.5						

Tabla 42. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes asintomáticos (101, 102, 115, 116, 118, 119, 125, 148-150) con la cepa 338.

Pacientes Seronegativos					
Código	O. D	Código	O. D	Código	O. D
16	0.061	78	0.074	121	0.057
17	0.100	79	0.047	123	0.069
18	0.120	80	0.085	128	0.043
19	0.180	8	0.055	129	0.075
20	0.220	82	0.054	130	0.078
66	0.088	83	0.087	131	0.067
67	0.088	84	0.092	132	0.077
68	0.070	85	0.086	133	0.048
69	0.101	86	0.077	134	0.051
70	0.131	87	0.045	135	0.036
71	0.180	88	0.093	136	0.028
72	0.131	89	0.065	137	0.084
73	0.088	90	0.084	138	0.094
74	0.066	106	0.088	143	0.069
75	0.064	107	0.131	144	0.039
76	0.129	108	0.18	145	0.063
77	0.160	120	0.026		

Tabla 43. Pacientes seronegativos, códigos y densidad óptica.

En las figuras 28-30, y Tablas 44-48 se presentan los resultados obtenidos para las reacciones antígeno-anticuerpo utilizando como antígeno la cepa Y y las proteínas reconocidas por los sueros de los diferentes pacientes seronegativos. Se presentan bandas en la mayoría de los pacientes analizados, principalmente en aquellos identificados con los códigos 16, 72, 78, 80, 85, 86, 106, 130, 138 y 144.

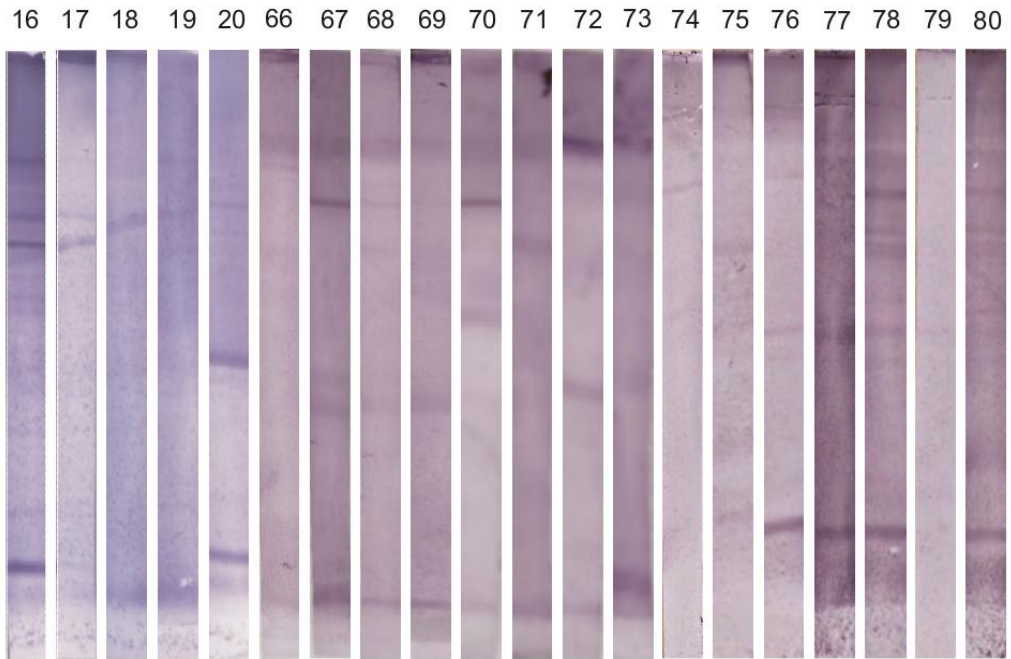


Figura 28. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes seronegativos (16-20, 66-80) con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente										
16	17	18	19	20	66	67	68	69	70	
62.6	63.2	57.5	7.3	33.7	85.7	63.7	83.4	32.9	63.5	
57.5		34.8			69.1	36.1	63.7	9.6	44.7	
50.5		7.3				32.5	10.3		9.2	
34.8						11.2				
32.4										
28.4										
12.7										

Tabla 44. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (16-20, 66-70) con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
57.5	84.5	67.7	58.4		10.9	32.8	56.9		57.9
8.7	67.1	63.9				9.7	50.2		50.7
	64.5	35.1					46.5		35.0
	34.4	8.0					35.6		33.3
	8.5						33.2		31.9
							10.0		10.2

Tabla 45. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (71-80) con la cepa Y.

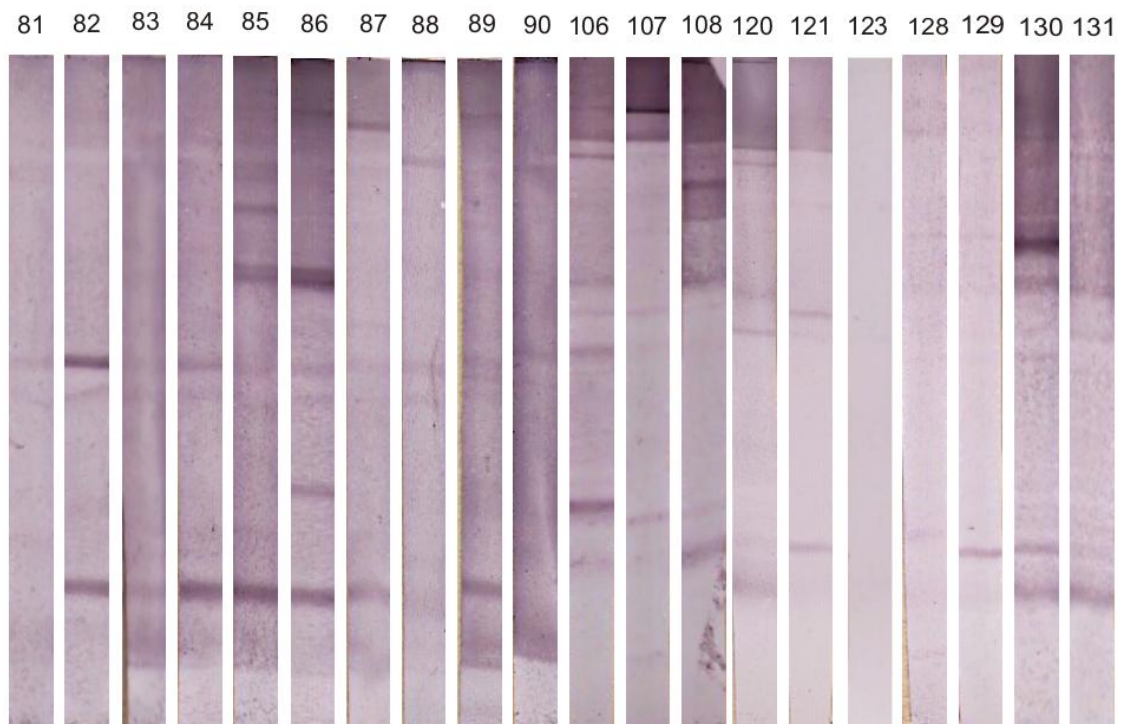


Figura 29. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes seronegativos (81-90, 106-108, 120, 121, 123, 128-131) con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
	33.4	8.70	33.3	65.2	114.5	89.4	66.2	33.8	65.6
	9.7		8.10	63.3	47.5	38.1		32.3	34.2
				58.7	44.9	33.6		9.40	
				47.5	33.3	8.80			
				45.1	30.7				
				8.60	23.4				
					8.10				

Tabla 46. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (81-90) con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
106	107	108	120	121	123	128	129	130	131
151.4	148.8	64.4	63.9	63.8		43.6	11.2	65.5	34.3
84.5	82.3	59.7	60.7	32.9				49.0	31.4
68.6	69.5	48.4	31.4	11.9				41.1	16.8
67.2		7.3	7.6					34.7	11.6
47.9								12.1	
35.9								6.90	
19.0									

Tabla 47. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (106-108, 120, 121, 123, 128-131) con la cepa Y.

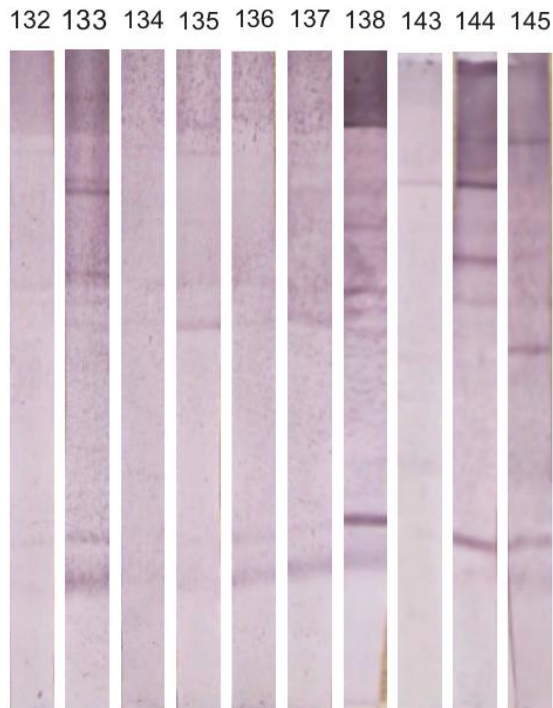


Figura 30. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes seronegativos (132-138, 143-145) con la cepa Y.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
132	133	134	135	136	137	138	143	144	145
33.9	55.4		66.1	11.3	8.10	66.7	59.5	67.7	67.3
	53.4		61.8	7.2		44.0		61.9	30.4
	34.4		33.5			32.7		58.9	8.40
	31.6		29.4			30.8		43.0	
	29.4					28.6		35.2	
	10.9					12.8		8.3	
						8.4			

Tabla 48. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (132-138, 143-145) con la cepa Y.

En las figuras 31-33, y Tablas 49-53 se presentan los resultados obtenidos para las reacciones antígeno-anticuerpo utilizando como antígeno la cepa 338 y las proteínas reconocidas por los sueros de los diferentes pacientes seronegativos. Al igual que con la cepa Y se presentan algunas bandas, sin embargo la cantidad es menor y tan sólo los pacientes 16, 87 y 138 reconocen más de 5 proteínas.

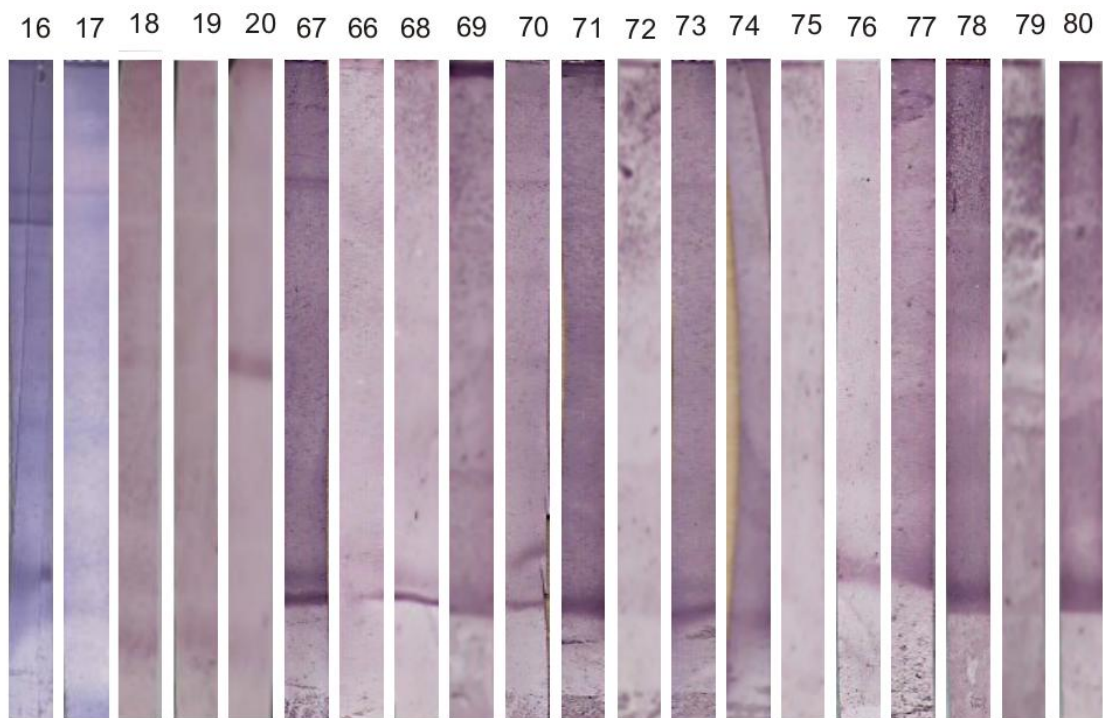


Figura 31. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes seronegativos (16-20, 67-80) con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
16	17	18	19	20	66	67	68	69	70
62.6	63.2	57.5	7.25	33.7		63.7	7.50		
57.5		34.8				13.2			
50.5		7.30				10.1			
34.8									
32.4									
28.4									
12.7									

Tabla 49. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (16-20, 66-70) con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
9.21		8.49	7.91						9.52

Tabla 50. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (71-80) con la cepa 338.

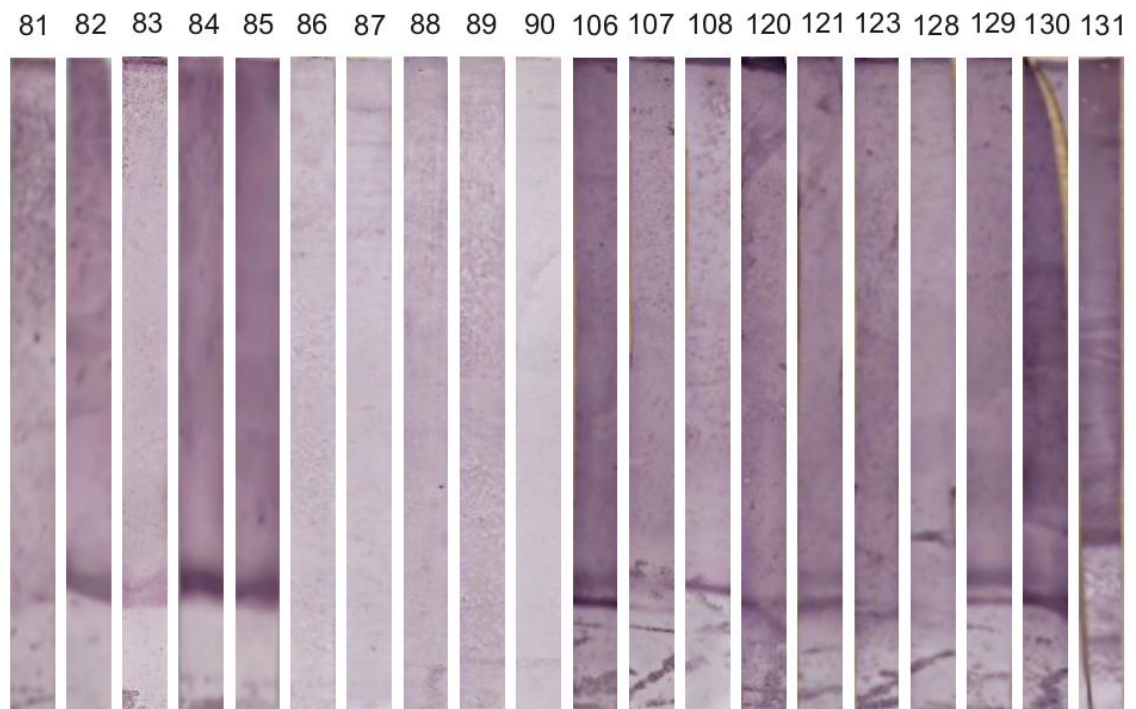


Figura 32. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes seronegativos (81-90, 106-108, 120, 121, 123, 128-131) con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente										
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	
	9.84		9.52	9.35		134.3		185.7	144.6	
						92.9		146.8	94.3	
						66.5				
						64.3				
						60.8				

Tabla 51. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (81-90) con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
106	107	108	120	121	123	128	129	130	131
11.8	12.15	11.7	9.55	12.6	9.22		13.11	43.1	16.0
8.49	8.56			9.22	7.23		9.71	32.3	
								9.9	

Tabla 52. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (106-108, 120, 121, 123, 128-131) con la cepa 338.

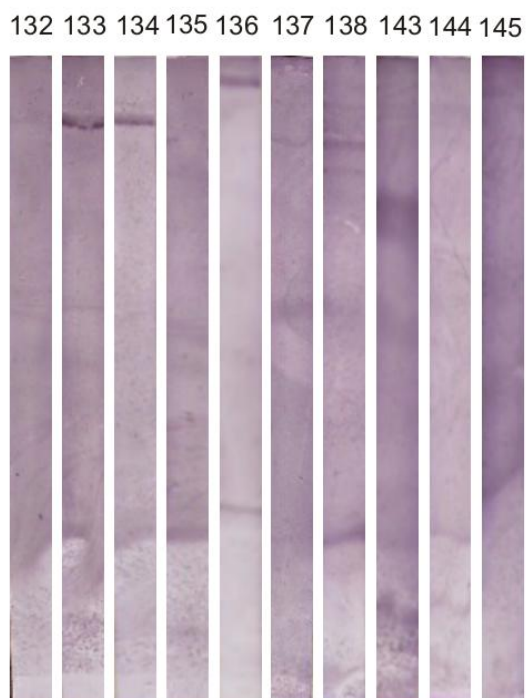


Figura 33. Bandas obtenidas por inmunotransferencia al incubar los pacientes seronegativos (132-138, 143-145) con la cepa 338.

Proteínas en KDa reconocidas por cada paciente									
132	133	134	135	136	137	138	143	144	145
	82.7 36.5	86.9	15.8	183.8 18.9	35.0	143.7 102.9 66.7 62.1 13.2	53.1		

Tabla 53. Proteínas en KDa reconocidas por los pacientes seronegativos (132-138, 143-145) con la cepa 338.

Porcentajes de reconocimiento en cada grupo de pacientes

Proteínas KDa	Asintomáticos		Sintomáticos		Seronegativos	
	Cepa y	Cepa 338	Cepa y	Cepa 338	Cepa y	Cepa 338
256				2		
249			2			
232			2			
228			2			
224	2					
220		4				
213	4		2			
207-209			4			
205	2					
200	2					
196	2					
192	2					
183		2			4	
179-181		6	4			
179				2		
175-176			4			
174		2				
169		2				
165				2		
151					2	
148-149					2	
145-147		8	2	2		
144						6
143		2				
141-142	2					
138		2		2		
133-136	2	2	2		2	
130				2		
125			4			
121	2			2		
116-118	2	2				
114		2				2
112				4		
110		4	2			
105-106	2		2	6		
103						2
98-99	4					
96	2					
94		4				4
91	2		2			
87-88		2	2		2	2
84-85			2	4	10	

Porcentajes de reconocimiento en cada grupo de pacientes

Proteínas KDa	Asintomáticos		Sintomáticos		Seronegativos	
	Cepa y	Cepa 338	Cepa y	Cepa 338	Cepa y	Cepa 338
80-83	2	6		4	4	2
78		4		2		
72-74	4					
75				2		
71-74		4		2		
69-70	14	10	14	10	6	
68	14	6	14	6	4	
66-67	30	12	8	6	8	
65	2	2	8	8	12	
62-64	48	20	44	14	26	14
59-61	54	14	40	8		2
58	20		8	6	10	
55-57	18		14	8	6	4
56	14		8	6		
53-54	32	6	10	2	2	2
52		6	12			
51	4		12	6	6	2
50		12	6		6	2
49	4			4	2	
47-48	8	8	4		8	
46		2	18		2	2
45	16		10		6	
43-44	20	2	4	8	6	4
41	4	4	18	14	4	
39-40	8	2	4	2		
38	8		6	4	2	
37	2	10	10		2	
36	4			20	4	2
34-35	16	24	16	16	22	8
31-33	60	12	8	2	32	4
29-30	12	16	14	20	8	2
27-28	4		4	2		2
23-24	2	4	2	2	2	
21-22	2	2	10	6		
18-20	4	10		14	2	2
15-17	12	20		14	2	4
13-14	22	12		26	2	10
11-12	24	18	10	26		
10		6		6	32	20
7-8	26	2	14	14	20	14

Tabla 54. Frecuencia de reconocimiento de los tres grupos de pacientes con los dos antígenos (cepa Y y cepa 338).

La siguiente tabla compara el número de bandas obtenidas por cada grupo de pacientes en presencia de cada cepa estudiada:

Número de bandas reconocidas por cada grupo de pacientes												
Número de bandas	Asintomáticos				Sintomáticos				Seronegativos			
	Cepa y		Cepa 338		Cepa y		Cepa 338		Cepa y		Cepa 338	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
0	5	10	10	20	1	2	3	6	6	12	15	30
1	3	6	7	14	2	4	13	26	11	22	18	36
2	6	12	13	26	3	6	9	18	8	16	11	22
3	9	18	7	14	8	16	10	20	6	12	2	4
4	6	12	2	4	8	16	6	12	7	14	1	2
5	6	12	5	10	3	6	3	6	2	4	2	4
6	7	14	2	4	6	12	3	6	9	18		
7	2	4				14	1	2	1	2	1	2
8	5	10	1	2	7	14	1	2				
9	1	2			2	4	1	2				
10			1	2	2	4						
11			1	2								
12			1	2								
13					1	2						

Tabla 55. Frecuencia de bandas reconocidas por los grupos de pacientes analizados por inmunotransferencia.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La enfermedad del Chagas, producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*, del cual se conocen dos tipos *T. cruzi I* y *II*, representa un problema de salud pública en el centro y sur de América. Cerca de 20 millones de personas están en la fase crónica de la enfermedad y aproximadamente 100 millones están en riesgo de infección. En Colombia el *T. cruzi I* como el grupo predominante (Ruiz-García 2000, Montilla 2002, Cuervo 2002, Rodríguez 2002). En estudios realizados en el departamento de Santander, se encontró que todos pertenecen al grupo *T. cruzi I* (Devia 1999, Jaramillo 2004).

El estudio comparativo de proteínas antigénicas de cepas de *Trypanosoma cruzi* de la región nororiental de Colombia, representa la primera aproximación al establecer una expresión diferencial entre los dos grupos de parásitos y al determinar cuáles proteínas son inmunodominantes con uso potencial en diagnóstico y en inmunización. Este estudio será continuado, por medio de electroforesis bidimensional de los dos tipos de parásitos, con la posibilidad de secuenciar estas proteínas, identificar sus funciones en bases de datos; purificarlas, definir su posible rol en la infección, usarlas en diagnóstico o producir proteínas recombinantes.

El primer análisis comparativo realizado en este trabajo correspondía a la determinación del perfil proteico de cada cepa analizada, utilizando geles de poliacrilamida SDS-PAGE, teñidos con azul de coomasie. Los resultados obtenidos al realizar este análisis, demostraron que existe gran similitud entre los patrones electroforéticos de las dos cepas, se observan bandas bien definidas y ruido de fondo (barrido), el cual puede ser producto de la gran cantidad de glicoproteínas (GP) que componen el parásito. Las GP exhiben migraciones

anormales en SDS-PAGE debido a los grupos hidrofílicos que poseen, los cuales reducen la interacción hidrofóbica entre la proteína y el SDS. Además, proteínas que contengan grupos muy ácidos, presentan repulsión con el SDS y las proteínas que contienen grupos muy básicos tienen baja movilidad electroforética, debido a la reducción en la relación carga/masa del complejo SDS/polipéptido como resultado de la alta proporción de aminoácidos básicos (Qinwei 1998).

En total fueron detectadas 30 bandas de proteínas en la cepa Y, en el rango comprendido entre 174 y 12 KDa, en la cepa 338 se detectaron 28 bandas entre 100 y 13 KDa. Sin embargo, no podemos afirmar que en el rango de 100-200KDa no se presentan bandas en la cepa 338, puesto que esto puede deberse a diferencias en la expresión de estas proteínas en cada cepa, del mismo modo, las diferencias en intensidad puede ser producto de sutiles diferencias en la concentración de las muestras.

Los resultados obtenidos en este análisis son consistentes con el estudio realizado por Lima y col. quienes encontraron 30 bandas entre 205 y 14 KDa (Lima 2001) al realizar el perfil proteico de epimastigotes. Del mismo modo, García-Escalante y col. registraron un total de 23 bandas comprendidas en un rango de 116 a 15 KDa (García 1996), mientras que Gazzinelli y col. reportaron, en el caso de la cepa Y de referencia, hallazgos similares en cuanto al número de proteínas (20 bandas) y el rango de masas moleculares (95 a 14 KDa) (Gazzinelli 1990).

Los resultados del análisis mediante la técnica de inmunotransferencia reveló un total de 84 proteínas antigénicas comprendidas entre (256 y 7) KDa, de los cuales, 63 fueron reconocidos por los sueros con la cepa 338 y 65 con la cepa Y; lo cual muestra mayor variabilidad antigénica con respecto a otros estudios realizados en México (García 1996) y Brasil (Rimoldi 1989), donde han encontrado 25 componentes antigénicos, utilizando cepas *Yucatecas* y 33 componentes antigénicos con la cepa Y. Por otro lado, la diferencia entre la cantidad de bandas

detectadas por electroforesis SDS-PAGE, 30 bandas proteicas, y los 84 componentes antigénicos reconocidos por los pacientes analizados, demuestran la gran sensibilidad que presenta la detección inmunogénica, al detectar entre 10 y 50 pg de proteína, comparada con los 30 ng de proteína que pueden ser detectados utilizando el azul de Coomassie R-250 para teñir los geles de poliacrilamida.

Con base en los datos obtenidos en las tablas 56 y 57, observamos que con cada uno de los antígenos utilizados, cepa 338 (*T. cruzi I*) y cepa Y (*T. cruzi II*), se observa mayor reconocimiento por parte de los sueros correspondientes al grupo de pacientes asintomáticos y en el rango de proteínas comprendido entre 70 y 7 KDa. Las proteínas de 41 y 46 KDa, son sobre todo reconocidas por los pacientes sintomáticos utilizando como antígeno la cepa Y, mientras que la proteína de 36KDa fue especialmente reconocida por los pacientes sintomáticos en presencia de la cepa 338. Se presentan altos reconocimientos, especialmente al utilizar la cepa Y, por parte de los pacientes seronegativos en las proteínas de 65, 62/64, 34/35, 31/33, 10 y 7/8 KDa. Estos altos porcentajes pueden ser producto de reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos como *Trypanosoma rangeli* y/o *Crithidia*. Ésto fue comprobado al incubar los sueros de un paciente asintomático y sintomático en presencia de los cuatro antígenos de *T. cruzi I*, *T. cruzi II*, *T. rangeli* y *Crithidia*, donde encontramos que las proteínas de 30, 31, 32, 33, 54 y 65 KDa son reconocidas por los pacientes en presencia de *T. rangeli* y *Crithidia*.

En cada uno de los grupos de pacientes estudiados, la cepa Y presenta mayor antigenicidad, mostrando un promedio de 5 bandas por paciente, mientras que la cepa 338 presenta un promedio de 3 bandas por paciente enfermo; estos datos presentan similitud con los obtenidos por Rimoldi y col. quienes compararon la reactividad de sueros obtenidos de conejos entre la cepa Tulahuen (*T. cruzi I*) y la cepa Y, y encontraron una mayor reactividad hacia la cepa Y, que hacía la propia cepa Tulahuen. Estos resultados fueron similares a los obtenidos entre cepas

yucateñas y la cepa Y, en el cual se observó un mayor reconocimiento de proteínas, utilizando como antígeno la cepa Y. Este comportamiento podría atribuirse a que la cepa Y presenta mayor antigenicidad, lo cual implicaría una mayor expresión de los determinantes antigénicos en la misma, del mismo modo, la mayor adaptación de esta cepa a las condiciones de cultivo, podría implicar mayor expresión de proteínas en la fase epimastigote que conduciría a una mayor captación de anticuerpos específicos en el suero (García 1996).

Dentro de las proteínas reconocidas por los grupos de pacientes analizados, aparecen algunas que presentan pesos moleculares similares a los reportados en la literatura por otros investigadores y de cuyos péptidos se ha determinado la posible función en el parásito.

Destacamos a continuación algunas de las proteínas reconocidas por los sueros que han sido detectadas e identificadas también por otros investigadores y que presentan porcentajes de reconocimiento importantes al incubarlos con la **cepa Y**. Las proteínas antigénicas son las siguientes:

-La proteína de 66-67KDa, estas proteínas han sido mayormente reconocida por los pacientes asintomáticos, y coincide con la glicoproteína LLGP-67, cuyos estudios demuestran que encuentra implicada en el reconocimiento e invasión a la célula hospedera (Mancipar 2003). Además, es una proteína de gran importancia en el diagnóstico, puesto que se encuentra presente en la fase epimastigote y tripomastigote. Estudios realizados con *T. cruzi* han determinado que esta proteína inmunogénica y presenta buena especificidad y sensibilidad al ser utilizada como antígeno en la prueba de ELISA (Opperdoes 1987).

-Las proteínas identificadas en el rango de 59 a 61 KDa. Son reconocidas por los dos grupos de pacientes. Estas proteínas podrían corresponder a la proteína de 60 KDa denominada penetrina, la cual promueve la invasión del parásito a la célula hospedera. Del mismo modo, los cambios de temperatura a los cuales es sometido el parásito en su paso del vector al hospedero vertebrado, han producido

la expresión proteínas de choque térmico (HSP) en el *T. cruzi*. Se ha determinado que la HSP60, es inmunogénica y además esencial en el desarrollo del parásito; al ser una proteína chaperona, se convierte en un blanco importante, ya que ayuda a otras proteínas a alcanzar la estructura plegada necesaria para llevar a cabo sus funciones, y las transporta al lugar de la célula donde la proteína realiza su función (Silber 2002)

-Proteínas de 43 a 45 KDa. Estas proteínas detectadas se asemejan a las proteínas correspondientes al intervalo de peso molecular establecido para la Cruzipaína, 40 a 45 KDa. Esta glicoproteína es la principal cisteína proteínasa del parásito, la cual se expresa en todas las fases de desarrollo del parásito y se ha demostrado que es altamente inmunogénica en pacientes en fase crónica de la enfermedad (Guiñazú 2004). Las funciones de estas proteínas no están aún completamente definidas, pero incluirían: 1) la digestión lisosomal de proteínas, exógenas o del propio parásito; 2) la protección contra la respuesta inmune del hospedador, por destrucción del fragmento Fc de las inmunoglobulinas ligadas a los respectivos antígenos, lo que dejaría el fragmento F(ab')₂, incapaz de activar el complemento y que actuaría así como protector; 3) un papel en la penetración del trypomastigote en la célula del mamífero, pues se sabe que inhibidores de proteinasas inhiben parcialmente este proceso, 4) un papel en las etapas de diferenciación en diferentes puntos del ciclo de vida del parásito. Estudios recientes de varios laboratorios, empleando inhibidores de cisteína proteinasas capaces de penetrar en el parásito, indican claramente una participación importante de estas enzimas, entre ellas presumiblemente la cruzipaína, en estos procesos de invasión del parásito en las células huésped. Estos estudios abren la posibilidad de desarrollar inhibidores de la cruzipaína como drogas antichagásicas (Cazzulo 1999).

A pesar del bajo reconocimiento que mostraron los pacientes enfermos con el antígeno obtenido de la **cepa 338**, se destaca el polipéptido de 36 KDa, el cual presenta uno de los porcentajes de reconocimiento más altos obtenidos con esta

cepa, mientras que el porcentaje de reconocimiento obtenido con esta proteína en la cepa Y no es significativo. La mayoría de los estudios realizados destacan el reconocimiento de antígenos de superficie celular, proteínas de choque térmico o proteínas ribosomales; en el estudio realizado por Macedo y col. identifican un antígeno de 36KDa localizado en las proximidades de la cavidad de la membrana flagelar y en el aparato de golgi del parásito.

Esta proteína presenta gran homología con la proteína VIP36, la cual ha sido identificada como una lectina. Las lectinas han sido ampliamente estudiadas, y se ha llegado a la conclusión de que su importancia principal radica en sus propiedades biológicas, en la aglutinación de eritrocitos y de otras células como linfocitos y plaquetas. Se han identificado en muchos organismos como animales, vegetales, microorganismos como bacterias, protozoarios y virus. Las lectinas están compuestas por una cadena polipeptídica a la cual pueden estar unidos uno o más residuos de carbohidratos, normalmente de 2 a 15 monosacáridos residuales, que pueden estar constituidos principalmente por dos o más azúcares como: D-Manosa, D-Galactosa, D-Glucosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido salicílico, glucosamina y galactosamina. Se ha determinado que en los microorganismos las lectinas son muy importantes para determinar la patogenicidad de bacterias y de parásitos, para el reconocimiento de determinantes no inmunes en la fagocitosis y en el reconocimiento de determinantes de la adhesión celular, además, las lectinas pueden inhibir o potenciar un proceso infeccioso o parasitario. Se espera que en el futuro las lectinas puedan utilizarse como vacunas en un amplio rango de microorganismos (Riaño 1997).

La VIP36 actúa como un receptor tipo "cargó" que alterna entre el aparato de Golgi y el Retículo endoplasmático (RE), los lípidos y proteínas son sintetizados en el (RE) que está formado por una red continua de cisternas aplanadas, recubiertas de ribosomas y que se extiende por todo el citoplasma. Del conjunto de proteínas

sintetizadas en el RE, unas residirán en orgánulos y otras serán secretadas al exterior de la célula. Por consiguiente, las proteínas que pertenecen a otros orgánulos que no sean el RE y las de secreción deben transportarse a otras estaciones intracelulares (aparato de Golgi, lisosomas, membrana plasmática), mientras que las proteínas residentes del RE deben retenerse.

En principio, todas las proteínas que no contengan señales de retención saldrán del RE. El destino inmediato: el aparato o complejo de Golgi. Sin embargo, como el RE y el aparato de Golgi no están físicamente interconectados, se ven obligados a utilizar unos intermediarios de membrana que son las vesículas de transporte. Las vesículas de transporte que viajan desde el RE hasta el aparato de Golgi presentan una serie de cubiertas (coats) formadas por complejos multiprotéicos que al autoensamblarse deforman la membrana donadora para formar las vesículas de transporte. Son las vesículas con cubiertas de tipo COP (coat protein). Así tenemos las de tipo COP I y las de tipo COP II. Estas vesículas actúan en tandem. Es decir, primero se forman vesículas tipo COPII en el retículo endoplasmático y luego las COP I en un compartimento lábil y pleomórfico formado por estructuras túbulo-vesiculares (VTCs, vesicular-tubular clusters) situado a medio camino entre el RE y el aparato de Golgi y denominado ERGIC (endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment). En este compartimento se produce la concentración de ciertas proteínas solubles destinadas a la secreción. La proteína VIP-36, presenta funciones similares a aquellas que realiza la ERGIC-53, y la VIP-36 fue inicialmente encontrada operando en las vesículas de transporte entre el aparato de golgi y la membrana plasmática y esto sugiere que se trata de una de las proteínas que forma el complejo multiproteico encargado del tráfico de proteínas hacia el aparato de golgi (Etienne 2003) y de allí a otros organelos donde van a realizar las funciones necesarias para el mantenimiento celular. La importancia de estos receptores radica en que errores en el envío y/o ubicación de las proteínas sintetizadas pueden resultar fatales para la célula y para el organismo, lo que convierte a estas proteínas en blancos importantes para impedir el desarrollo del parásito en el hospedero.

Por otro lado, en la membrana del glicosoma de *T. cruzi* también fue encontrado un polipéptido de 36 KDa, denominado GMP36, que al ser teñido con TMBZ correspondió a una hemoproteína, que podría pertenecer al complejo de citocromos P-450, una gran familia de proteínas de aproximadamente 40 KDa de peso molecular. El papel de estas enzimas es clave para la supervivencia celular. De no existir tales vías metabólicas, una vez en el interior del organismo los xenobióticos tenderían a acumularse alterando el equilibrio celular y provocando alteraciones funcionales e incluso la muerte celular (Donato 2007).

En relación al número de pacientes que reconocieron proteínas, podemos decir que fueron bajos los porcentajes de reconocimiento de proteínas antigénicas por los sueros estudiados, especialmente aquellos conseguidos con la cepa 338; donde el mayor porcentaje de reconocimiento es del 26% y corresponde a las proteínas ubicadas entre 11 y 14 KDa. La cepa Y, por su parte, fue reconocida mayoritariamente por los pacientes estudiados. El porcentaje de reconocimiento mayor fue del orden del 60% (para las proteínas antigénicas ubicadas en el intervalo de 31-33KDa). Este dato coincide con aquellos obtenidos por Vissoci y col. quienes al utilizar la cepa Y, encontraron un porcentaje de reconocimiento del 83.35% con la proteína de 30 KDa. Al igual que la proteína de 30KDa, de buen reconocimiento en la cepa Y, en el estudio se destacan otras proteínas que se han reportado en la literatura por su capacidad antigénica y la posibilidad de ser utilizadas como marcadores en el diagnóstico de la enfermedad. En el estudio realizado a las fracciones glicosídicas del parásito, Lima y col. encontraron que los epimastigotes y los tripomastigotes metacíclicos expresan, glicoproteínas (66, 62, 57 y 43 KDa) capaces de generar anticuerpos en los sueros de conejos, las cuales se caracterizan por presentar altos porcentajes de reconocimiento con los dos antígenos utilizados en el estudio.

El western Blot ha sido usado como una técnica de diagnóstico complementaria y alternativa. La determinación del estado de un paciente utilizando western Blot, se basa en establecer el grupo de bandas que presentan mayor reconocimiento por parte de los pacientes infectados y fijar el número de estas bandas que debe reconocer un paciente para ser considerado positivo. Como las proteínas de mayor reconocimiento fueron diferentes para las dos cepas, se establecieron criterios diferentes para determinar el diagnóstico de un paciente. En la cepa Y, un suero fue considerado positivo si presentaba por lo menos cuatro bandas de 10 proteínas con alto porcentaje de reconocimiento (66, 62, 59, 58, 53, 43, 31, 13/14, 11/12 y 7/8KDa), indeterminado si solo mostraban 3 bandas y negativo si no presentaba reactividad con el antígeno. En la cepa 338, un suero fue considerado positivo si presentó por lo menos 3 bandas de las siete que presentaron alto reconocimiento (62/ 64, 36, 34/35, 29/30, 15/17, 13/14 y 11/12KDa), indeterminado si presentaba 2 bandas y negativo si no presentaba reactividad con el antígeno.

Utilizando el patrón de diagnóstico antes citado para los resultados obtenidos con los pacientes clasificados como positivos (sintomáticos y asintomáticos) mediante la prueba de ELISA, encontramos que al utilizar la cepa 338, solo el 11% de los pacientes serían positivos, el 32% presenta diagnóstico indeterminado y el 57% no muestran reactividad. Con la cepa Y, el 26% serían positivos, el 62% presentó un resultado indeterminado y el 12% no presentó reactividad con el antígeno. La divergencia entre estos resultados y aquellos encontrados en la prueba de ELISA, puede deberse a que los pacientes analizados hayan desarrollado otros isotipos de inmunoglobulinas (IgA, IgM) sobre los antígenos del parásito, que al no ser evaluados en el western blot, producen esta diferencia en los resultados. Del mismo modo, como lo reportó Schechter y Nogueira, la variación de la composición antigénica del parásito junto a la respuesta inmune de cada individuo podría producir la activación de diferentes tipos de respuesta inmune y la producción de anticuerpos específicos contra diferentes proteínas del parásito. Por otro lado, la mayoría de estos sueros fueron colectados en pueblos y veredas del

Departamento de Santander, donde la calidad de vida y la alimentación de estos pacientes, en la mayoría de los casos, no es la adecuada; esto podría explicar la baja respuesta inmune que presentan muchos de los pacientes analizados.

8. CONCLUSIONES

La cepa 338 obtenida de un paciente de la región nororiental de Colombia, mostró una proteína muy interesante de 36KDa, que podría coincidir con la proteína cargo implicada en el transporte de proteínas desde el retículo endoplasmático al aparato de golgi. Por otro lado, esta proteína coincide con aquella encontrada en la membrana del glicosoma del *T. cruzi*, una proteína del citocromo P450 encargado de modificar los xenobióticos para que puedan ser expulsados de la célula. El reconocimiento de estas proteínas en presencia de la cepa 338, puede estar relacionado con la alta virulencia que ha presentado este tipo de parásito en los pacientes que la poseen.

Los pesos moleculares establecidos a las proteínas reconocidas por los pacientes, con los dos parásitos, presentan analogía con proteínas reportadas en la literatura, implicadas en la invasión a la célula hospedera, en el desarrollo del parásito y en la modulación de la respuesta inmune como la proteína denominada penetrina de 60KDa, la LLGP 67, la KMP-11, las mucinas, la cruzipaína, las proteínas chaperonas de choque térmico HSP, proteínas de membrana tipo glicosyl-fosfatidil inositol GPI, las proteínas de membrana del glicosoma y otros polipéptidos de 67, 66, 62, 57 y 43KDa los cuales se han manifestado en varios estudios realizados a diferentes grupos de pacientes en pruebas de ELISA y han presentado buena sensibilidad y especificidad.

Al contrario de lo que esperábamos, la cepa 338 proveniente de esta región, no fue tan antigénica como la cepa Y de referencia. Este resultado muestra que una cepa muy virulenta, necesariamente no es muy antigénica, esto representaría que los parásitos pertenecientes a esta cepa ocultan sus componentes antigénicos, dificultando una respuesta inmune efectiva por parte del hospedero, lo cual le

permite al parásito desarrollarse sin mayor inconveniente en el hospedero vertebrado.

Al identificar las proteínas reconocidas por todos los pacientes, sintomáticos, asintomáticos y seronegativos, encontramos algunas proteínas que presentaban porcentajes altos de reconocimiento dentro del grupo de pacientes seronegativos (31-35, 7, 8, 10KDa). Un ensayo previo utilizando otros tripanosomátidos cultivados, confirmó que éstas proteínas eran reconocidas por el paciente al incubarse con *T. rangeli*, lo cual confirma que estos resultados discordantes serían producto de reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos.

La electroforesis en geles de poliacrilamida es un método poco eficiente para establecer diferencias claras en la composición proteica de cada parásito; debido a los bajos niveles de detección y a las variaciones en la medida de las distancias de migración que dificultan la determinación de los pesos exactos de las proteínas.

El patrón de diagnóstico establecido con base a las proteínas reconocidas por los pacientes, no fue efectivo para determinar el estado de salud de aquellos individuos que presentaban resultados indeterminados, e incluso, los porcentajes de sensibilidad, obtenidos por los pacientes clasificados como enfermos mediante la prueba de ELISA, fueron muy bajos para los dos trypanosomas. Lo anterior, puede ser producto de los 84 componentes antigénicos obtenidos en este estudio, lo cual manifiesta mayor variabilidad antigénica por parte de los pacientes analizados. Esta variabilidad hace difícil establecer un patrón de diagnóstico efectivo y confiable mediante inmunotransferencia.

La gran complejidad de la constitución molecular de *T. cruzi* va más allá de los límites de resolución y la sensibilidad de técnicas inmunoquímicas y bioquímicas usadas en este análisis. No existe un consenso acerca de los antígenos específicos que componen el *T. cruzi*, debido principalmente a la alta complejidad

del parásito asociada a las limitaciones en el análisis de resultados obtenidos con diferentes técnicas.

RECOMENDACIONES

A partir de estos estudios iniciales de recuperación y separación de las proteínas antigénicas de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* por electroforesis SDS-PAGE, se recomienda su identificación por secuencia de EDMAN o por técnicas de espectrometría de masas MALDI-TOF.

Se recomienda también la separación y purificación de fracciones o proteínas específicas que presenten alta capacidad antigénica y baja reactividad cruzada para intentar desarrollar nuevos métodos de identificación de la enfermedad en sueros de pacientes asintomáticos, de manera que se pueda aumentar la selectividad de los métodos de diagnóstico existentes en el mercado.

Desarrollar métodos más eficientes de recuperación de las proteínas de los parásitos y de separación electroforética de las proteínas, tales como la electroforesis en 2D, de manera que se pueda llevar a cabo análisis proteómico de las cepas y clones de *Trypanosoma cruzi* que son endémicos de la región de Santander.

Intentar ampliar el estudio de este proyecto a las diferentes formas del parásito, como trypomastigotes o amastigotes, para poder intentar descubrir nuevas proteínas o proteínas comunes en las diferentes fases del ciclo de vida del parásito.

Realizar estudios comparativos que involucren un número significativo de pacientes, donde se analicen las proteínas reconocidas por éstos, en presencia de otros tripanosomátidos como *T. rangeli*, *Crithidia* y *Leishmania*, con el objetivo de tener más certeza de las proteínas comunes entre estos parásitos, que nos

permitan diseñar métodos de diagnóstico más efectivos en aquellas zonas donde la enfermedad del Chagas es endémica y se presentan reacciones cruzadas.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta A, Almeida I, Freitas L. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001; 114:143–150.

Aguero. *T cruzi DB* an integrated, post. genomics community resource for trypanosome cruzi. *Nucleic. Acids. Res.* 2006; 34: 428-431.

Almeida I, Gazzinelli R. J. *Leukocyte Biol.* 2001; 70: 467–477.

Andrade S. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strain and the importance of principal clones. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1999; 94 (I): 185-187.

Anez N, García P, Crisante G. Isolation, purification and characterization of GPI-anchored membrana proteins from *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica.* 2005; 97: 140-145.

Araujo F. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and antibodies to related trypanosomatids. *Infect. Immun.* 1986; 53: 179-185.

Atwood J. A, Weatherly D, Minning T, Bundy C, Cavola C. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 2005; 309: 473-476.

Bradford M. A rapida and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-354.

Brandão A, Fernandez O. *Trypanosoma cruzi*: Mutations in the 3' untranslated region of calmodulin gene are specific for lineages *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, and the Zymodeme III isolates. *Science*. 2005.

Briones, M. R., Souto, R. P., Stolf, B. S., and Zingales, B. (1999) The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity, *Mol. Biochem. Parasitol.* 104, 219-232.

Cazzulo, J. 1999. La cruzipaina, cisteína proteinasa principal del *trypanosoma cruzi*. Secuencia y organización genómica de los genes que la codifican. *Medicina*. Buenos aires. [web en línea]. Disponible desde Internet en: <http://www.medicinabuenosaires.com/vol59-99/supl2/cruzipaina.htm>. [con acceso el 20 de septiembre de 2007].

Chiaromonte MG, Zwirner NW, Caropresi SL, Taranto NJ, Malchiodi EI. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.* human mixed infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; 54(3): 271-273.

Concepción J, Gonzalez D, Urbina J. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in *Trypanosoma cruzi*: subcellular localization and kinetic properties. *Archiv. Biochem. Biophys.* 1998; 352: 114-120.

Coura J, Ferreira L, Rubens J, Pereira N, Silva J. *Trypanosoma do "complexo cruzi"* em reservatório silvestre no Estado da Guanabara. Estudo de sua patogenicidade. *Rev. Inst. Med. Trop.* 1966; 8: 125-133.

Cuervo P, Cupolillo E, Segura I, Saravia N, Fernandes O. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002; 97(6):877-880.

Cultek. Fecha desconocida. *Soluciones western blot*. [web en línea]. Disponible desde Internet en: <<http://www.cultek.com/link.asp?link=http://www.piercenet.com>>. [Con acceso el 20 de junio de 2006].

Devia F. Caracterización bioquímica de cepas de *Trypanosoma cruzi* del departamento de Santander y otros departamentos. Bogotá. Tesis de grado Magister en Microbiología. Universidad de los Andes. 1999.

Díez H, Guzmán F, Alba M.P. Immunological and structural characterization of an epitope from the *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein. Peptides. 2007; 28: 1520-1526.

Diez H, López C, Thomas M. KMP-11: proteína 11 de Membrana de Kinetoplastidos. Universitas Scientiarum. 2004; 9:29-44.

Donato, M. Fecha desconocida. *¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona?* Disponible desde Internet: http://www.ffyb.uba.ar/cemineM/página_nuera_10.htm. [Con acceso el 4 de octubre de 2007].

Dvorak JA. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. J. Cell. Biochem. 1984; 24: 357-371.

Etienne N, Svensson K, Fuxe J, Pettersson R. VIPL, a VIP36-like membrane protein with a putative function in the export of glycoproteins from the endoplasmic reticulum. Exp. Cell R. 2003; 288: 70-83.

Fernández O, Souto R, Castro J, Pereira J, Fernández N, Junqueira A.. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from human and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequence. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1998; 58: 807-811.

Ferreira A, Belem Z, Lemos E, Reed S, Campos-Neto A. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. J. Clin. Microbiol. 2001; 39(12): 4390-4395.

Frasch A, Reyes M. Diagnosis of Chagas disease using recombinant DNA technology. Parasitol Today. 1990; 4: 137-139.

Frasch A. Functional Diversity in the Trans-sialidase and Mucin Families in *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Today. 2000;16: 282–286.

García M, Ehrenberg J, Puerto F. Estudio del perfil antigénico de *Trypanosoma cruzi* a través de la reactividad de sueros hiperinmunes obtenidos de conejos. Biomédica. 1996; 7: 133-145.

Gazzinelli R, Leme V, Cancado JR, Gazzinelli G, Scharfstein J. Identification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T cells and immune sera from patients with Chagas disease. Infec. Immun. 1990; 58: 1437-1444.

Guhl Felipe. Reunión Internacional para el establecimiento de criterios de certificación de la eliminación de *Rhodnius prolixus*. Centro de investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical CIMPAT Universidad de los Andes.

Guiñazú N, Pellegrini A, Giordanengo L. Immune response to a major *Trypanosoma cruzi* antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice. *Microb. Infect.* 2004; 1250-1258.

Hagar JM, Rahimtoola SH. Chagas' Heart Disease. *Curr. Probl. in Cardiol.* 1995; 20: 825-928.

Hartl F, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 2002; 295: 1852– 1858.

<<http://www.ops-oms.org/Spanish/ad/dpc/cd/montevideo-4-col-prog-nacional.pdf>.>. 2001. *Décima Reunión de INCOSUR-Chagas*, Montevideo. [web en línea]. [Con acceso el 15 de septiembre de 2005].

Jaramillo CL. Determinación del polimorfismo genético en cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de humano y vector por medio de ITS-RFLP y RAPD en el departamento de Santander (Colombia). Bucaramanga. Tesis de grado Biología. Universidad Industrial de Santander. 2004.

Jaramillo N, Moreno J, Triano O, Arcos-Burgos M, Muñoz S, Solari A. Genetic structure and phylogenetic relationships of Colombian *Trypanosoma cruzi* populations as determined by schizodeme and isoenzyme markers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 6: 986-993.

Jardim A, Hanson S, Ullman B. Cloning and structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *J. of Biochem.* 1995; 305: 315-320.

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

Lehninger N. Protein function. Principios de Bioquímica. Worth Publishers. 4^a edición. New York. 2000. 157-189.

Lima A, Farías M, Tortolero E. Purificación parcial y empleo de fracciones glicosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad del Chagas. Acta científica venezolana. 2001; 52: 235-247.

Macedo AM, Pena SDJ. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. Parasitol. Today. 1998; 14: 119-124.

Macedo C, DaRocha W, Mortara R. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* antigen with homology to intracellular mammalian lectins. Int. J. Parasitol. 2006; 36: 1473-1484.

Marañón C, Thomas M, Planelles I. The immunization of A2/Kb transgenic mice with the KMP11-HSP70 fusion protein induces CTL response against human cells expressing the *T.cruzi* KMP-11 antigen: identification of A2- restricted epitopes. Molecular. Immunology. 2001; 38: 279-287.

Marcipar S, Welchen E, Roodvel C. Purification of the 67-KDa lectin-like glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*, LLGP-67, and its evaluation as a relevant antigen for the diagnosis of human infection. Fems Microbiology Letters. 2003; 220: 149-154.

Miles M, Lanhan S, de Souza A, Pova D. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1980; 74: 221-242.

Miles M, Teye P, Oswald S, Godfrey D. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1977; 71: 217-225.

Miles MA, Souza A, Pova M, Shaw JJ, Lainson R, Teye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. Nature. 1978; 272: 819-821.

Momen H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1999; 94: 181-184.

Montilla M, Guhl F, Jaramillo C, Nicholls S, Barnabe C, Bosseno MF, Breniere SF. Isoenzyme clustering of *Trypanosomatidae* Colombian populations. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2002; 66: 394-400.

Oelemann W, Vanderborght B, Verissimo Da Costa G, Teixeira M, Borges-Pereira J, De Castro J, Coura J, Stoops E, Hulstaert F, Zrein M, Peralta J. A recombinant peptide antigen line immunoassay optimized for the confirmation of Chagas' disease. Transfusion. 1999; 39(7):711-717.

Opperdoes F, Baudhuin P, Coppens I, De Roe C, Edwards S, Weijers P, Misset O. Purification, morphometric analysis and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. J. Cell Biol. 1984; 98: 1178-1184.

Opperdoes F. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annual Review of Microbiology* 1987; 41: 127-151.

Ortega E, Pereira A. A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell*. 1991; 67: 411-421.

Paba J, Ricart C, Fontes W, Santana J. Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Developmental Stages Using Isotope-Coded Affinity Tag Reagents. *J. Proteome Research*. 2004; 3: 517-524.

Pantoja N, Espinoza B. Purificación y caracterización de un antígeno de la cepa Ninoa del parásito *Trypanosoma cruzi*. Depto. De Inmunología. UNAM. En X Congreso Nal. de Inmunología. Oct. 1993.

Parodi-Talice A, Durán R, Arrambidea N, Prieto V, Piñeyro M. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. Elsevier. Science Direct. 2004.

Pereira M. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. In: D. Wyler (ed), *Modern parasite biology*. W. H. Freeman and Co., New York. 1990. 64-78p.

Pereira VR, de Lorena VM, Nakazawa M, da Silva AP, Montarroyos U, Correa-Oliveira R, Gomes Y de M. Evaluation of the immune response to CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in C57BL/6 mice. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2003; 36(4):435-440

Qinwei S, Jackowski G. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. En Hames BD, editor. *Gel electrophoresis of proteins*. Oxford: Information Press Ltd., 1998: 1-91.

Ready PD, Miles MA. Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1980; 74: 238-242.

Riaño, M. 1997. *Importancia y aplicaciones de las lectinas*. Monografías. com. Veracruz. [web en línea]. Disponible desde Internet en: [http:// www.monografia.com/trabajos/bacterias/](http://www.monografia.com/trabajos/bacterias/). [Con acceso el 3 de octubre de 2007]

Rodríguez P, Escalante M, Díez H, Cuervo C, Montilla M, Nicholls RS, Garante I, Puerta C. Estudio de la variabilidad de seis cepas colombianas de *Trypanosoma cruzi* mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD). Biomédica. 2002; 22:263-271.

Rodríguez Eva Maria. Aspectos teóricos Curso Latinoamericano sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto de Biomedicina, UCV. 25 octubre-12 noviembre 2004. Caracas Venezuela.

Rondinelli E. Conservation of heat-shock proteins in *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Today. 1994; 10: 172– 176.

Rossi MA, Bestetti RB. The challenge of Chagasic cardiomyopathy. Cardiology. 1995; 86: 1-7.

Ruiz-García M, Montilla M, Nicholls SO, Angarita L, Alvarez D. Genetic relationships and spatial genetic structure among clonal stocks of *Trypanosoma cruzi* in Colombia. Heredity. 2000; 85 Pt 4:318-327.

Saravia N, Holguin A, Cibulskis R, D'Alesandro A. Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the eastern plains, piedemont, and highlands of Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987; 36: 59-69.

Schechter M, Nogueira N. Variations induced by different methodologies in *Trypanosoma cruzi* surface antigen profiles. Mol. Biochem. Parasitol. 1988; 29: 37-46.

Schechter M, Voller Ct, Marinkelle A, Flint JE, Guhl F, Miles MA. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American Trypanosimiasis (Chagas disease). Lancet 1983; 939-941.

Silber A, Marcipar I, Roodveldt C. *Trypanosoma cruzi*: identification of a sugar binding protein by means of human erythrocyte membrane-parasite interaction. Exp. Parasitol. 2002; 100: 217-225.

Snary D. Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1983; 77: 126-129.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 1996; 83: 141-152.

Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. Mol. Biochem. Parasitol. 1993; 62: 45-52.

Tachibana H, Kawabata M, Mimori T, Hashiguchi K, Kaneda Y. The validity of serodiagnosis using a monoclonal antibody against *Trypanosoma cruzi* a specific Mr 25000 antigen for chagasic patients without cardiomyopathy. Ann. Trop. Med. Parasitol. 1991; 85: 275-276.

TDR/WHO. Scientific Working group on Chagas disease, Buenos Aires, Argentina. 2002.

Thomas M, García J, Alonso C. Molecular characterization of KMP-11 from *Trypanosoma cruzi*: A cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. *DNA and Cell Biology*. 2000; 19: 47-57.

Thomas M, Longobardo M, Carmelo E. Mapping of the antigenic determinants of the *T.cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. *Clinical and Experimental Immunology*. 2001; 123: 465-471.

Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala F. Genetic characterization of six protozoa: parity between random primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; 90: 1335-1339.

Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83:115-119

Umezawa E, Bastos S, Coura J, Levin M, Gonzalez A, Rangel-Aldao R, Zingales B, Luquetti AO, da Silveira JF. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion*. 2003; 43(1): 91-97.

Urbina J. Intermediary metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol today* 1994; 10: 107-110.

Vago A, Andrade L, Leite A, Reis D, Macedo A, Adad S. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* from tissues of patients with chronic Chagas disease. Am. J. Pathol. 2000; 156: 1805-1809.

Vissoci E, Cavazzana M, Okamura H, Tagata E. Evaluation of the western Blot in the confirmatory serologic diagnosis of chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1998; 750-756.

Zingales, B., Souto, R. P., Mangia, R. H., Lisboa, C. V., Campbell, D. A., Coura, J. R., Jansen, A., and Fernandes, O. (1998) Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences, Int. J. Parasitol. 28, 105-112.

ANEXOS

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS UTILIZANDO EL MÉTODO DE BRADFORD

La curva de calibración obtenida con los patrones de albúmina se muestra a continuación:

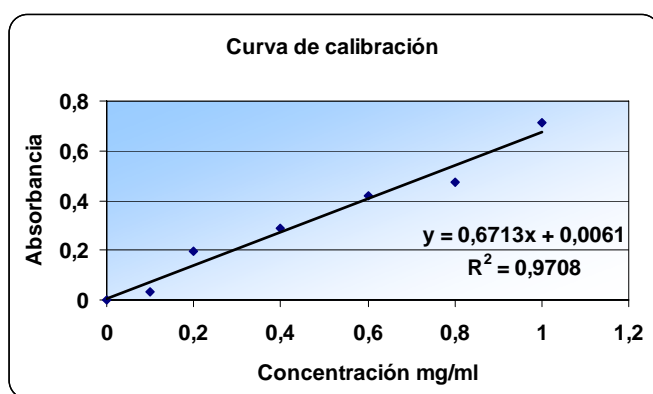


Figura A1. Curva de calibración patrones de albúmina

En la tabla 12 se muestra la absorbancia y la concentración de proteína obtenida en los extractos proteicos de cada parásito.

PARÁSITO	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN mg/ml
<i>Trypanosoma cruzi</i> II cepa Y	0.159	0.227
<i>Trypanosoma cruzi</i> I cepa 338	0.147	0.209
<i>Trypanosoma rangeli</i>	0.159	0.227
Crithidia	0.154	0.220

Tabla A1. Concentración de proteínas de los extractos proteicos de diferentes tripanosomátidos