

UNIVERSIDAD DE CARABOBO ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

## ANÁLISIS ANTIGÉNICO DE EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* OBTENIDOS EN CONDICIONES AXÉNICAS A 27°C Y 37°C EMPLEANDO SUEROS DE PACIENTES CHAGÁSICOS

AUTOR: LCDA. DIANA I. GRATEROL R.

TUTOR: DR. VÍCTOR T. CONTRERAS A.

MARACAY, OCTUBRE 2.017



UNIVERSIDAD DE CARABOBO ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

## ANÁLISIS ANTIGÉNICO DE EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* OBTENIDOS EN CONDICIONES AXÉNICAS A 27°C Y 37°C EMPLEANDO SUEROS DE PACIENTES CHAGÁSICOS

AUTOR: LCDA. DIANA I. GRATEROL R.

Trabajo presentado ante el Área de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo para optar al título de Magíster en Ciencias Biomédicas mención Bioquímica y Biología Molecular

## **MARACAY, OCTUBRE 2.017**



UNIVERSIDAD DE CARABOBO FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DIRECCIÓN DE ASUNTOS ESTUDIANTILES SEDE ARAGUA



## <u>ACTA DE DISCUSIÓN</u> TRABAJO DE GRADO

En atención a lo dispuesto en los Artículos 127, 128, 137, 138 y 139 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 29 literal "N" del citado Reglamento, para estudiar el Trabajo de Maestría titulado:

## "ANÁLISIS ANTIGÉNICO DE EPIMASTIGOTAS DE Trypanosoma cruzi OBTENIDOS EN CONDICIONES AXÉNICAS A 27 °C Y 37 °C EMPLEANDO SUEROS DE PACIENTES CHAGÁSICOS".

Presentado para optar al grado de **MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR** por la aspirante:

## **DIANA IRENE GRATEROL ROMERO**

C.I. 14.999.305

Tutor del Trabajo de Grado: Dr. Víctor Contreras C.I. 4.323.708

Habiendo examinado el Trabajo de Maestría presentado, decidimos que el mismo está

## APROBADO

En Maracay, a los diez días del mes de Octubre del año dos mil diecisiete.

atreras C.I. 4.323.708

Dra. Mariela Pérez C.I. 7.144,139

> REFUELCA BOLIVAL MA DE VENEZIE UNIVERSIDAD DE CARAGOS Soce Angua Facultad de Clanons de la Salu Direction de Astuntos Estudiandes Area Postgraf

Dra. Elizabeth Ferrer C.I. 7.101.850

Elizabeth Fener

"Democracia y Autonomía, garantía de presente y futuro Universitario" Final Av. Leonardo Ruiz Pineda - La Morita - Edo. Aragua Telf. 0241-6004000 - 6005000 ext. 404140



Universidad de Carabobo Facultad de Ciencias de la Salud Dirección de Asuntos Estudiantiles Postgrado- Sede Aragua



## ACTA DE VEREDICTO TRABAJO DE GRADO

Siendo hoy martes 10 de Octubre de 2017 a las 9:00 am se realizó la presentación pública del Trabajo de Grado titulado: "Análisis antigénico de epimastigotas de Trypanosoma cruzi obtenidos en condiciones axénicas a 27 °C y 37 °C empleando sueros de pacientes chagásicos" presentado por la Licenciada: DIANA IRENE GRATEROL ROMERO. Cédula de identidad: 14.999.305, para optar al Título de: Magister en Ciencias Biomédicas mención Bioquímica y Biología Molecular. Tutor del Trabajo de Grado: Dr. Víctor Contreras C.I. 4.323.708

Una vez leído el trabajo por cada miembro del jurado y evaluada la presentación pública, se estimó que el mismo cumple con lo establecido en el Capítulo X, Sección Cuarta en su artículo 130 del Reglamento de los Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, el cual reza: "El trabajo de grado es el resultado del estudio que demuestra la capacidad crítica, analítica, constructiva en un contexto sistémico y de dominio teórico y metodológico de la investigación aplicada en la respectiva área del conocimiento del cursante", por lo cual el mismo está: **APROBADO.** 

Los miembros del jurado consideran que este trabajo representa aportes muy importantes e inéditos en Morfogénesis y Biología de *Trypanosoma cruzi* que abre nuevos paradigmas en diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Por lo que el Jurado decide otorgar **MENCIÓN HONORÍFICA**.

En Maracay, a los 10 días del mes de Octubre de 2017

Dr. Victor Contretas C.I. 4.323.708 Miembro del Jurado y Tutor del trabajo

Dra<sup>®</sup> Elizabeth Ferrer C.I. 7.101.850 Presidente del Jurado

Dra. Mariela Pérez C.I. 7.144.139 Jurado Externo

UNIVERSIDAD DE CARABOBO Facultad de Ciencias de la Salud Dirección de Postgrado Sede Aragua Maestría en **CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN BIQQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR** 

Final Av. Leonardo Ruiz Pineda, la Morita II / Sede Aragua Teléfono: (0243) 2710569-2710296 Ext. 207

..... Luz de una tierra inmortal

## DEDICATORIA

A ti madre, por siempre contar con tu apoyo incondicional, tus palabras de aliento y por los sacrificios infinitos para alcanzar las metas trazadas. **Para ti con todo mi amor...** 

## AGRADECIMIENTO

*Le agradezco a Dios por haberme permitido vivir este día para cumplir esta gran meta y por acompañarme en cada momento de mi vida.* 

A mis Padres, Elsa y Dimas por darme la vida, su amor, apoyo incondicional y por ser ejemplos de lucha y perseverancia, mi más valiosa fuente de inspiración.

A mi tutor Dr. Víctor Contreras, por su tiempo y esfuerzo en momentos tan difíciles, por sus sabios consejos en la realización de esta tesis y por brindarme sus conocimientos, su confianza, paciencia y dedicación.

A la Profesora María Consuelo Navarro por la confianza, tiempo y dedicación incondicional, por su amistad, sinceridad y apoyo en todo momento, por esas eternas horas en la presentación de los seminarios y aportar sus conocimientos para alcanzar esta meta.

A la gran familia del Instituto BioMolP, en especial al laboratorio de Protozoología por permitirme formar parte del equipo de trabajo y enseñarme no sólo en lo académico-laboral sino también en lo personal, por su compañía y gratos momentos vividos. A todos los miembros: Rosa Yanet Arteaga, Wilmer Pineda, Jhonny Albanese, Benito Vargas, Ana Rita De Lima, María Isabel Domínguez, Amanda De Lima, Oriana Mundaray, Dairy Martínez, Jenny Mejías y Ninfa Contreras.

A la Dra. Emilia Barrios por su paciencia, gran calidad humana, sus palabras de aliento, su asesoría y disposición a ayudarme.

A la Dra. Elizabeth Ferrer por sus enseñanzas, su dedicación a la investigación, por aclarar mis dudas e inquietudes y su orientación en material bibliográfico.

*A la Dra. Gladys Crisante del laboratorio de Investigaciones Parasitológicas "J. F. Torrealba" de la Universidad de Los Andes, por la donación de los sueros de fase aguda usados en esta tesis.*  A mis tesistas que me acompañaron en estos años y sus energías tan enriquecedoras que me hicieron ver la vida de un modo diferente: Dioglenny Ramírez, Andrea Ramos, María Fernanda Rodríguez, María Terán, Germary López, Irailyth Indriago, Anakarina Noguera, Glorieth González, Miliuska Hernández, Edith Guevara, Auridel Torres, Génesis Flores y Mariejean González.

A mis compañeros de postgrado que me han brindado su apoyo, respeto, cariño y por compartir tantos momentos juntos: Ángel Fernández, Henry Aguiar, Ana Fernández, Oswgladys Garrido, Viviana Quintero, Mercedes Viettri, Diana Cano, Dayana Requena, Mónica Fonseca, Elianee Useche, Enma Rueda, Carlos Alvarado, Mayorie Dakkak, Yuselin Mora, Fatima Da Conceicao.

A mi mejor amiga y colega, Carolina Fuentes, por siempre estar allí dandome ánimo y apoyándome. A Eduardo Padrón por siempre estar conmigo y alentarme a no parar pese a las adversidades, por escucharme y apoyarme en todo momento.

*A la Profesora Haifah Kuder y Lcda. Dariela Pacheco de la Escuela de Bioanálisis por amablemente permitirme la impresión de este manuscrito.* 

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC) que financiaron este trabajo mediante los proyectos: FONACIT S1-2001000683; CDCH-UC FCS: Proyectos 2003-005; 2006-006; 00212-07; 2010-001; 2014-004; Investigaciones Menores 067-2016; 021-2013; 011-2011; 180-2011; 0394-2010, 0461-2010; Equipamiento Institucional 2005-012.

A todos los aquí mencionados y a los que se me pueden llegar a olvidar: Muchas gracias.

## TRABAJOS REALIZADOS DURANTE ESTE PERÍODO DE TESIS

# 1.- El estadio amastigota precede la evolución del epimastigota durante la epimastigogénesis *in vitro* de *Trypanosoma cruzi*

Graterol D, Arteaga RY, Navarro MC, Domínguez MI, De Lima AR, Contreras VT. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 33(1): 72-79, 2013.

## 2.- Aproximaciones a la Tripomastigogénesis axénica de Trypanosoma cruzi

Graterol D, Arteaga R, Mundaray O, Pineda W, Navarro MC, Domínguez MI, De Lima AR, Contreras VT. LXIII Convención anual de AsoVAC, Valencia, Venezuela, 2013.

# 3.- *Trypanosoma cruzi*: Concentración de Suero Fetal Bovino, Tamaño del Inóculo y Edad de los Amastigotas son factores involucrados en la transformación Amastigota-Epimastigota

Graterol D, Domínguez MI, De Lima AR, Arteaga R, Pineda W, Navarro MC, Contreras VT. LXI Convención Anual de AsoVAC, Maracay, Venezuela, 2011.

# 4.- *Trypanosoma cruzi:* Estudios morfológicos y moleculares de epimastigotas derivados de amastigotas primarios

Graterol D, Arteaga R, Pineda W, Navarro MC, Domínguez MI, De Lima AR, Contreras VT. LXIV Convención anual de AsoVAC, Caracas, Venezuela, 2014. (\*)

# 5.- Cambios morfológicos, proteicos, glicoproteicos y antigénicos de *Trypanosoma cruzi* cultivado en medio axénico con tensiones de oxígeno diferentes

Graterol D, Arteaga RY, Castillo A, Díaz G, Mundaray O, Pineda W, Navarro MC, Domínguez MI, De Lima AR, Contreras VT. Salus, 17(Supl): 4-11, 2013. (\*)

## 6.- Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* Dm28c en medio ML15-HA: Análisis proteico, glicoproteico y antigénico

Graterol D, Ramírez D, Ramos A, Arteaga RY, Mundaray O, Pineda W, Navarro MC, Domínguez MI, De Lima AR, Contreras VT. Salus, 17(Supl): 12-18, 2013. (\*)

# 7.- Cambios peptídicos, glicopeptídicos y antigénicos durante la Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* Dm28c en medio ML15-HA

Graterol D, Arteaga R, Ramírez D, Ramos A, Navarro MC, Domínguez MI, De Lima AR, Contreras VT. LXII Convención anual de AsoVAC, Caracas, Venezuela, 2012. (\*)

\*Trabajos relacionados y publicados durante este período (4, 5, 6, 7)

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMEN	xx
ABSTRACT	xxi
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Objetivo general	5
1.3. Objetivos específicos	5
1.4. Justificación	6
CAPÍTULO II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	8
2.1. Generalidades de la enfermedad de Chagas	8
2.2. Epidemiología. Situación actual	9
2.3. Morfología de Trypanosoma cruzi	11
2.4. Ciclo evolutivo de Trypanosoma cruzi	14
2.5. Fases clínicas de la enfermedad de Chagas	16
2.5.1. Fase aguda	17
2.5.2. Fase crónica	17
2.6. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas	
2.7. Proteínas y sueros hiperinmunes estadio específicos de T. cruzi	21
2.8. Fraccionamiento de proteínas de mezclas complejas mediante elect	roelución 24
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	
3.1. Reactivos	
3.2. Material biológico	

3.2.1. Parásitos y condiciones de mantenimiento
3.2.2. Producción de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c a 27°C y 37°C por cultivo en medio axénico
3.2.2.1. Obtención de tripomastigotas metacíclicos por inducción en medio TAU3AAG
3.2.2.2. Obtención de tripomastigotas tipo hemático en medio ML15-HA pH 7,0
3.2.2.2.1. Obtención de epimastigotas a 27°C en medio ML15-HA pH 7,0 31
3.2.2.3. Obtención de amastigotas por inducción de amastigogénesis extracelular primaria en medio ML15-HA pH 7,0
3.2.2.3.1. Obtención de epimastigotas a 37°C en medio ML15-HA pH 7,0 32
3.2.3. Obtención de antígenos
3.2.4. Obtención de sueros y preparación de las mezclas (pool)
3.3. Métodos
3.3.1. Análisis de las transformaciones morfológicas a epimastigotas mediante microscopia óptica
3.3.2. Producción y fraccionamiento de antígenos
3.3.2.1. Producción de antígenos totales
3.3.2.2. Obtención de las bandas antigénicas por electroelución múltiple36
3.3.3. Preparación de las muestras y determinación de proteínas
3.3.3.1. Precipitación de proteínas con TCA/DOC/Acetona
3.3.3.2. Determinación de proteínas mediante Bradford modificado
3.3.4. Caracterización de las proteínas
3.3.4.1. Análisis monodimensional de proteínas y glicoproteínas mediante electroforesis en condiciones disociantes (SDS-PAGE)
3.3.4.2. Tinción de proteínas mediante la técnica combinada de Coomassie- Plata40
3.3.4.3. Tinción de glicoproteínas mediante la técnica combinada del Ácido Periódico, Alcian Blue, Glutaraldehído, Plata (APABGP)40
3.3.5. Identificación de los antígenos mediante Dot Blot e Inmunobloting42
3.3.5.1. Análisis mediante <i>Dot Blot</i>
3.3.5.2. Análisis mediante Inmunobloting

3.3.6. Titulación de <i>pool</i> de sueros mediante la técnica de ELISA	44
3.3.7. Procesamiento y análisis de los resultados	46
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	47
4.1. Análisis de los cambios morfológicos y poblacionales de <i>T. cruzi</i> (Dm23 medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C durante la transformación de tripomast sobrenadantes de cultivo de células Vero en epimastigotas	8c) en tigotas 47
4.2. Análisis de los cambios morfológicos y poblacionales de <i>T. cruzi</i> (Dm28 medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C durante la transformación de amast extracelulares primarios en epimastigotas	8c) en tigotas 50
4.3. Caracterización del perfil proteico de los epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (Dm2) diferentes procedencias y temperaturas de cultivo	8c) de 53
4.4. Caracterización del perfil glicoproteico de los epimastigotas de <i>T</i> . (Dm28c) de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo	<i>cruzi</i> 55
4.5. Caracterización del perfil antigénico de los epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (Dr de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo empleando antisueros e específicos	m28c) estadio 57
4.6. Estandarización antigénica mediante <i>Dot-Blot</i> de los epimastigota diferentes procedencias y temperaturas de cultivo empleando <i>pool</i> de sueros	as de 60
4.7. Caracterización del perfil antigénico de los epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (Dr de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo empleando <i>pool</i> de suerc	m28c) os 63
4.8. Fraccionamiento de los antígenos de epimastigotas totales de <i>T. cruzi</i> (Dr de 27°C y 37°C por electroelución múltiple	m28c) 68
4.9. Caracterización de las bandas antigénicas fraccionadas de los epimastigo <i>T. cruzi</i> (Dm28c) de 27°C y 37°C empleando <i>pool</i> de sueros de pac chagásicos	tas de vientes 76
4.10. Evaluación de la calidad de los antígenos totales procedente epimastigotas de 27°C y 37°C mediante ELISA	es de 84
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	86
CONCLUSIONES	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

## ÍNDICE DE TABLAS

## TABLADESCRIPCIÓNPÁG.

- 1 Composición del medio L-15 Leibovitz utilizado para cultivo 30 de epimastigotas de *T. cruzi*
- 2 Cambios morfológicos y poblacionales de *T. cruzi* (Dm28c) en 48 medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C durante la transformación de tripomastigotas sobrenadantes de cultivo de células Vero en epimastigotas
- 3 Cambios morfológicos y poblacionales de *T. cruzi* (Dm28c) en 51 medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C durante la transformación de amastigotas extracelulares primarios en epimastigotas
- 4 Titulación mediante la técnica de ELISA de los *pool* de sueros 85 usando epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁG.
1	Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas	10
2	Morfología de diferentes estadios de Trypanosoma cruzi	12
3	Ciclo evolutivo de Trypanosoma cruzi	14
4	Visión esquemática en 3D del ciclo de <i>T. cruzi</i> en el hospedador invertebrado	15
5	Fases y formas de transmisión de la enfermedad de Chagas	16
6	Micrografía de luz de los cambios morfológicos de <i>T. cruzi</i> (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C durante la transformación de tripomastigotas sobrenadantes de cultivo de células Vero en epimastigotas, teñidos con Giemsa ácida	49
7	Micrografía de luz de los cambios morfológicos de <i>T. cruzi</i> (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C durante la transformación de amastigotas extracelulares primarios en epimastigotas, teñidos con Giemsa ácida	52
8	SDS-PAGE al 10% de las proteínas de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 teñidas con Coomassie-Plata	54
9	SDS-PAGE al 10% de las glicoproteínas de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 teñidas con APABGP	56

- 10 *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de 58 epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 revelado con suero anti-E
- *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de 59 epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 revelado con suero anti-TEMA
- 12 *Dot-Blot* de diferentes diluciones de *pool* de sueros de 61 pacientes chagásicos crónicos para identificar proteínas totales de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0
- 13 Dot-Blot de diferentes pool de sueros para identificar proteínas 62 totales de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0
- *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de 64 epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15 HA pH 7,0 revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos
- 15 Inmunobloting (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de 65 epimastigotas de T. cruzi (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 revelado con pool de sueros de pacientes chagásicos agudos
- *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de 66 epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 revelado con *pool* de sueros de pacientes de otras patologías
- 17 *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de 68 epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 revelado con *pool* de sueros de individuos sanos

- SDS-PAGE al 10% de las fracciones 1 al 10 de las proteínas 69 de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio
  ML15-HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y teñidas con Coomassie-Plata
- SDS-PAGE al 10% de las fracciones 11 al 20 de las proteínas 70 de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y teñidas con Coomassie-Plata
- 20 SDS-PAGE al 10% de las fracciones 1 al 10 de las proteínas 71 de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y teñidas con Coomassie-Plata
- SDS-PAGE al 10% de las fracciones 11 al 20 de las proteínas 72 de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y teñidas con Coomassie-Plata
- 22 SDS-PAGE al 10% de las fracciones 2 al 12 de las 73 glicoproteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y teñidas con APABGP
- 23 SDS-PAGE al 10% de las fracciones 13 al 23 de las 74 glicoproteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y teñidas con APABGP
- 24 SDS-PAGE al 10% de las fracciones 2 al 12 de las 75 glicoproteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y teñidas con APABGP

- 25 SDS-PAGE al 10% de las fracciones 13 al 23 de las 76 glicoproteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y teñidas con APABGP
- *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 2 al 12 de 77
  epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15 HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos
- Inmunobloting (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 13 al 23 de 78 epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos
- Inmunobloting (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 2 al 12 de 79 epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos
- Inmunobloting (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 13 al 23 de 80 epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y revelado con pool de sueros de pacientes chagásicos crónicos
- Inmunobloting (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 2 al 12 de 81
  epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15 HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y revelado con
  pool de sueros de pacientes chagásicos agudos
- Inmunobloting (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 13 al 23 de 82
  epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15 HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y revelado con pool de sueros de pacientes chagásicos agudos

- *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 2 al 12 de 83 epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos
- *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 13 al 23 de 84 epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos

## LISTA DE ABREVIATURAS

А	Amastigota
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
ASB14	Amidosulfobetaine-14, 3- [N, N- dimetil (3-myristoylaminopropyl) amonio] propanosulfonato
BSA	Seroalbúmina bovina
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CHAPS	3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato
DEAE	Dietilaminoetanol
Dm28	Aislado de T. cruzi de un rabipelado (Didelphis marsupialis)
Dm28c	Clon del aislado Dm28
DO	Densidad óptica
DOC	Desoxicolato de sodio
Е	Epimastigota
E-64	trans-epoxi-succinil-L-leucilamido-(4-guanidino)-butano
ECh	Enfermedad de Chagas
EDTA	Ácido etiléndiamino tetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno
HAI	Hemaglutinación indirecta
HCl	Ácido Clorhídrico
HEPES	Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinetanosulfónico
IEF	Isoelectrofocalización
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgG	Anticuerpo del isotipo γ
IgM	Anticuerpo del isotipo µ

kb	Kilobase
KCl	Cloruro de potasio
kDa	KiloDalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio monobásico
LITB	Medio de infusión de hígado y triptosa modificado
М	Molar
mA	Unidad de corriente eléctrica (miliamperio)
MEM	Medio Esencial Mínimo
MEMTAU	Medio MEM mas <sup>1</sup> / <sub>2</sub> de medio TAU3AAG
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ML15-HA	Medio L-15 (Leibovitz) suplementado con Hemina y Antibiótico
mM	Milimolar
MNC	Membrana de nitrocelulosa
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sodio dibásico
NaCl	Cloruro de sodio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de sodio monobásico
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
PBS	Tampón salino fosfato
PM	Peso molecular
PSG	Tampón fosfato glucosado
rpm	Revoluciones por minuto
SCB	Solución carbonato-bicarbonato
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SFB	Suero Fetal Bovino

Tripomastigota
Trypanosoma cruzi
Orina artificial de triatomino
Orina artificial de triatomino suplementada con aminoácidos (prolina, glutamato y aspartato) y glucosa
Ácido tricloroacético
Nα-p-tosil-L-cloro-lisina metil cetona
N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
Tris-hidroximetil-aminometano
Micrómetro
Micro molar
Micro litro
Unidad de voltaje (Voltios)
Línea celular de epitelio renal de mono verde africano Chlorocebus
Unidad de potencia eléctrica (Vatio o Watt)
Gravedades

#### RESUMEN

## ANÁLISIS ANTIGÉNICO DE EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* OBTENIDOS EN CONDICIONES AXÉNICAS A 27°C Y 37°C EMPLEANDO SUEROS DE PACIENTES CHAGÁSICOS.

Autor: Lcda. Diana Irene Graterol Romero. Tutor: Dr. Víctor Tulio Contreras Álvarez. Fecha: Octubre del 2017.

Epimastigotas (E) de Trypanosoma cruzi creciendo en cultivos axénicos a 27°C se usan rutinariamente para diagnóstico. Epimastigotas de 37ºC sobrenadantes de cultivos celulares se consideran formas degenerativas de cultivos envejecidos procedentes de tripomastigotas o de amastigotas. El nivel de semejanza se desconoce por cuanto no se pueden separar de su estadio de procedencia. Con la obtención de epimastigotas derivados de amastigotas primarios fue posible solventar el problema. Nuestro objetivo fue comparar epimastigotas de 37°C derivados de amastigotas extracelulares primarios (A) y epimastigotas de 27°C, derivados de tripomastigotas (T) inducidos en medio axénico. Se trabajó con el clon T. cruzi (Dm28c) incubando los A a 37°C y T a 27°C, en ML15-HA. Se compararon los cambios morfológicos y poblacionales por recuento en cámara de Neubaüer y tinción con Giemsa. Los perfiles proteicos y glicoproteicos se analizaron por SDS-PAGE y tinciones específicas. Los cambios antigénicos mediante Inmunobloting con suero hiperinmune antiepimastigotas (anti-E), anti-4estadios (anti-TEMA) y contra antígenos totales y fraccionados por electroelución usando pool de sueros de pacientes chagásicos agudos y crónicos. Nuestros resultados muestran que las cinéticas de transformación son diferentes según sea el estado de procedencia del epimastigota. Las transformaciones morfológicas están asociadas a cambios proteicos y glicoproteicos diferentes, relacionados con el estadio de procedencia y parece culminar morfológica y molecularmente en un epimastigota estándar surgido del cultivo axénico por tiempo prolongado. Mediante sueros hiperinmunes antiestadio se evidenció la existencia de antígenos epimastigota específicos asociados a la procedencia, esos antígenos parece no tener relevancia para usarlos en técnicas serológicas convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Abordajes inmunológicos más finos son necesarios para validar o descartar la utilidad de esos antígenos con fines diagnósticos. Sin embargo, es de interés analizar la dinámica a nivel proteómico que confirmen la condición de estadios de transición de estos epimastigotas.

Palabras Claves: Trypanosoma cruzi, epimastigotas, Medio ML15-HA.

### ABSTRACT

## ANTIGENIC ANALYSIS OF EPIMASTIGOTES OF *Trypanosoma cruzi* OBTAINED IN AXENIC CONDITIONS AT 27°C AND 37°C USING CHAGAS PATIENTS' SERA.

Author: Lcda. Diana Irene Graterol Romero. Tutor: Dr. Víctor Tulio Contreras Álvarez. Date: October 2017.

Epimastigotes (E) from Trypanosoma cruzi growing on axenic cultures at 27°C are routinely used for diagnosis. Epimastigotes of 37°C supernatants from cell cultures are considered degenerative forms of aged cultures from trypomastigotes or amastigotes. The level of similarity is unknown because it can not be separated from its stage of origin. With the obtaining of epimastigotes derived from primary amastigotes it was possible to solve the problem. Our objective was to compare 37°C epimastigotes derived from primary extracellular amastigotes (A) and epimastigotes of 27°C, trypomastigote (T) derived induced in axenic medium. Worked with the T. cruzi clone (Dm28c) incubating the A at 37°C and T at 27°C, in ML15-HA. Morphological and population changes were compared by counting in Neubaüer chamber and Giemsa staining. Protein and glycoprotein profiles were analyzed by SDS-PAGE and specific stains. Antigenic changes by Immunoblotting antiepimastigotes (anti-E), anti-stage (anti-EMAT) hyperimmune sera and against total and fractionated antigens by electroelution using pooled sera from acute and chronic chagasic patients. Our results show that the transformation kinetics is different according to the state of origin of the epimastigote. Morphological transformations are associated with different protein and glycoprotein changes related to the stage of origin and appear to culminate morphological and molecularly in a standard epimastigote emerged from axenic cultivation for prolonged time. Through anti-stage hyperimmune sera evidenced epimastigote specific antigen associated with the origin, these antigens seem to have no relevance to use in conventional serological techniques for the diagnosis of Chagas' disease. Immunological approaches are needed to validate or discard the utility of these antigens for diagnostic purposes. However, it interest to analyze the dynamics at proteomic level that confirm the condition of transitional stages of these epimastigotes.

Key words: Trypanosoma cruzi, epimastigotes, Medium ML15-HA.

## **CAPÍTULO I**

## **1. EL PROBLEMA**

#### 1.1. Planteamiento del problema

*Trypanosoma cruzi (T. cruzi)*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas (ECh), es un protozoo flagelado que tiene un ciclo de vida natural que involucra dos tipos de hospedadores: los mamíferos (incluyendo al hombre) y el insecto vector hematófago (triatomino o chipo). En el insecto vector se identifican los estadios epimastigotas y tripomastigotas metacíclicos, estos últimos son eliminados con las heces y orina del insecto y son las formas parasitarias infectantes para el vertebrado. Estos metacíclicos invaden las células y en el mamífero se multiplican como amastigotas, se diferencian intracelularmente a tripomastigotas y conducen al estallido de la célula, con liberación de tripomastigotas sanguícolas (Tyler y Engman, 2001; Goldenberg y Avila, 2011).

Los estadios presentan morfologías diferentes que cambian durante el ciclo vital del parásito (De Souza, 2002; De Lima y col., 2007). Además de estas morfologías, otras formas intermedias se describen en el ciclo celular del parásito, lo que lleva a algunos autores a sugerir una transformación continua entre estadios sin distinción del hospedador vertebrado o invertebrado (Almeida de Faria y col., 1999; Tyler y Engman, 2001). En particular, existen evidencias de una forma epimastigota en el hospedador vertebrado y en células de cultivo de tejidos (Faucher y col., 1995; Almeida de Faria y col., 1999; Tyler y Engman, 2001; Tonelli y col., 2004) indicando que el estadio epimastigota podría ser parte de los estadios del hospedador vertebrado. Las formas intermedias aparecen transitoriamente en la diferenciación de amastigotas a tripomastigotas y comparten características de ambos estadios, aunque

sus propiedades predominantes son de epimastigotas, incluyendo la morfología general (Almeida de Faria y col., 1999; Contreras y col., 2006).

Las transformaciones morfológicas de un estadio a otro están asociadas a procesos de diferenciación molecular que son disparados por factores como temperatura, pH, tensión de oxígeno y estrés nutricional. Los eventos se inician con la transmisión desde el insecto vector al hospedador vertebrado, donde los parásitos experimentan un aumento de temperatura. Así como un cambio de ambiente extracelular en el insecto a una localización intracelular, donde es expuesto a otros cambios como disminución del pH y exposición a agentes oxidantes tóxicos. Estos procesos de transformación morfológica y molecular pueden ser estudiados *in vitro* e *in vivo* en parásitos mantenidos bajo condiciones controladas en el laboratorio simulando los eventos que ocurren en la naturaleza (Contreras y col., 2006).

*T. cruzi* es un tripanosomatídeo genéticamente heterogéneo con capacidad para reproducir *in vitro* las fases de multiplicación y diferenciación que ocurren en la naturaleza, el ciclo de vida en el hospedador vertebrado se puede simular cuando se infectan cultivos celulares con *T. cruzi* (Pan, 1971; De Souza, 2002) y del invertebrado, al inocular sangre de un animal infectado en un medio de cultivo a temperatura ambiente pasando por las mismas etapas de crecimiento y diferenciación que ocurren en el tracto digestivo del insecto vector (Brener, 1973; Zeledon y Rabinovich, 1981). El cultivo *in vitro* de *T. cruzi* en condiciones axénicas no sólo se emplea para la producción de antígenos para diagnóstico, sino también para el estudio del parásito desde el punto de vista inmunológico, metabólico, bioquímico, genético y de morfogénesis (Pan, 1978; Schuster y Sullivan, 2002).

Ha sido reportado la presencia de formas epimastigotas creciendo en el sobrenadante envejecido de cultivos celulares *in vitro* a la temperatura del hospedador vertebrado (37°C). Así como también que células Vero infectadas con *T. cruzi* en

pocos días los amastigotas se transforman en epimastigotas (Contreras y col., 2006). Se plantea la cuestión de si este estadio es una etapa intermedia obligatoria en la diferenciación de los amastigotas a tripomastigotas, cuyo tiempo de permanencia es dependiente de las condiciones medioambientales o representa un mecanismo para la sobrevivencia del parásito en condiciones adversas. La presencia de esta morfología no había sido estudiada con detenimiento por considerar que carecía de significación biológica, desde el momento mismo que los epimastigotas fueron considerados estadios exclusivos del hospedador invertebrado.

Cada vez se acumulan más evidencias indicando que el estadio epimastigota podría ser parte de los estadios del hospedador vertebrado. Faucher y col., (1995) dieron evidencias concluyente sobre la existencia de una forma tipo-epimastigota en menos de 1% de las células infectadas usando un anticuerpo monoclonal específico para epimastigotas. Almeida de Faria y col., (1999) demostraron la presencia de una forma tipo-epimastigota transitoria como intermediario en la diferenciación de amastigotas a tripomastigotas, proponiendo identificarla como epimastigota intracelular el cual es un estadio de transición obligatorio cuyo tiempo de permanencia en el citoplasma de la célula hospedadora es dependiente de las condiciones medioambientales. Tonelli y col., (2004) trabajando con un linaje de células dependiente de L-prolina cultivada a 33°C lograron arrestar la diferenciación hacia tripomastigota suplementando el medio con L-prolina.

En condiciones naturales también se evidenció al estadio epimastigota como formando ser parte de los estadios del hospedador vertebrado. Deane y col., (1984) reportaron el crecimiento de formas epimastigotas y su diferenciación a metacíclicos en la glándula odorífera de *Didelphis marsupialis* reservorios de *T. cruzi*, evidenciando que estas formas propias del vector pueden existir en el hospedador vertebrado. Vale destacar, que los eventos de crecimiento y diferenciación en el

interior de la glándula, ocurre a una temperatura de 35°C (temperatura de la piel) mayor que en el insecto y menor que en las vísceras de los mamíferos homeotermos (Carreira y col., 2001). El estadio epimastigota durante la transición de amastigota a tripomastigota y en ubicaciones espurias en el vertebrado, sin estudios que expliquen su significación biológica, excluye que los epimastigotas derivados de amastigotas primarios sean solo artefactos metodológicos. En *T. cruzi* la expresión génica antecede la diferenciación morfológica (Contreras y col., 1985), esto es, los genes que se expresan en los tripomastigotas y amastigotas por Tonelli y col., (2004) y en los epimastigotas extracelulares referidos por Graterol y col., (2014). La revisión bibliográfica nos lleva a proponer la investigación de estos epimastigotas de 37°C derivados de amastigotas primarios como una primera aproximación al estudio de estadios singulares y formas de transición presentes en el ciclo vital de *T. cruzi*.

## Objetivos de la Investigación

### 1.2. Objetivo general

Analizar el perfil proteico, glicoproteico y antigénico de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* Dm28c obtenidos en condiciones axénicas a 27°C y 37°C.

#### 1.3. Objetivos específicos

- Producir formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* Dm28c a 27°C y 37°C por cultivo en medio axénico.
- 2.- Identificar mediante microscopia óptica las formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* Dm28c de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo.
- Caracterizar el perfil proteico y glicoproteico de los epimastigotas de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo.
- 4.- Caracterizar el perfil antigénico de los epimastigotas de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo con antisueros estadio específico y *pool* de sueros de pacientes chagásicos.
- 5.- Fraccionar por electroelución múltiple los antígenos de epimastigotas totales de 27°C y 37°C y caracterizar las bandas antigénicas fraccionadas mediante *Inmunobloting* con *pool* de sueros de pacientes chagásicos.
- 6.- Evaluar la calidad de los antígenos totales procedentes de epimastigotas de 27°C y 37°C para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas mediante ELISA usando sueros de pacientes chagásicos confirmados.

#### 1.4. Justificación

Ferrer (2015) en una detallada actualización de técnicas moleculares para el diagnóstico de la ECh destaca la baja sensibilidad de las técnicas parasitológicas y la baja especificidad de las inmunológicas frente a la utilidad de los métodos moleculares en la fase aguda de la ECh, en Chagas congénito y en pacientes con inmunodeficiencias. A la vez, recomienda la incorporación de los métodos moleculares al grupo de pruebas diagnósticas de la ECh. La comparación de las técnicas inmunológicas (ELISA, HAI e IFI) con las técnicas moleculares (PCR para la amplificación de ADN de minicírculo de kinetoplasto y ADN satélite) mostró que la eficacia diagnóstica de las técnicas moleculares es elevada en la fase aguda, mientras que en la fase crónica son más eficaces los ensayos inmunológicos (Ferrer y col., 2013). Es evidente que, métodos diagnósticos basados en la detección de anticuerpos contra T. cruzi continúan siendo ampliamente utilizados (Cooley y col., 2008) y los antígenos de T. cruzi más usados son las formas del vector (epimastigotas, 84%) que se cultivan en el laboratorio, mientras que las formas del vertebrado (tripomastigotas, 9% y amastigotas 7%) se utilizan menos por ser de más laboriosa obtención (Primavera y col., 1990). Por la facilidad de su producción masiva en el laboratorio, los epimastigotas de cultivo a 27°C son el material antigénico más utilizado en las técnicas inmunológicas. No conseguir en la bibliografía trabajos usando epimastigotas procedentes de cultivos a 37°C plantea interrogantes que deben ser dilucidadas.

Se ha descrito que los estadios del vertebrado tienen mayor especificidad diagnóstica que los del invertebrado obtenido rutinariamente en cultivos a 27°C (Primavera y col, 1990). Adicionalmente a esto, no se han encontrado reportes que estudien la similitud entre los epimastigotas crecidos a 27°C y 37°C. La mayor limitación metodológica a considerar para realizar estudios comparativos entre epimastigotas en cultivos celulares, derivados de amastigotas es garantizar la no

"contaminación" con epimastigotas derivados de tripomastigotas. Con el desarrollo del protocolo para la producción de amastigotas primarios (Contreras y col., 2002) derivados de metacíclicos en un medio químicamente semi-definido MEMTAU es posible solventar el problema de la mezcla de epimastigotas derivados de tripomastigotas. Hay evidencias que el estrés induce la diferenciación de los amastigotas hacia epimastigotas a 37°C y que estos pueden ser mantenidos en medios comunes MEMTAU y en un medio único químicamente semi-definido ML15-HA (Graterol y col., 2011). De ahí que, al disponer de estos abordajes metodológicos se hace factible comparar morfología, proteínas, glicoproteínas y expresión antigénica de epimastigotas derivados de tripomastigotas y crecidos a 27°C y los derivados de amastigotas extracelulares primarios y crecidos a 37°C utilizando un medio común de crecimiento para ambos epimastigotas. Adicionalmente, se abre la posibilidad de una línea de investigación inédita con nuevas interrogantes tanto a nivel de la morfogénesis de *T. cruzi* como su potencial utilidad en el diagnóstico de la ECh.

## **CAPÍTULO II**

## 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

#### 2.1. Generalidades de la enfermedad de Chagas

La ECh o tripanosomiasis americana es una antropozoonosis que afecta millones de pobladores rurales y urbanos en Venezuela y Latinoamérica (Dias y col., 2002). Esta enfermedad fue descubierta en 1909 en Brasil por el Doctor Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, quien describe la forma aguda de la enfermedad en Berenice Soares de Moura, una niña de dos años que muere a los 82 años infectada y sin haber padecido la enfermedad; así mismo, describe la morfología y ciclo biológico del parásito en hospedadores vertebrados e insectos transmisores y realiza observaciones del curso de la infección en animales de laboratorio y cultivos (Chagas, 1909).

La enfermedad tiene como agente etiológico a *T. cruzi*, protozoo hemoflagelado que pertenece taxonómicamente a la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida* por poseer una organela característica denominada kinetoplasto, localizada en la base del flagelo. El parásito es transmitido principalmente a través del contacto con la materia fecal de insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae (Hemiptera: Reduviidae)* conocidos como triatominos o chipos, los cuales son los vectores de la enfermedad (Brener, 1973).

Otros mecanismos son la transmisión por transfusión sanguínea y por transplante de órganos (Díaz-Bello y col., 2008). Puede llevarse a cabo también la transmisión vertical de la madre al feto por vía transplacentaria y con menor frecuencia por ingestión de leche materna (Otero y col., 2012; Carlier y col., 2015).

Los accidentes en laboratorio son raros y la ingestión de artrópodos infectados, de carne cruda o insuficientemente cocida y de alimentos o bebidas contaminadas con materia fecal de triatominos o con orina, secreciones de las glándulas anales y con heces de marsupiales infectados, han sido descritos (Dias, 2006; Alarcón de Noya y col., 2010; Alarcón y col., 2011; Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012).

Originalmente, la tripanosomiasis americana debió ser una enfermedad endozoonótica manteniéndose el ciclo a través de animales salvajes, transformándose, en una enfermedad antropozoonótica, al invadir el hombre los ecosistemas salvajes y ocupar el espacio físico perteneciente a estos mediante su acción desforestadora al construir viviendas en dichos lugares, donde los triatominos han podido adaptarse fácilmente (Coura, 2007).

### 2.2. Epidemiología. Situación actual.

La infección por *T. cruzi* constituye un problema de salud pública de relevancia social y económica que afecta a 21 países de América Latina (Figura 1), desde el sur de EEUU hasta el sur de Chile y Argentina (Mathers y col., 2007), con gran diversidad en las características de transmisión, cuadros clínico-patológicos y tasas de incidencia y prevalencia de la infección. Según estadísticas publicadas en 2016 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas, con una incidencia de hasta 200.000 casos y millares de muertes (OMS, 2016).

En Venezuela, esta enfermedad es importante no solo por su prevalencia que oscila entre 7,2 y 16,3% en diferentes localidades (Bonfante-Cabarcas y col., 2011), sino por la presencia de focos de transmisión activa en pobladores menores de 10 años, lo que le da a esta patología carácter de enfermedad re-emergente y particularmente en el estado Carabobo (Cannova y col., 2003; Añez y col., 2004;

Traviezo y Bonfante-Garrido, 2004; Flores, 2005). Sin embargo, existe un grave problema de sub-registro, esto debido a casos no diagnosticados o no reportados al Ministerio del Poder Popular para la Salud, lo que trae como consecuencia una subestimación de la enfermedad en el país.



Figura 1: Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas. Zonas endémicas en gris y antropozoonóticas en blanco (Coura y Dias, 2009).

En áreas endémicas rurales, el parásito se transmite a los seres humanos y otros mamíferos principalmente por vía vectorial a través del contacto con la materia fecal del insecto hematófago de la subfamilia *Triatominae* (Dias, 2000). De esta subfamilia los géneros *Rhodnius*, *Triatoma y Panstrongylus* tienen particular importancia epidemiológica en Venezuela. La existencia de otras vías de transmisión del parásito ha sido descrita (Díaz-Bello y col., 2008; Carlier y col., 2015). Recientemente, Alarcón de Noya detectó una microepidemia urbana de Chagas agudo de transmisión oral en la comunidad educativa Andrés Bello en el municipio Chacao en Caracas (Alarcón de Noya y col., 2010) y una segunda en la población de Chichiriviche de la Costa en abril 2009 (Alarcón de Noya y Martínez, 2009), lo cual pudiera ser resultado de dificultades técnicas para controlar la enfermedad asociado a modificaciones de

los hábitos de los triatominos (Añez y col., 2003). La detección de estos brotes de Chagas agudo plantea la necesidad de considerarla una enfermedad re-emergente, dado que en el país se desconocía hasta el momento, esta vía de transmisión (MPPS, 2014). Sosa-Estani y Segura (2015) en una revisión reciente sobre el control de la enfermedad y su eliminación como problema de salud pública concluyen que si bien no puede ser erradicada debido a la existencia de triatominos silvestres en contacto con el ciclo doméstico, sin embargo, es posible interrumpir la transmisión del parásito y reducir la pesada carga de esta enfermedad. Más recientemente, en un artículo español analizan las diferentes variables que permiten el mantenimiento de la enfermedad en Latinoamérica y refiere localidades donde se ha podido reducir significativamente las cifras de incidencia (Moriana y col., 2016). En abril de 2017, se publicó el boletín epidemiológico del Ministerio de la Salud con cifras correspondientes al período junio-julio de 2015 y no se hace referencia a la ECh.

#### 2.3. Morfología de Trypanosoma cruzi

*T. cruzi* presenta durante su ciclo evolutivo cuatro estadios con propiedades biológicas diferentes; dos de esos estadios están en el hospedador invertebrado (vector) a 27°C, los *epimastigotas* y los *tripomastigotas metacíclicos* y los otros dos en el vertebrado (hombre y animales salvajes) a 37°C, los *amastigotas* y los *tripomastigotas sanguíneos o hemáticos* (Brener, 1973). El parásito se caracteriza por la presencia de un único flagelo que desaparece en la fase o estadio de vida intracelular. Contiene en su citoplasma una única mitocondria muy desarrollada y cuya matriz engloba un largo filamento de ADN estrechamente empaquetado, llamado kinetoplasto. El flagelo puede estar formando el borde de una membrana ondulante o ser libre en toda su longitud y desaparecer externamente, reduciéndose entonces a un axonema intracitoplasmático cuando vive como parásito intracelular (Berenguer, 2007). Las tres morfologías básicas del *T. cruzi* se definen por su forma,

la posición del kinetoplasto respecto al núcleo y la región por donde emerge el flagelo (Figura 2) y son los siguientes:





Figura 2: Morfología de diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi*. A. Amastigota. B. Epimastigota. C. Tripomastigota. (Teixeira y col., 2012).

- Amastigota: Es la forma de multiplicación intracelular del mamífero, se caracteriza por sus pequeñas dimensiones (2-3 µm de diámetro) y contorno circular, ovoide o fusiforme. El citoplasma es escaso y el núcleo es relativamente grande, redondo y excéntrico. El kinetoplasto tiene forma de barra, grande cercano al núcleo y el flagelo se reduce a un pequeño segmento intracelular. Esta forma proviene de la diferenciación de los tripomastigotas, tanto metacíclicos como sanguíneos y tiene la capacidad de infectar a otras células.
- Epimastigota: Es la forma de multiplicación del parásito dentro del vector, no infectiva para el ser humano o mamífero. Es de aspecto fusiforme con 20 a 25 µm de longitud. Posee cuerpo alargado, núcleo en la porción media del cuerpo y se multiplican mediante división binaria. Posee flagelo libre que favorece su locomoción y kinetoplasto en forma de barra, localizándose en la mitad anterior del parásito y delante del núcleo, con presencia de una membrana ondulante en esa región del cuerpo. Se multiplica de manera profusa en el tubo digestivo de los triatominos y en los medios de cultivo.
- Tripomastigota: Es una forma no replicativa pero infectiva para el humano u otros mamíferos y es de localización extracelular. Tiene un cuerpo alargado con 20 a 25 µm de longitud, puede adoptar forma de "C" o "S". Posee un núcleo alargado y redondeado ubicado en la porción media del parásito, presenta un kinetoplasto circular en forma de bastón grueso o redondeado muy próximo a la extremidad posterior y un flagelo libre con su membrana ondulante que bordea todo el cuerpo. Existen dos tipos: el tripomastigota sanguícola, que se localiza fundamentalmente en sangre periférica del hospedador vertebrado y el tripomastigota metacíclico, localizado en la ampolla rectal del insecto y es eliminado con la orina (De Souza, 2002).

### 2.4. Ciclo evolutivo de Trypanosoma cruzi

*T. cruzi* posee un ciclo de vida complejo que incluye la infección del hospedador vertebrado (Figura 3) y la transmisión por insectos vectores (Figura 4). Los hospedadores definitivos son animales vertebrados y el hombre. Entre los animales domésticos están el perro y el gato; entre los silvestres figuran cachicamos, rabipelados, murciélagos y roedores (Brener, 1973). El ciclo de vida comienza cuando el triatomino ingiere tripomastigotas sanguícolas de la sangre de un vertebrado infectado. Esta morfología en el estómago del insecto se transforma a la forma epimastigota, se multiplica y luego se transforma a tripomastigotas metacíclicos que es la forma infectante para el hombre y otros mamíferos; estas formas se ubican a nivel de la ampolla rectal del insecto (Figura 4) y cuando el triatomino vuelve alimentarse de sangre de un individuo sano, las formas infectantes



**Figura 3: Ciclo evolutivo de** *Trypanosoma cruzi* (Tomado de http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html)


### Figura 4: Visión esquemática en 3D del ciclo de *T. cruzi* en el hospedador invertebrado.

**A.** Insecto vector ingiriendo tripomastigotas presentes en sangre del hospedador vertebrado. **B.** En el estómago del insecto los tripomastigotas se transforman en epimastigotas y esferomastigotas. **C.** Los epimastigotas se multiplican en el intestino y se anclan a la membrana perimicrovilar de las células intestinales. **D.** La adherencia ocurre predominantemente a través de la región del flagelo. **E.** En la región posterior del intestino, muchos de los epimastigotas se transforman en tripomastigotas metacíclicos y se adhieren a la cutícula del epitelio de la bolsa rectal del insecto. **F.** Cuando los parásitos salen del epitelio, los tripomastigotas metacíclicos son eliminados en la orina o excrementos del insecto (Teixeira y col., 2012).

se eliminan con las heces y orina del insecto e invaden al nuevo hospedador a través del orificio de la picadura y penetran las células cercanas. Dentro de la célula se transforman en amastigota, para comenzar allí la multiplicación y en el citoplasma invadido (nido de amastigotas) empieza una rápida transformación hacia tripomastigota, que al adquirir movimiento lisan la célula que los contienen liberando los tripomastigotas sanguícolas para invadir nuevas células y tejidos o ser ingeridos por el insecto vector (Figura 3) y así completar el ciclo (Goldenberg y Avila, 2011).

### 2.5. Fases clínicas de la enfermedad de Chagas

Actualmente, según Consenso Internacional sobre etapa indeterminada de la ECh, se definen 2 fases en la infección: *aguda* y *crónica* (Mordini, 2010). Las alteraciones descriptas en cada una de estas fases suelen ser diversas y dependen tanto del contexto genético del hospedador, de la edad, forma de transmisión (Figura 5), su



**Figura 5. Fases y formas de transmisión de la enfermedad de Chagas** (Tomado de <u>http://www.fac.org.ar/neuquen/cientifica/Guias\_chagas\_2012.pdf</u>).

estado inmunológico y nutricional, como de las características biológicas del parásito (cepa, virulencia, inóculo) (Coura, 2007).

### 2.5.1. Fase aguda

Se inicia entre 4 y 10 días después de haberse producido la infección que suele durar unos dos meses y en general es asintomática en el 90% de los infectados. Se caracteriza por un parasitemia relativamente elevada y por presentar síntomas de origen local, mejor conocidos como signos de puerta de entrada, ya que dependen del sitio por el cual penetre el parásito al cuerpo, aquí se encuentran el **signo de Mazza-Romaña** si la vía de entrada es través de la mucosa ocular y el **chagoma de inoculación** si penetra a través de la piel; también hay síntomas de origen sistémico que tienen una intensidad variable, y puede cambiar desde un síndrome febril hasta hipertermias. Excepcionalmente, y solo en niños o pacientes inmunocomprometidos, pueden presentarse formas severas con miocarditis aguda o severa, con pericarditis y meningo-encefalitis (MPPS, 2014).

En la infección por vía oral las manifestaciones clínicas son más severas y con particularidades como lo es el edema facial, más notorio en niños, mientras que en los adultos se puede presentar con edema generalizado o anasarca (Alarcón de Noya y col., 2010). La existencia de una relativamente elevada parasitemia durante esta fase permite realizar el diagnóstico de la infección por métodos directos. Ante un avance favorable, la respuesta inmune controla la carga parasitaria en circulación y tejidos (Moncayo y Ortiz Yanine, 2006), dando paso a la etapa crónica de la infección.

### 2.5.2. Fase crónica

Una vez transcurrida la etapa aguda de la infección, la respuesta inmune del hospedador logra controlar la parasitemia dando comienzo a la siguiente fase de la

infección. La fase crónica es la etapa posterior a la aguda, en la cual los pacientes, con serología positiva, pueden o no poseer signos y síntomas clínicos.

Se caracteriza por una parasitemia baja concomitantemente con elevados títulos de anticuerpos IgG. Se estima que ~30% de los chagásicos tendrían manifestaciones de la etapa crónica, lo que podría aumentar al emplear métodos diagnósticos más sensibles. Durante la fase crónica, hasta un 40% de los casos presentan lesiones que afectan a órganos internos tales como el corazón, el esófago o el colon y al sistema nervioso autónomo. Tras varios años de infección asintomática, del 20% al 30% de las personas infectadas sufren lesiones cardiacas (que pueden producir muerte súbita), del 5% al 10% de lesiones del aparato digestivo (típicamente, agrandamiento del esófago o del colon), disfagia, dolor epigástrico, regurgitación, estreñimiento prolongado, distensión abdominal y los pacientes inmunodeprimidos presentan afectación del sistema nervioso central (Rassi y col., 2010).

En esta fase, la infección es detectable principalmente por métodos inmunológicos (que demuestran la respuesta inmunológica del hospedador frente al parásito) y también por métodos moleculares. La severidad de la enfermedad en el humano, se atribuye al pleomorfismo natural que tienen las cepas de *T. cruzi* lo cual se evidencia estudiando sus aspectos biológicos, bioquímicos y moleculares; se cree que el vector influye en las diferencias del comportamiento de las cepas (Guzmán-Marín y col., 1999).

### 2.6. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

El diagnóstico de la ECh reviste unas características especiales debido a que, según la etapa en la que se encuentre el paciente se utilizará técnicas de búsqueda del parásito, o bien técnicas de detección de parásitos. La primera fase de la enfermedad, la fase aguda, se caracteriza por una parasitemia elevada, detectable por medios parasitológicos directos. La parasitemia desciende paulatinamente y se instaura la fase crónica (asintomática o sintomática). En esta fase la parasitemia persiste pero es difícilmente detectable. En fase crónica hay una elevada producción de anticuerpos específicos de tipo IgG que son fácilmente detectables por técnicas serológicas. Estos anticuerpos, en la mayoría de los pacientes estarán presentes durante toda la vida.

Para el diagnóstico de la enfermedad en la fase aguda, se emplean métodos que evidencien directa o indirectamente los parásitos en sangre. Las pruebas más utilizadas para la demostración directa del parásito son: (a) el examen al fresco, (b) los extendidos de sangre coloreados y (c) el examen de gota gruesa. Para la demostración indirecta del parásito son: (a) el hemocultivo, (b) el xenodiagnóstico y (c) la infección de animales sensibles. En las diferentes fases de la enfermedad (aguda y crónica) cuando la parasitemia es escasa, la infección parasitaria se detecta usando técnicas inmunológicas por cuanto al inicio de la infección aparecen anticuerpos IgM, los cuales son sustituidos gradualmente por IgG (Dutra y col., 2005).

Las técnicas inmunológicas desarrolladas para el diagnóstico serológico de la ECh son: (a) la reacción de fijación de complemento o Machado-Guerrreiro, (b) la reacción indirecta de anticuerpos fluorescentes (RIAF), (c) hemaglutinación pasiva o indirecta (HAI), (d) la reacción de anticuerpos líticos sanguíneos (ALBA), (e) radioinmunoensayo (RIA), (f) *Inmunobloting* y la técnica de ELISA, que parece ser el método de preferencia en la mayoría de laboratorios clínicos (Contreras, 1994). Adicionalmente, técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de alta especificidad y sensibilidad y de alto costo para estudios más específicos (Kirchhoff y col., 1996).

Actualmente, los ensayos diagnósticos disponibles comercialmente están basados sobre fracciones antigénicas totales o semi-purificadas procedentes de epimastigotas de *T. cruzi* mantenidos en el laboratorio por varios años en cultivos axénicos, lo cual representa una condición artificial de mantenimiento (condición cultivo) distinta a la alternancia vector/vertebrado que ocurre en la naturaleza (condición triatomino). Como la fracción antigénica de los epimastigotas es una mezcla heterogénea de diferentes moléculas, una variable a considerar en el desarrollo de antígenos para el diagnóstico de la ECh es la posibilidad de falsos positivos por reacción cruzada con antígenos comunes de otros tripanosomatídeos como Leishmania sp. y Trypanosoma rangeli (Chiller y col., 1990), los cuales pueden ser excluidos o confirmados complementando el diagnóstico con la técnica de Inmunobloting (Saldaña y Sousa, 1996), considerada como la técnica inmunológica confirmatoria en el diagnóstico de diversas enfermedades y que puede ser utilizada identificar aquellas fracciones antigénicas para específicas que son inmunológicamente relevantes para confirmar la ECh. Reiche y col., (1998) encontró que la técnica tenía una sensibilidad del 86,6% y una especificidad del 100%, mientras que Umezawa y col., (2009) y Nakazawa y col., (2001) reportaron una sensibilidad y especificidad del 100%, Otani y col., (2009) una sensibilidad del 99% y especificidad de 100% y Sánchez y col., (2001) una especificidad del 100%.

Cervantes-Landín y col., (2014) trabajando con formas epimastigotas estandarizaron la técnica de Dot-ELISA y la compararon con la técnica de ELISA y Western blot para el diagnóstico de pacientes chagásicos crónicos de la ECh. Reportaron una buena correlación entre el Dot-ELISA y las otras dos pruebas. Recomiendan la técnica de Dot-ELISA como una prueba de screening (cribado inicial), por ser económica y sencilla de aplicar en estudios de campo y bancos de sangre. Vale destacar que si bien el análisis por *Inmunobloting* ha mostrado alta sensibilidad y especificidad para confirmar los resultados obtenidos con las pruebas serológicas convencionales (Reiche y col., 1998), no ha sido posible encontrar dos patrones idénticos entre las muestras de sueros de pacientes chagásicos usando epimastigotas de una cepa de *T. cruzi* (O'Daly y col., 1994; Sánchez y col., 2001).

Aún no se cuenta con un estándar de oro para el diagnóstico de la ECh, por lo que el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS, 2014), considera necesaria la detección de anticuerpos anti *T. cruzi* con por lo menos dos técnicas de principio diferentes, como el ELISA y el *Inmunobloting*. En conjunto, ambas pruebas alcanzan el 95 a 98% de sensibilidad y especificidad; sin embargo, cuando existe un conflicto de diagnóstico, la OMS (1991) sugiere el uso de una tercera prueba confirmatoria como las técnicas moleculares. Existen evidencias mostrando la imposibilidad de establecer relación directa entre aislados del parásito (tipificados con los distintos marcadores moleculares) y las manifestaciones clínicas de la ECh. Además, al tratar de comparar técnicas inmunológicas con ensayos moleculares se encuentra variabilidad de concordancia entre esas técnicas. Esta variabilidad se debe a que son pruebas de distinta naturaleza y detectan cosas diferentes, donde no necesariamente se encuentra concordancia (Wincker y col., 1994; Aguiar y col., 2012; Ferrer y col., 2013; Ferrer, 2015).

Es bien sabido, que la especificidad de cualquier técnica diagnóstica, depende más de la calidad del antígeno que del método empleado. Algunos datos sugieren que ciertos estadios del parásito son mejores antígenos para el diagnóstico de diferentes formas clínicas de la ECh (Matsumoto y col., 1993; De Lima y col., 2001), pero la utilidad del repertorio antigénico de los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* aún no se ha estudiado con fines diagnósticos, en particular el estadio epimastigota que se produce espontáneamente a 37°C, por lo tanto, valdría la pena investigar los perfiles proteicos, glicoproteicos y antigénicos de los epimastigotas de 27°C y 37°C y determinar si en sueros de pacientes chagásicos podría encontrarse anticuerpos contra epimastigotas de 37°C así como establecer su utilidad diagnóstica.

### 2.7. Proteínas y sueros hiperinmunes estadio específicos de T. cruzi

Los diferentes estadios de *T. cruzi* poseen distintos grupos de proteínas que se relacionarían con la biología de cada forma del parásito. Las formas no infectivas, es decir los epimastigotas replicativos, están enriquecidos en enzimas metabólicas, mientras que los tripomastigotas infectivos no replicativos, están enriquecidos en proteínas de superficie que se asocian a la invasión de la célula del hospedador. *T. cruzi* es altamente inmunogénico y representa una oferta antigénica amplia para el hospedador vertebrado, con glicoproteínas periféricas localizadas en la membrana celular y cuya presencia e inmunogenicidad puede variar en los diferentes estadios del ciclo vital del parásito.

Se han identificado glicoproteínas (gp) específicas tipo mucina en estadios del vector como la gp72 en epimastigotas cuya función está asociada con la adhesión del flagelo a la superficie del epitelio del intestino del vector (Harth y col., 1992). En tripomastigotas metacíclicos se encuentran proteínas de adhesión y de invasión celular, tales como la gp82, gp90 y gp35/50 (Teixeira y Yoshida, 1986; Harth y col., 1989; Ramirez y col., 1993). En tripomastigotas sanguícolas se encuentra la transsialidasa, cuya función es transferir unidades de ácido siálico de sustratos exógenos a proteínas de membrana del parásito con el fin de facilitar la adhesión y la penetración del parásito en la célula del hospedador y ayudar a proteger el parásito de la acción de los anticuerpos (Frevert y col., 1992), así como la gp85. En este estadio también se encuentran epítopos sialilados en su superficie, como el Ssp3 capaz de inhibir la adhesión y penetración del parásito en la célula del hospedador (Schenkman y col., 1992). Por otro lado, en los amastigotas se encuentra amastina (Teixeira y col., 1994) el epítopo Ssp4 (Burleigh y Andrews, 1995) y ASP que son miembros de la superfamilia de sialidasas (Low y Tarleton 1997). Recientemente, Manso Alves y col., (2017) usando la técnica de cromatografía líquida de alta resoluciónespectrometria de masa en tándem (LC-MS/MS) para análisis de glicoperfiles totales de epimastigotas y tripomastigotas de T. cruzi lograron identificar y quantificar 690 glicoproteinas, 170 fueron específicas para epimastigotas y 334 en tripomastigotas. Destacan que la presencia de tal cantidad de glicoproteínas estadio-específicas en *T*. *cruzi* podría estar asociado a la interacción con diferentes hospedadores durante su complejo ciclo vital.

Las primeras evidencias de diferencias antigénicas entre los estadios epimastigotas, tripomastigotas y amastigotas de T. cruzi fueron reportadas por Kloetzel y col., (1975) usando técnicas de inmunofluorescencia indirecta. Andrews y col., (1988) reportaron la existencia de antígenos de superficie amastigota-específicos regulados durante la diferenciación del parásito. Texeira y Yoshida (1986) usando anticuerpos monoclonales (MAb) identificaron y caracterizaron tres antígenos de superficie en formas metacíclicas de T. cruzi procedentes de insectos o cultivos axénicos con masas moleculares de 90, 82 y 75 kDa. Posteriormente Neira y col., (2003) demostraron que el antígeno de superficie gp82 participa en la adhesión a la mucina gástrica e invasión de las células epiteliales. Pan y McMahon-Pratt (1989) produjeron MAb usando fracciones de membranas de epimastigotas o de amastigotas. Ellos encontraron que el MAb obtenido contra epimastigotas no era estadio específico, mientras que tres diferentes MAb (C1, C2 y C3) obtenidos contra amastigotas revelaban antígenos amastigota-específicos de 83 kDa. Usando el MAb C2 separaron por cromatografía de afinidad una proteína de 83 kDa la cual fue reconocida por sueros chagásicos humanos.

Berrizbietia y col., (2004) usando un panel de 435 sueros desarrollaron y compararon tres inmunoensayos enzimáticos (EIAs) usando formas epimastigotas, tripomastigotas y amastigotas de *T. cruzi* fijadas y evaluaron la estabilidad antigénica de los tres ensayos. Ellos encontraron que todos los ensayos mostraron un 100% de sensibilidad y una razonablemente alta especificidad para amastigotas (97,6%), epimastigotas (98,3%) y tripomastigotas (99,3%); los tripomastigotas fijados fueron estables por más de 4 meses a 4°C y a temperatura ambiente. Los autores sugieren que el EIA con tripomastigotas fijados puede ser útil para triaje en los bancos de

sangre. La inmunogenicidad y la variabilidad de las glicoproteínas de *T. cruzi* reportada por multiples autores avalan el desarrollo de antisueros estadio específicos como herramientas de disección de estados de transición durante el ciclo vital de este parásito (Almeida y col., 1994; 1999; Manso Alves y col., 2017).

### 2.8. Fraccionamiento de proteínas de mezclas complejas mediante electroelución

La utilización de mezclas complejas de antígenos reduce la especificidad de las técnicas diagnósticas. Esto puede solventarse mediante la utilización de antígenos altamente purificados que, al mismo tiempo, deben ser homogéneos y de composición conocida para evitar la interferencia diagnóstica. La electroelución como metodología de purificación de antígenos ha sido usada como procedimiento complementario de purificación de fracciones semipurificadas obtenidas por cromatografía principalmente en infecciones causada por *Fasciola hepatica* (Santiago y Hillyer, 1986). Con esta técnica es posible resolver biomoléculas (proteínas) de mezclas complejas, separándolas como bandas finas dependiendo de la capacidad resolutiva de la técnica de electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE). Su aplicación en mezclas proteicas permite la purificación de bandas para producción de anticuerpos, secuenciamiento o estudios de caracterización de actividad biológica.

Andersen y Heron (1993) reportaron un procedimiento que permite un rápido tamizaje de mezclas de proteínas complejas en ensayos celulares. La electroelución del contenido total del gel de poliacrilamida usando un equipo de electroelución múltiple y simultánea (Whole Gel Eluter, BioRAD), permitió cosechar las bandas separadas por SDS-PAGE como fracciones individuales. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, obtuvieron una eficiente remoción del gel, obteniendo fracciones proteicas no tóxicas en un tampón fisiológico adecuado para ensayar directamente en cultivos celulares. El método se usó para investigar la respuesta de células-T murinas a antígenos de secreción micobacterial durante la infección con *M. tuberculosis*. Los autores obtuvieron a escala semi-preparativa una fracción proteica secretada e inmunodominante que usaron para inmunizar ratones, lo que permitió investigar la especificidad y la producción de linfoquinas por células-T generadas de los ratones inmunizados.

Recientemente, Crisante y col., (2015) empleando un protocolo de electroelución usando el mismo equipo Whole Gel Eluter (BioRAD) lograron aislar, purificar, caracterizar y validar antigénicamente proteínas de membrana de T. cruzi ancladas por enlaces glicosil-fosfatidil-inositol (T. cruzi-GPI-AMP) para proponerse como candidatos para el diagnóstico serológico de la ECh. La separación por electroelución reveló la presencia de varias fracciones de T. cruzi-GPI-AMP, variando de 23 a 123 kDa, reconocidas específicamente por los anticuerpos anti-T. *cruzi* contenidos en 112 muestras de sueros de pacientes chagásicos agudos y crónicos. Concluyeron que el antígeno T. cruzi-GPI-AMP es una prueba diagnóstica alternativa sensible y suficientemente específica y recomiendan esta metodología como una nueva alternativa para el diagnóstico serológico de la ECh. Trabajos realizados por nuestro grupo, han permitido adaptar ese abordaje metodológico para estudiar la expresión de isoformas de la Hsp90 de T. cruzi, durante los diferentes procesos de diferenciación que ocurren a lo largo del ciclo vital de este parásito (Navarro y col., 2010). Por la experiencia en nuestro equipo de trabajo es necesario afinar múltiples detalles metodológicos para poner a punto todo el abordaje inmunológico usando la técnica de electroelución de bandas antigénicas de epimastigotas de 27°C y 37°C para buscar antígenos de interés en el diagnóstico de la ECh.

### **CAPÍTULO III**

### 3. METODOLOGÍA

### 3.1. Reactivos

Todos los materiales usados fueron de alta pureza y adquiridos en diferentes casas comerciales: Medio L-15 Leibovitz (Sigma, L-4386-10X), Resina DEAE-52 (Whatman, 05-720), E-64 [trans-epoxi-succinil-L-leucilamido-(4-guanidino)-butano] (Sigma, E-3132), TLCK [Nα-p-tosil-L-cloro-lisina metil cetona] (Sigma, T-7254), TPCK [N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona] (Sigma, T-4376), Fenantrolina (Sigma, 131377), Urea (Sigma, U-1250), Thiourea (Sigma, T-8656), CHAPS [3-[(3colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato] (Sigma, C-9426), ASB14 [amidosulfobetaine-14, 3- [N, N- dimetil (3-myristoylaminopropyl) amonio] propanosulfonato] (Sigma, A-1346), β-Mercaptoetanol (Sigma, M-7154), Acido tricloroacético (R.D.H., 33731), Desoxicolato de sodio (Sigma, D-6750), Marcadores de peso molecular rango amplio (Promega, V-8491), Fetuína de suero fetal bovino (Sigma, F-2379), α1-ácida-glicoproteína (Sigma, G-9014) Mucina de glándula submaxilar de buey (Tipo I-S Sigma, M-3895), Seroalbúmina bovina (Sigma, P-5619), Tween 20 (Sigma, P-7949), Anticuerpo polivalente anti-IgG de humano acoplado a peroxidasa de rábano (Sigma, A-8667), Anticuerpo anti-IgM de humano acoplado a peroxidasa producido en cabra (Sigma, A-0420), Anticuerpo polivalente anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa producido en cabra (Sigma, A-0545), Membranas de nitrocelulosa 0,45 µm (Pierce, 88018), Luminol - sustrato para luminografía SuperSignal West Pico (Pierce, 34080), Coomassie® Plus The Better Bradford Assay (Pierce, 23236), Coomassie Blue G-250 (Serva Blue G-250, 42655), Alcian Blue (E.M.S., 10350), Glutaraldehído (Sigma, G-6257), Orto-fenilendiamina (Sigma, P- 9029), Placas Radiográficas (Medical Film Konica Minolta, 23357). Todos los otros reactivos no mencionados fueron de grado analítico.

### 3.2. Material biológico

### 3.2.1. Parásitos y condiciones de mantenimiento

Se empleó un aislado de *Trypanosoma cruzi* cepa de referencia de *T. cruzi* I Dm28c (*MDID/BR/1982/Dm-28c*), mantenido varios años en el laboratorio mediante pases alternos trimestrales triatomino/cultivo. La cepa Dm28 fue aislada por hemocultivo el 17/11/76 de un rabipelado (*Didelphis marsupialis*) procedente de Los Colorados, estado Guárico, Venezuela y desde entonces ha sido mantenida por 40 años (2016) en *Rhodnius prolixus* con pases eventuales en ratón. El clon Dm28c procede de la cepa Dm28 que fue clonada por micro-manipulación de tripomastigotas sobrenadantes de cultivo de fibroblastos A9 infectados con metacíclicos inducidos en medio TAU e inoculación en la mucosa bucal de ratones recién nacidos. El clon se obtuvo en Brasil el 14/06/82 y a partir de entonces se ha mantenido por 33 años (2016) en *Rhodnius prolixus* con pases trimestrales en ratón (Contreras, 1994).

El mantenimiento del parásito se efectuó en el laboratorio de Protozoología del Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP) de la Universidad de Carabobo, empleando ninfas de IV y V estadios de *Rhodnius prolixus* alimentadas previo a la infección con aves de corral y una vez infectadas con ratones sanos adultos.

A partir de las ninfas infectadas se hizo un macerado en solución salina fisiológica y el sobrenadante conteniendo los parásitos fue inoculado vía intraperitoneal en ratones albinos. La parasitemia se determinó mediante análisis de gota de sangre tomadas de la porción distal de la cola. Para el cultivo de estos parásitos en medio axénico, se procedió al aislamiento de sangre de ratones infectados mediante punción cardíaca. La sangre fue colocada en una fiola que contuvo medio LITB (Infusión de hígado y triptosa modificado) (Goitia-Aular y Boisso, 1982) e incubada en estufa a 27°C (Nuaire, GP Autoflow).

Las masas de epimastigotas se produjeron con parásitos de no más de 4 meses en cultivo desde el último re-aislamiento de ratones usados en el mantenimiento vertebrado/invertebrado.

### 3.2.2. Producción de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* Dm28c a 27°C y 37°C por cultivo en medio axénico

### 3.2.2.1. Obtención de tripomastigotas metacíclicos por inducción en medio TAU3AAG

La obtención de los tripomastigotas metacíclicos se hizo siguiendo el protocolo de Contreras y col., (1985). Brevemente consistió en dar estrés en medio TAU (orina artificial de triatomino; NaCl 180 mM, KCl 17 mM, Fosfato 8 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM pH 6,0) a epimastigotas cultivados por 6 días (final de la fase de crecimiento exponencial) a 27°C en medio LITB. Se colocaron 7,8 x 10<sup>6</sup> epimastigotas/mL en frascos Roux con 70 mL de medio (7 mm de altura) TAU suplementado con aminoácidos y glucosa 3AAG (Glutamato 50 mM, Aspartato 2 mM, Prolina 10 mM, Glucosa 10 mM) y se incubaron durante 3 días a 27°C. Al cabo de ese tiempo se sedimentaron (3200 rpm, 15 min, 4°C) los parásitos, se resuspendieron en solución de lisis (Hank/HEPES/NaHCO<sub>3</sub>) (1:2 v:v) y se trataron durante 45 min a 37°C con suero fresco de cobayo (fuente de complemento) para lisar los epimastigotas. Se retiró una alícuota para el recuento diferencial antes del complemento. Después de la lisis, se sedimentaron los parásitos (3200 rpm, 15 min, 4°C) y se resuspendieron en tampón de elución fosfato glucosado (PSG) 0,181 pH 8,0

(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 94,9 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,3 mM; NaCl 72,7 mM; Glucosa 1%) (De Sousa, 1983) y se purificaron en columna de intercambio iónico con 10 mL de resina DEAE-52 equilibrada a fuerza iónica 0,181 con PSG y con un flujo de 18 gotas/min. Se colocaron al menos 1,0 x  $10^9$  parásitos totales por columna. Los parásitos se eluyeron de la columna con 20 mL de PSG a la misma fuerza iónica para obtener 100% metacíclicos. Los metacíclicos purificados fueron tratados con complemento y nuevamente purificados por columna de DEAE-52 y se hizo recuento en cámara de Neubaüer bajo microscopio de contraste de fases (Nikon, Optiphot) para calcular el rendimiento y la pureza de los parásitos eluídos. Los parásitos se usaron posteriormente para la obtención de: a) tripomastigotas tipo hemático por infección de células Vero (ítem **3.2.2.2**) y b) amastigotas por inducción de amastigogénesis extracelular primaria (ítem **3.2.2.3**).

### 3.2.2.2. Obtención de tripomastigotas tipo hemático en medio ML15-HA pH 7,0

Para la obtención de los tripomastigotas sobrenadantes de células se siguió el protocolo descrito por Piras y col., (1982): frascos de cultivo (Falcon) de 75 cm<sup>2</sup> con cultivos de células Vero infectadas con tripomastigotas metacíclicos (ítem **3.2.2.1**) del clon Dm28c inducidos *in vitro* (Contreras y col., 1985; Gigante y col., 2009) en una relación de infección 10 parásitos/célula, se dejaron en contacto durante 8 horas a 35°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Luego los recipientes fueron lavados con medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), manteniendo los envases con células infectadas en ese medio durante tres días a 35°C. Posteriormente, se hicieron cambios a medio ML15-HA pH 7,0 (Base de medio L-15 comercial (Tabla 1) suplementado 1:1 con solución de Triptosa-Fosfato Glucosado, SFB 10%, Hemina 20 mM y antibióticos 100 U/mL de Penicilina y 100 µg/mL de Sulfato de Estreptomicina) y se dejaron en la estufa dos días adicionales. Pasado este tiempo, se recolectaron los tripomastigotas sobrenadantes de células para infectar

nuevas capas de células Vero sanas en medio ML15-HA empleando envases de mayor tamaño (175  $\text{cm}^2$ ) según el procedimiento antes descrito.

 Tabla 1. Composición del medio L-15 Leibovitz utilizado para cultivo de epimastigotas de *T. cruzi*

Componentes	g/L
Cloruro de calcio (anhidro)	0,1396
Cloruro de magnesio (anhidro)	0,09366
Sulfato de magnesio (anhidro)	0,09767
Cloruro de potasio	0,4
Fosfato de potasio Monobásico (anhidro)	0,06
Cloruro de sodio	8,0
Fosfato Sódico Dibásico (anhidro)	0,19
L-Alanina	0,225
L-Arginina (base libre)	0,5
L-Asparagina (anhidro)	0,25
L-Cisteína (base libre)	0,12
L-Glutamina	0,3
L-Glicina	0,2
L-Histidina	0,25
L-Isoleucina	0,125
L-Leucina	0,125
Monohidrocloruro de L-Lisina	0,0937
L-Metionina	0,75
L-Fenila lanina	0,125
L-Serina	0,2
L-Treonina	0,3
L-Triptófano	0,02
L-Tirosina (base libre)	0,3
L-Valina	0,1
Cloruro de colina	0,001
Flavin Mononucleótido • Na	0,0001
Ácido Fólico	0,001
Mio-inositol	0,002
Niacinamida	0,001
DL-Ácido Pantoténico (hemicalcium)	0,001
Piridoxina • HCl	0,001
Tiamina Monofosfato • HCl	0,001
D-Galactosa	0,9
Rojo Fenol • Na	0,011
Ácido Pirúvico • Na	0,55

Medio L-15 Leibovitz (Sigma, L-4386-10X). (Tomado de https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma\_ aldrich/docs/Sigma/Product\_Information\_Sheet/1/l4386pis.pdf)

### 3.2.2.2.1. Obtención de epimastigotas a 27°C en medio ML15-HA pH 7,0

Para la obtención de los epimastigotas a 27°C se siguió el protocolo descrito por Gigante y col., (2009) y Graterol y col., (2013b). Se indujo epimastigogénesis del clon Dm28c (Contreras, 1994) en medio ML15-HA, a partir de tripomastigotas (ítem **3.2.2.2**) sobrenadantes de células Vero infectadas (equivalentes a tripomastigotas tipo hemático) incubándolos en ML15-HA pH 7,0. Se colocaron 2 x 10<sup>6</sup> tripomastigotas/mL en tubos cónicos estériles de 15 mL con 4 mL del medio ML15-HA pH 7,0 y se incubaron a 27°C durante 5 días. Para determinar el número de parásitos, se hizo dilución de los parásitos en tampón salino fosfato (PBS) 0,15 M pH 7,2 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 57 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18 mM; NaCl 76,9 mM) y se hizo recuento en cámara de Neubaüer bajo microscopio de contraste de fase (Nikon, Optiphot). Posteriormente los parásitos fueron sedimentados mediante centrifugación a 3400 rpm por 15 min a 4°C (Centrífuga IEC, centra GP8R) y lavados dos veces en PBS a fin de eliminar los restos del medio de cultivo. Los parásitos fueron centrifugados en tubos eppendorf previamente pesados a 14.000 xg, 5 min a 4°C (microcentrífuga eppendorf 5415C) y se determinó el peso húmedo (en miligramos) de la masa de parásitos y se conservaron a -20°C hasta su uso.

En los ensayos se emplearon como condición control, tripomastigotas sobrenadantes de células Vero infectadas (equivalentes a tripomastigotas tipo hemático) en medio ML15-HA (Villalta y Kierszenbaum, 1982) así como epimastigotas de final de fase de crecimiento exponencial obtenido al 6to día de la curva de crecimiento y mantenidos a 27°C en medio LITB (Goitia-Aular y Boisso 1982) por varias semanas. Para ello, volúmenes de 35 mL de sobrenadante ricos en parásitos fueron centrifugados a 3400 rpm por 15 min a 4°C (Centrífuga IEC, centra GP8R) para la obtención de masas húmedas de parásitos.

## 3.2.2.3. Obtención de amastigotas por inducción de amastigogénesis extracelular primaria en medio ML15-HA pH 7,0

Para la obtención de los amastigotas extracelulares primarios a 37°C se modificó ligeramente el protocolo de Contreras y col., (2002) y Navarro y col., (2003). Se indujo amastigogénesis extracelular primaria partiendo de tripomastigotas metacíclicos (ítem **3.2.2.1**) seleccionados por doble tratamiento con complemento y purificados con doble columna de DEAE-52, colocando 2,6 x 10<sup>7</sup> parásitos/mL y se incubaron a 37°C empleando frascos Falcon de 175 cm<sup>2</sup> con 30 mL de medio ML15-HA pH 7,0 y 10% SFB para obtener la condición de alta tensión de oxigeno (2,7 mm) durante 8 días. Pasado este tiempo, se realizó recuento de los parásitos en cámara de Neubaüer e inmediatamente el ensayo para la obtención de los epimastigotas a 37°C.

### 3.2.2.3.1. Obtención de epimastigotas a 37°C en medio ML15-HA pH 7,0

Para la obtención de los epimastigotas a  $37^{\circ}$ C del clon Dm28c (Contreras, 1994) en medio ML15-HA, a partir de amastigotas extracelulares primarios (ítem **3.2.2.3**) se modificó ligeramente el protocolo de Graterol y col., (2011). Se colocó 13 x  $10^{6}$  amastigotas/mL y se incubaron a  $37^{\circ}$ C empleando frascos Falcon de 25 cm<sup>2</sup> con 3 mL de medio ML15-HA pH 7,0 y 10% SFB para obtener la condición de alta tensión de oxigeno (2,7 mm) y se incubó durante 5 días. Pasado este tiempo, se realizó dilución de los parásitos en PBS y se hizo recuento diferencial en cámara de Neubaüer bajo microscopio de contraste de fase (Nikon, Optiphot).

Posteriormente los parásitos fueron sedimentados mediante centrifugación a 3400 rpm por 15 min a 4°C (Centrífuga IEC, centra GP8R) y lavados dos veces en PBS a fin de eliminar los restos del medio de cultivo. Los parásitos fueron centrifugados en tubos eppendorf previamente pesados a 14000 xg, 5 min a 4°C

(microcentrífuga eppendorf 5415C) y se determinó el peso húmedo de la masa de parásitos y se conservaron a -20°C hasta su uso.

Como condición control en los ensayos, se usaron amastigotas inducidos de metacíclicos en medio ML15-HA empleando volúmenes de 35 mL de sobrenadante ricos en parásitos que fueron centrifugados a 3400 rpm por 15 min a 4°C (Centrífuga IEC, centra GP8R) para la obtención de masas húmedas de parásitos.

### 3.2.3. Obtención de antígenos

El antígeno de laboratorio (epimastigotas de 27°C y 37°C) a comparar en este trabajo, se produjo como se describe en el ítem **3.3.2**.

### 3.2.4. Obtención de sueros y preparación de las mezclas (pool)

Los sueros fueron obtenidos de la seroteca (banco de sueros) del laboratorio de Protozoología del Instituto BioMolP, criopreservados a -20°C por diferentes tiempos. Se preparó diferentes lotes de cada "*pool*" de sueros, mezclando igual volumen (100 µL) de cada suero individual. Se prepararon cuatro *pool*:

(a) Pool de sueros de pacientes chagásicos crónicos, conformado por diez sueros obtenidos por la Profesora Miriam Flores en los caseríos "El Pueblito" y "Las Minas", correspondientes a pacientes clínicamente identificados, de títulos serológicos conocidos y clasificados como de fase crónica franca de la ECh. Para la obtención de los sueros, se cumplió con los requisitos Bioéticos de la Convención del Helsinki 1984 contenidos en el documento "Pautas éticas internacionales para investigación bioética en seres humanos", publicado por CIOMS (2002).

- (b) Pool de sueros de pacientes chagásicos agudos, conformado por doce sueros gentilmente donados por la Dra. Gladys Crisante del laboratorio de Investigaciones Parasitológicas "J. F. Torrealba", Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes; correspondientes a pacientes clínicamente identificados, de títulos serológicos conocidos y clasificados como de fase aguda de la ECh.
- (c) Pool de sueros de pacientes de otras patologías, constituido por seis sueros gentilmente donados por el laboratorio de Malariología de Valencia estado Carabobo, correspondientes a pacientes clínica o serológicamente identificados como enfermos de Toxoplasmosis, Cisticercosis y Leishmaniosis Cutánea; diagnosticados como negativos a Chagas por técnicas inmunológicas y parasitológicas.
- (d) Pool de sueros de individuos sanos, constituido por cinco sueros de individuos clínicamente sanos, procedentes de las mismas zonas endémicas del estado Carabobo y diagnosticados como negativos a Chagas por al menos 3 técnicas diagnósticas diferentes (ELISA, IFI y HAI).

### 3.3. Métodos

## 3.3.1. Análisis de las transformaciones morfológicas a epimastigotas mediante microscopia óptica

Se realizaron láminas teñidas según la técnica de Giemsa-ácido (Carvalho, 1973) de los diferentes días de incubación de los epimastigotas (ítem **3.2.2.2.1** y **3.2.2.3.1**). Para ello, los parásitos fueron lavados en PBS 0,15 M pH 7,2 y fijados en solución fijadora (NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, glutaraldehído 2%). El protocolo en detalles consistió en: (a) de la suspensión fijada se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ L y se colocaron en láminas portaobjetos, previamente pulidas y rotuladas, dejándolas secar

a temperatura ambiente, (b) se fijaron con metanol al 100% y se dejaron secar, (c) las sales del PBS se retiraron lavando por 2 min con etanol 70% tres veces, (d) se lavaron con abundante agua y se dejaron secar, (e) se trataron las laminas con HCl 5N por 10 min, (f) se retiró el ácido lavando con abundante agua y se dejaron secar, (g) se lavaron rápidamente con tampón fosfato 0,2 M pH 6,7 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,11 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,09 M) diluido 1/10 (para amortiguar el ácido), (h) se realizó tinción con solución de Giemsa, preparada al 5% en tampón fosfato 0,2 M pH 6,7 y se dejó el tiempo necesario para lograr la tinción deseada, la cual varió con el estadio (epimastigotas= 19 min, amastigotas= 24 min y tripomastigotas= 26 min). Las morfologías fueron visualizadas a un aumento de 1000X en un microscopio trinocular de epifluorescencia de mercurio (Nikon, Eclipse 400) contando al menos 300 formas para determinar porcentajes morfológicos y las morfologías más representativas se fotografiaron con una cámara digital (Nikon, Coolpix 4500) acoplada al microscopio para identificar las características morfológicas (forma del cuerpo, tamaño, núcleo, forma del kinetoplasto, ubicación de la membrana ondulante) que particularizan cada estadio.

### 3.3.2. Producción y fraccionamiento de antígenos

Los antígenos totales corresponden a fracciones proteicas solubles obtenidas mediante lisis por sonicación en presencia de agentes caotrópicos (Urea) y detergentes (3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato, CHAPS). Las bandas antigénicas relevantes identificadas en los antígenos totales, se fraccionaron por electroelución múltiple para confirmar su utilidad diagnóstica mediante *Inmunobloting*.

### 3.3.2.1. Producción de antígenos totales

Los antígenos totales fueron obtenidos siguiendo protocolos (Herbert, 1999) estandarizados en el laboratorio, mediante lisis por sonicación en presencia de Urea y CHAPS, usado para isoelectrofocalización (IEF). El protocolo consistió en resuspensión de cada una de las masas húmedas de parásitos (ítem **3.2.2.2.1** y **3.2.2.3.1**) en agua ultrapura en una relación de 300 mg masa/1000  $\mu$ L de agua, suplementada con una mezcla de inhibidores de proteasas (E-64 10  $\mu$ M; TLCK 0,5 mM; TPCK 0,5 mM; Fenantrolina 25 mM). Para la homogenización por sonicación, las suspensiones se mezclaron con tampón de IEF (Urea 5 M, Thiourea 2 M, CHAPS 2%, ASB14 2%, Tris/HCl 30 mM pH 8,0) en una relación de 1 g masa/6000  $\mu$ L de tampón de lisis y se homogenizó en baño de hielo con el disruptor de ultrasonido (Branson Sonifier, modelo 150) aplicando 4 pulsos (7 W de potencia) de 15 segundos de duración con intervalos de descanso de 2 minutos y se observó en microscopio de contraste de fases (Nikon, Optiphot) para comprobar lisis a homogeneidad completa. Seguidamente se centrifugó en microcentrífuga eppendorf (14000 xg, 30 min a 4°C), se retiró el sobrenadante el cual fue isotonizado a 150 mM NaCl, seguido de determinación de concentración de proteínas (ítem **3.3.3.2**). Los sobrenadantes se guardaron a -20°C para uso posterior.

### 3.3.2.2. Obtención de las bandas antigénicas por electroelución múltiple

Para obtener las bandas proteicas individuales de los antígenos totales (epimastigotas de 27°C y 37°C) obtenidos mediante lisis por sonicación en presencia de Urea y detergentes (ítem **3.3.2.1**), se utilizó el equipo de electroelución múltiple (Whole Gel Eluter), siguiendo el protocolo del fabricante (BioRAD laboratories, Inc), que brevemente consistió en: (a) separación de las proteínas (Laemmli, 1970) en gel preparativo por electroforesis en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) con gradiente lineal de poliacrilamida (7-15%), gel de apilamiento de 4,5% poliacrilamida y peine de 2 dientes, uno pequeño para el marcador de peso molecular y otro grande a lo ancho del gel preparativo para la separación de las bandas proteicas cargando 2 mg de cada antígeno (epimastigotas de 27°C y 37°C) por gel; (b) electroelución múltiple en 30 canales de la unidad de electroelución (Whole Gel Eluter) con tampón de

electroelución (Tris 50 mM, ácido bórico 25 mM), aplicando una corriente constante (250 mA, 15 W y 300 V) por 30 min; (c) recolección de las bandas por aplicación de vacio delicado a una unidad colectora de acrílico con 30 tubos (12 x 75 mm) conectados por mangueras finas a los puertos de elución de la cámara de electrotransferencia, para retirar las fracciones de 3 mL de cada banda proteica las cuales se isotonizaron a 150 mM NaCl; (d) congelamiento de las fracciones proteicas a -20°C para reducir el volumen (20 veces, 150  $\mu$ L) usando un equipo de liofilización (Edwards Modulyo 4K) y determinación de concentración de proteínas de las fracciones por la técnica de Bradford modificada (ítem **3.3.3.2**); (e) eliminación de las sales del tampón de electroelución por precipitación de las fracciones proteicas con TCA/DOC/Acetona (ítem **3.3.3.1**); (f) identificación de los polipéptidos presentes en las fracciones electroeluídas por SDS-PAGE (ítem **3.3.4**).

### 3.3.3. Preparación de las muestras y determinación de proteínas

### 3.3.3.1. Precipitación de proteínas con TCA/DOC/Acetona

Para evitar la deformación en la migración electroforética de las muestras proteicas fraccionadas por electroelución múltiple fue necesario retirar el exceso de sales en condiciones de minimizar la pérdida de proteínas. Las sales en las muestras se eliminaron con el protocolo de precipitación con Ácido tricloroacético (TCA)/Desoxicolato de sodio (DOC)/Acetona para concentrar proteínas muy diluidas (Lebendiker, 2002). Para la técnica se usaron tubos eppendorf de 1,5 mL adicionando 99,0  $\mu$ L de muestra proteica (3 a 5  $\mu$ g de proteína) y 1,0  $\mu$ L de DOC al 2% para una concentración final de 0,02%. Se agitó con vórtex (Maxi Mix Plus) y se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Luego, se adicionó 33,7  $\mu$ L de TCA al 24% para una concentración final de 6%, se agitó con vórtex y se incubó en baño de hielo por una hora. Seguidamente se sedimentó en microcentrífuga eppendorf (14000 xg, 10 min, 4°C) se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 200  $\mu$ L de

acetona fría (-20°C) y se incubó en hielo 15 min. Posteriormente se centrifugó en eppendorf (14000 xg, 10 min, 4°C) y se descartó el sobrenadante. La acetona residual se evaporó en un desecador al vacío por 2 a 5 min. El sedimento se conservó a -20°C hasta el momento de resuspender en el tampón a ensayar y se determinó la concentración proteica para la electroforesis.

### 3.3.3.2. Determinación de proteínas mediante Bradford modificado

La concentración de proteínas totales obtenidas con el protocolo de lisis en presencia de Urea y detergentes (ítem **3.3.2.1**) y las bandas proteicas fraccionadas por electroelución múltiple (ítem **3.3.2.2**) para muestras con Urea, se estimó por la técnica modificada de Bradford (1976), por reacción colorimétrica basada en el empleo del estuche comercial Coomassie® Plus (Pierce 23236. Rockford, IL, U.S.A) siguiendo instrucciones del fabricante. Los patrones de seroalbúmina bovina (BSA) se prepararon por dilución de un estándar (BSA 2 mg/mL, Sigma P-5619) con cantidad suficiente de tampón de IEF para concentración (Urea 8 M; CHAPS 4%; Tritón X-100 0,2%) en 20  $\mu$ L de volumen final de cada patrón (4, 8, 12, 16 y 20  $\mu$ g) para realizar curva de calibración, ajustando a cero el aparato con el blanco reactivo. Los 20  $\mu$ L de cada patrón se mezclaron con 1000  $\mu$ L de reactivo de Bradford (Coomassie® Plus, Pierce 23236). Para la muestra problema se usó 18  $\mu$ L de tampón de IEF más 2  $\mu$ L de la solución de proteínas problema (a diferentes diluciones), se mezcló con vórtex y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospect 3000) en micro celdas a 595 nm.

### 3.3.4. Caracterización de las proteínas

**3.3.4.1.** Análisis monodimensional de proteínas y glicoproteínas mediante electroforesis en condiciones disociantes (SDS-PAGE)

Los polipéptidos constituyentes de cada antígeno (epimastigotas de 27°C y 37°C) obtenidos mediante lisis por sonicación en presencia de Urea y detergentes (ítem 3.3.2.1) y las bandas proteicas fraccionadas por electroelución múltiple (ítem **3.3.2.2**) se analizaron por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Se prepararon minigeles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio de resolución al 10% y gel de apilamiento de 4,5%, con 0,75 mm de espesor en cámaras Mini-Protean Tetra Cell (BioRAD, 165-8001) y con peines de 10 ó 15 dientes. Alícuotas de concentración de proteína conocida (16 µg para el minigel de proteínas, 20 µg para glicoproteínas y cantidades variables para las bandas fraccionadas) se colocaron en tampón de muestra (Tris/HCl 60 mM pH 6,8; Glicerol 10%; Azul de Bromofenol 0,1%; SDS 3% y  $\beta$ mercaptoetanol 5%) en volúmenes variables de 10 a 15 µL y se desnaturalizaron por calor (3 min a 100°C). Para determinar la movilidad, en cada minigel se colocó un canal con proteínas marcadoras de peso molecular conocido (225, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15 y 10 kDa) (Promega, V-8491). En los minigeles para el análisis de glicoproteínas se incluyó un canal adicional con marcadores de referencia para carbohidratos (dilución  $\frac{1}{4}$  de 0,5 µg de fetuína, 1,5 µg de  $\alpha$ 1-ácida-glicoproteína y 1,5 µg de mucina). La electroforesis se desarrolló a corriente constante (15 mA, 45 min para cada minigel) y a 4°C hasta que el frente de migración saliera del gel.

Una vez terminada la separación electroforética, se desmontaron los minigeles, se fijaron y se realizaron las tinciones según la naturaleza de las muestras cargadas. Los minigeles para el análisis de proteínas fueron teñidos según la técnica combinada de Coomassie-Plata (De Moreno y col., 1985) como se describe en ítem **3.3.4.2** y los correspondientes a la identificación de glicoproteínas según la técnica combinada de Ácido Periódico, Alcian Blue, Glutaraldehído, Plata (APABGP) (De Lima y col., 1996; Moller y Poulsen, 2002) como se describe en ítem **3.3.4.3**. Terminada la tinción, los minigeles se lavaron con agua destilada y se secaron durante 2 horas a 80°C entre hojas de papel celofán Gel Drying Film (Promega, V-7131) utilizando un secador de geles (BioRAD Gel Dryer modelo 543).

### 3.3.4.2. Tinción de proteínas mediante la técnica combinada de Coomassie-Plata

La tinción de los minigeles para evidenciar los polipéptidos separados de cada antígeno se hizo a temperatura ambiente mediante la técnica de Coomassie-Plata como referido por De Moreno y col., (1985) en el que: (a) los polipéptidos se fijaron dentro del minigel por incubación por al menos 1 hora en solución acuosa de 50% metanol y 10% de ácido acético, (b) la tinción se realizó durante toda la noche con 0,25% de Coomassie Blue G-250 en solución acuosa 50% metanol - 12,5% ácido tricloroacético, (c) decoloración por incubación en metanol al 50%, con tres cambios de 20 min cada uno, hasta que se evidencien bandas azules, (d) acondicionamiento del minigel para embeberlo en plata por incubación en 5% metanol - 10% ácido acético (15 min), etanol 30% (15 min) y 4 lavados en agua destilada (5 min cada lavado), (e) incubación en el segundo colorante, nitrato de plata al 0,1% en agua, durante 45 min y un lavado rápido de 15 segundos con agua destilada para retirar el exceso de plata, (f) revelado de las bandas con afinidad por la plata por incubación en solución acuosa de carbonato de sodio al 3,75% y 0,03% de formaldehído por tiempos variables entre 10 y 60 segundos hasta evidenciar las bandas color marrón, (g) detención de la reacción de revelado por incubación en solución acuosa de ácido acético al 1%. Durante todo el proceso de tinción cada minigel se mantuvo en constante agitación suave con un agitador orbital (Hoefer, Red Rotor).

### 3.3.4.3. Tinción de glicoproteínas mediante la técnica combinada del Ácido Periódico, Alcian Blue, Glutaraldehído, Plata (APABGP)

La tinción de los minigeles para evidenciar la constitución de glicoproteínas o proteoglicanos de los polipéptidos separados de cada antígeno se realizó mediante la técnica combinada de APABGP siguiendo el protocolo modificado de De Lima y col., (1996) y Moller y Poulsen (2002). Se utilizaron dos tipos de marcadores colocados en el mismo minigel, uno de peso molecular rango amplio de Promega,

que permitió la estimación de la masa molecular de las bandas y sirvió de control de tinción proteica reversa de plata (no teñidas) y el otro, una mezcla (1  $\mu g/\mu L$ ) de proteoglicanos y glicoproteínas (3,5 µg/canal). La mezcla de marcadores glicoproteicos estuvo constituida por dilución  $\frac{1}{4}$  de 0,5 µg de fetuína, 1,5 µg de  $\alpha$ 1ácida-glicoproteína y 1,5 µg de mucina, usados como control positivo de tinción diferencial de glicoproteínas. Brevemente consiste en teñir el minigel en tres fases, la fase 1 a 30°C, la fase 2 a 50°C, ambas se realizaron en estufa (Precision Incubator modelo 3EG) y la fase 3 a temperatura ambiente. En la Fase 1 se procedió a: (a) fijación del minigel toda la noche en 10% ácido tricloroacético, (b) lavados con 5% ácido acético (2X, 2 min cada uno), (c) oxidación de azúcares por incubación en oscuridad en 1% ácido periódico disuelto en agua (20 min), (d) extracción del exceso de ácido periódico por lavado en 5% ácido acético (2X de 2 min), (e) acondicionamiento del minigel para reducir los carbohidratos por lavado en agua destilada (2X de 2 min), (f) actividad mordiente y reducción de aminoácidos por incubación por 12 min en solución reductora (0,5% meta-bisulfito de potasio en agua).

En la Fase 2 se realizó: (a) lavado con agua destilada para retirar el exceso de meta-bisulfito de potasio (2X de 2 min), (b) acondicionamiento del minigel para la tinción por lavados en 25% etanol, 10% ácido acético (2X de 2 min), (c) acomplejamiento de azúcares oxidados por incubación durante 15 min en solución de coloración (0,125% alcian blue en 25% etanol, 10% ácido acético), (d) extracción del colorante por lavados en 25% etanol, 10% ácido acético (3X de 4 min) y en 10% etanol, 5% ácido acético (2X de 2 min), (e) incubación por 6 min en 5% glutaraldehído en agua para incrementar la sensibilidad de los grupos acomplejados a la tinción con plata, (f) eliminación del exceso de glutaraldehído por lavados en 10% etanol, 5% ácido acético (2X de 5 min).

En la Fase 3 se realizó: (a) lavado en agua destilada (2X de 2 min), (b) tinción de grupos acomplejados por incubación por 1 hora en 0,4% nitrato de plata en agua y dos lavados de 30 segundos en agua destilada para retirar el exceso de plata, (c) incubación en solución de revelado (carbonato de sodio 2,5%; formaldehido 0,013%) por tiempos variables hasta que se evidenciaron las bandas azucaradas oxidadas junto a la aparición de los marcadores, (d) detención de la reacción de revelado por incubación en solución acuosa de ácido acético al 10%. Durante todo el proceso de tinción cada minigel se mantuvo en constante agitación suave con un agitador orbital (Hoefer, Red Rotor).

#### 3.3.5. Identificación de los antígenos mediante Dot Blot e Inmunobloting

### 3.3.5.1. Análisis mediante Dot Blot

Los análisis por *Dot Blot* para evaluar la reactividad de diferentes diluciones de anticuerpos para identificar los polipéptidos totales constituyentes de cada antígeno (epimastigotas de 27°C y 37°C) obtenidos mediante lisis por sonicación en presencia de Urea y detergentes (ítem **3.3.2.1**) fueron variables según la condición experimental del estudio y se hicieron siguiendo los protocolos de Hubsch y col., (1988) y de Towbin y col., (1979). Se empleó membrana de nitrocelulosa (MNC) cuadriculada (10 x 5 cm con cuadrados de 1 cm<sup>2</sup>) cargadas con concentraciones variables (entre 500 y 31,25 ng) formando puntos (colocando 2 micro-volúmenes de 2 µL cada vez) de los antígenos respectivos. Seguidamente, la MNC se incubó con solución bloqueadora (7,5% de leche descremada y 0,1% Tween 20 en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó la MNC con los *pool* de sueros a ensayar (chagásico crónico, otras patologías y sanos) a diluciones variables según el protocolo experimental y anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina humana polivalente acoplada a peroxidasa de rábano (Sigma, A-8667), ambos en solución de reacción (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; Tween 20 0,1% en PBS 0,15 M

pH 7,2 conteniendo 7,5% de leche descremada). Los inmunocomplejos se revelaron por quimioluminiscencia empleando luminol como sustrato siguiendo el protocolo del fabricante. Los luminogramas se registraron sobre películas de Rayos X (Medical Film Konica Minolta) por exposiciones de tiempos variables de 3 hasta 20 segundos y los filmes fueron fijados y revelados según la técnica de fotografía convencional, lavados y secados para su procesamiento y análisis posterior.

### 3.3.5.2. Análisis mediante Inmunobloting

Las condiciones para el análisis por *Inmunobloting* de los polipéptidos totales constituyentes de cada antígeno (epimastigotas de 27°C y 37°C) obtenidos mediante lisis por sonicación en presencia de Urea y detergentes (item 3.3.2.1) y las bandas proteicas relevantes fraccionadas por electroelución múltiple (ítem 3.3.2.2) fueron estandarizadas en cuanto a la cantidad de proteínas a colocar en los minigeles según la condición experimental en estudio y los análisis contra los anticuerpos se hicieron siguiendo el protocolo de Towbin y col., (1979). Las proteínas totales de los antígenos (epimastigotas de 27°C y 37°C) o las bandas proteicas fraccionadas por electroelución múltiple fueron separadas por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) como descrito en el ítem **3.3.4.1**. Después de la separación electroforética, se desmontó el minigel y se realizó la electrotransferencia a MNC en tampón de electrotransferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol 20%). Se cortó una MNC de igual tamaño que el minigel, se colocó en agua para que se hidratara, rápidamente se colocó en tampón de transferencia; posteriormente se armó el sándwich, con el minigel y la MNC, para realizar la transferencia en un aparato Trans-Blot (BioRAD, USA) durante 1 hora a voltaje constante (100 V).

Concluido ese tiempo, se desmontó el sándwich, se verificó la transferencia de proteínas y glicoproteínas por tinción del canal del marcador de peso molecular en solución de Coomassie Blue (0,025% Coomassie Blue R-250 en 12,5% ácido

tricloroacético). Seguidamente, las MNCs fueron incubadas en solución bloqueadora (7,5% de leche descremada y 0,1% Tween 20 en PBS) durante 90 minutos a temperatura ambiente.

Después del bloqueo, las MNCs fueron incubadas con los anticuerpos a ensayar (antisueros estadio específicos y *pool* de sueros) a diluciones variables según el protocolo experimental, diluyéndolos en solución de reacción (solución bloqueadora suplementada con Tris/HCl 10 mM pH 7,4 y NaCl 0,9%) y se incubó toda la noche a 4°C con agitación delicada en un agitador orbital (Hoefer, Red Rotor). Finalizada la incubación, las MNCs se lavaron con solución de bloqueo (4 veces, 10 min). Seguidamente se incubó por 90 min a 37°C con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa a diluciones variables (según el material en estudio) en solución de reacción. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Sigma, A-8667) o anti-IgM de humano acoplado a peroxidasa producido en cabra (Sigma, A-0420).

El exceso de conjugado se retiró por lavados (8 veces, 10 min) con solución de lavado (PBS 0,15 M pH 7,2 y Tween 20 0,1%), dejándose reposar luego la membrana hasta realizar el revelado. Los inmunocomplejos formados se revelaron por quimioluminiscencia, empleando luminol como sustrato, en presencia de peróxido de hidrógeno siguiendo el protocolo del fabricante y el registro se hizo como descrito en el ítem **3.3.5.1**.

### 3.3.6. Titulación de *pool* de sueros mediante la técnica de ELISA

La titulación de los *pool* de sueros para evaluar la calidad de los antígenos totales (epimastigotas de 27°C y 37°C) se realizó mediante la técnica indirecta de ELISA según el protocolo de Engvall y Perlmann (1971). Placas de policarbonato de

96 pozos (Immulon<sup>TM</sup> 2HB, USA) se sensibilizaron a 37°C durante una hora con 500  $\eta g$  de antígeno (epimastigotas de 27°C y 37°C) por pozo diluidos en solución carbonato-bicarbonato (SCB) pH 9,5. Los pozos se lavaron al menos 3 veces con tampón de lavado (PBS 0,15 M pH 7,2 y Tween 20 0,05%) y se bloquearon con tampón de bloqueo (7,5% de leche descremada en SCB). Se prepararon lotes de 2 placas sensibilizadas con cada antígeno, se cubrieron con papel parafilm y se envolvieron en papel aluminio hasta su uso.

En la titulación de los *pool* de sueros (chagásico crónico, otras patologías y sanos) se usó como control negativo un suero de individuo sano de referencia y como control positivo un suero de un paciente chagásico confirmado de título conocido (1/5.120). Ambos sueros usados como sueros de referencia del banco de sueros del laboratorio. La titulación de los anticuerpos se hizo por duplicado mediante diluciones seriadas dobles de los *pool* de sueros, colocando en el 1er pozo de cada fila 5  $\mu$ L de suero del paciente con 195  $\mu$ L de PBS 0,15 M pH 7,2; para obtener una dilución de 1/40 en el primer pozo y se hicieron diluciones seriadas dobles en los pozos sucesivos. Los pozos del 2 al 8 contenian 100  $\mu$ L de PBS y se mezclaron con 100  $\mu$ L del pozo anterior descartando los últimos 100  $\mu$ L para obtener una dilución máxima de 1/5.120 en el 8vo pozo. Los anticuerpos primarios se hicieron reaccionar durante 90 min a 37°C, seguidamente se lavaron tres veces los pozos con tampón de lavado (PBS-Tween 20 al 0,1%).

Como anticuerpo secundario se usó conjugado anti-IgG de humano acoplado a peroxidasa de rábano (Sigma, A-8667) diluida 1/5000 en PBS-Tween 20 y se incubó 1 hora a 37°C. Seguidamente se retiró el exceso de conjugado por lavados sucesivos (3X) con tampón de lavado y los inmunocomplejos se revelaron por incubación de 10-12 min a temperatura ambiente y en oscuridad usando como sustrato 0,4% orto-fenilendiamina en tampón fosfato-citrato pH 5,0 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,051 M; ácido cítrico 0,024 M) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10%. La reacción se detuvo con solución de parada (azida de sodio

0,01% en ácido cítrico 0,1 M). La reacción se leyó a 490 nm con un lector de ELISA (Bio-Teck modelo ELx800, USA) sustrayendo a cada valor de densidad óptica (DO) de las muestras el valor de DO del control negativo. Se consideró como título del suero, la dilución máxima inmediata anterior a partir de la cual la DO es igual a cero.

#### 3.3.7. Procesamiento y análisis de los resultados

Los valores obtenidos de los recuentos diferenciales fueron tabulados y el incremento poblacional se estimó por el número de veces que incrementó el inóculo usando la relación  $N_t/N_0$ , donde  $N_t = N^o$  de parásitos/mL a cada tiempo de incubación y  $N_0 = N^o$  de parásitos/mL a tiempo cero (inóculo). El análisis morfológico se hizo a partir de imágenes digitalizadas de tomas fotográficas identificando las características morfológicas (forma del cuerpo, tamaño, núcleo, forma del kinetoplasto, ubicación de la membrana ondulante) que particularizan cada estadio.

La comparación y determinación de los pesos moleculares de los diferentes perfiles polipeptídicos y luminogramas fueron estimados usando el densitómetro (Scanner BioRAD Imaging Densitometer, modelo GS-690) y los valores se calcularon utilizando el Programa Multi Analyst Software versión 1.2, por comparación con las movilidades relativas de los marcadores de peso molecular separados en cada minigel.

El arte gráfico y procesamiento de imágenes digitalizadas se realizó en una Laptop Hewlett Packard Pavilion, con los programas Adobe Photoshop CS4 versión 11.0 y Microsoft Office PowerPoint versión 2007.

### **CAPÍTULO IV**

### 4. RESULTADOS

# 4.1. Análisis de los cambios morfológicos y poblacionales de *T. cruzi* (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C durante la transformación de tripomastigotas sobrenadantes de cultivo de células Vero en epimastigotas

La transformación de tripomastigotas sobrenadantes de células Vero (tripomastigotas tipo hemático) en epimastigota en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C pasando por varias morfologías intermediarias, fue seguida simultáneamente por visualización al microscopio óptico previa a la obtención de las masas. Se utilizó un inóculo inicial de 2 x  $10^6$  tripomastigotas/mL constituido por un 95% de tripomastigotas sobrenadantes de células Vero (día 0) caracterizados por poseer forma alargada, kinetoplasto redondo y muy próximo a la extremidad posterior.

En términos cuantitativos, la Tabla 2 muestra que los cambios más significativos ocurren en las primeras 24 horas con una caída abrupta del porcentaje de tripomastigotas (día 0) desde 95 hasta 4% e incremento de la morfología redondeada (identificada como amastigota) desde 0 a 89% sin incremento significativo de la población ( $N_t/N_0=1$ ). En términos poblacionales estimado por la relación  $N_t/N_0$ , se observa que el inóculo se incrementa progresivamente desde 1,8 hasta 10,3 entre el día 2 y el día 5, lapso en el cual ocurre un incremento progresivo del porcentaje de epimastigotas entre el día 2 y día 5 desde 25% hasta 87%, respectivamente. Vale la pena resaltar que el incremento de los epimastigotas también se debe a las formas amastigotas que se transformaron en epimastigotas además de la condición de estrés de temperatura. El establecimiento de los epimastigotas como morfología predominante ocurre a partir del día 2 manteniéndose hasta el día 5

(87%). La fase exponencial de la curva de crecimiento se ubica entre el día 2 y 5 donde el número de parásitos/mL se incrementa desde 3,6 x  $10^6$  hasta 20,1 x  $10^6$  con un aumento de la relación N<sub>t</sub>/N<sub>0</sub> que se duplica cada 24 horas (1,8; 2,9; 6,5; 10,3 veces).

		Porcentaje de Formas (X±DS)						
Tiempo (días)	Paras/mL (10 <sup>6</sup> )	Т	Difer	A	E	М	Inmo	$N_t/N_0$
0	2,0	95	0	0	5	0	0	1,0
1	1,9	4	3	89	4	0	0	1,0
2	3,6	0	29	45	25	0	0	1,8
3	5,6	1	7	34	58	0	0	2,9
4	12,6	2	12	15	71	0	0	6,5
5	20,1	0	6	7	87	0	0	10,3

**Tabla 2.** Cambios morfológicos y poblacionales de *T. cruzi* (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C durante la transformación de tripomastigotas sobrenadantes de cultivo de células Vero en epimastigotas

T = tripomastigotas; Difer = formas en diferenciación; A = amastigotas; E = epimastigotas; M = metacíclicos; Inmo = formas inmóviles; X±DS = promedio más o menos desviación estándar de al menos tres recuentos en cámara de Neubaüer;  $N_t/N_0$  = la relación entre el recuento de parásitos/ml a tiempo (t) sobre el recuento a tiempo 0.

La Figura 6 muestra los cambios morfológicos de *T. cruzi* (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C que ocurren durante la transformación de tripomastigotas sobrenadantes de cultivo de células Vero en epimastigotas, por microscopia óptica y tinción con Giemsa. A tiempo 0 días se aprecia la morfología típica de los tripomastigotas tipo hemático caracterizados por presentar un cuerpo alargado con membrana ondulante conspicua, un kinetoplasto puntiforme en la parte posterior del cuerpo del parásito y la presencia de un flagelo que sale por la porción anterior



**Figura 6.** Micrografía de luz de los cambios morfológicos de *T. cruzi* (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C durante la transformación de tripomastigotas sobrenadantes de cultivo de células Vero en epimastigotas, teñidos con Giemsa ácida. n = núcleo; k = kinetoplasto; d = días. Tinción de Giemsa 100X

(Figura 6, foto 0d). A partir del día 1 se observan formas redondeadas en diferenciación entre los tripomastigotas alargados y los amastigotas redondos (Figura 6, foto 1d), las cuales no son verdaderos amastigotas por presentar el kinetoplasto redondo característico de los tripomastigotas, hasta alcanzar la morfología típica del

amastigota con kinetoplasto en barra. A partir del día 2 aparecen epimastigotas cortos y amastigotas (Figura 6, foto 2d) que incrementan su tamaño y aparecen formas en multiplicación formado rosáceas (Figura 6, foto 5d). El predominio de los epimastigotas a los 4 y 5 días (Figura 6, foto 4d y 5d) confirma los datos obtenidos en la Tabla 2. Estos resultados indican que el tripomastigota tipo hemático para transformarse a epimastigota a 27°C sufre un acortamiento para formar el amastigota y luego un alargamiento hasta formar el epimastigota.

## 4.2. Análisis de los cambios morfológicos y poblacionales de *T. cruzi* (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C durante la transformación de amastigotas extracelulares primarios en epimastigotas

La transformación de amastigotas extracelulares primarios de *T. cruzi* en epimastigota en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C pasando por varias morfologías intermediarias, fue seguida simultáneamente por visualización al microscopio óptico previa a la obtención de las masas. Se utilizó un inóculo inicial de 13 x  $10^6$  amastigotas/mL constituido por un 89% de amastigotas extracelulares primarios (día 0) caracterizados por poseer forma redondeada u oval, núcleo grande, kinetoplasto en barra cercano al núcleo y carecer de flagelo.

En términos cuantitativos, la Tabla 3 muestra en las primeras 48 horas una caída más leve del porcentaje de amastigotas (día 2) de 89 a 50% e incremento de la transformación de los amastigotas en la morfología epimastigota desde 9 a 42% con un significativo aumento de la población ( $N_t/N_0=2,8$ ). En términos poblacionales estimado por la relación  $N_t/N_0$ , se observa que el inóculo se incrementa progresivamente desde 2,8 hasta 4,1 entre el día 2 y el día 5, lapso en el cual ocurre un incremento progresivo del porcentaje de epimastigotas entre el día 2 y día 5 desde 42% hasta 78%, respectivamente. El establecimiento de los epimastigotas como morfología predominante ocurre a partir del día 2 manteniéndose hasta el día 5 (78%)
con un incremento de 4 veces  $(N_t/N_0)$  el inóculo a consta de la multiplicación de los epimastigotas. Se observa en las primeras 48 horas mayor porcentaje de formas epimastigotas a 37°C (42%) que a 27°C (25%, Tabla 2). Mientras que una baja proporción de formas en diferenciación se aprecia durante los días de incubación, que pudiese estar asociado al cultivo de los parásitos en una condición de alta tensión de oxígeno que aumenta la velocidad de diferenciación a epimastigotas.

		Porcentaje de Formas (X±DS)						
Tiempo (días)	Paras/mL (10 <sup>6</sup> )	A	Difer	E	М	Т	Inmo	$N_t/N_0$
0	13,0	89	2	9	0	0	0	1,0
1	10,5	88	1	7	0	2	1	1,0
2	36,0	50	8	42	0	0	0	2,8
3	43,0	39	1	59	0	1	0	3,3
4	44,0	25	0	75	0	0	0	3,4
5	53,2	22	0	78	0	0	0	4,1

**Tabla 3.** Cambios morfológicos y poblacionales de *T. cruzi* (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C durante la transformación de amastigotas extracelulares primarios en epimastigotas

A = amastigotas; Difer = formas en diferenciación; E = epimastigotas; M = metacíclicos; T = tripomastigotas; Inmo = formas inmóviles;  $X\pm DS$  = promedio más o menos desviación estándar de al menos tres recuentos en cámara de Neubaüer;  $N_t/N_0$  = la relación entre el recuento de parásitos/mla tiempo (t) sobre el recuento a tiempo 0.

La fase exponencial de la curva de crecimiento se ubica entre el día 2 y 5 donde el número de parásitos/mL se incrementa desde 36,0 x  $10^6$  hasta 53,2 x  $10^6$  con un ligero aumento de la relación N<sub>t</sub>/N<sub>0</sub> cada 24 horas. El incremento poblacional de los epimastigotas multiplicándose a 37°C en alta tensión de oxígeno no fue el esperado como demostrado por Graterol y col., (2011) lo que pudiese ser debido a que el inóculo de amastigotas fue 7 veces mayor que de tripomastigotas y que los epimastigotas pudieron agotar más rápidamente los nutrientes del medio.



**Figura 7.** Micrografía de luz de los cambios morfológicos de *T. cruzi* (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C durante la transformación de amastigotas extracelulares primarios en epimastigotas, teñidos con Giemsa ácida. n = núcleo; k = kinetoplasto; d = días. Tinción de Giemsa 100X

La Figura 7 muestra los cambios morfológicos de *T. cruzi* (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C que ocurren durante la transformación de amastigotas extracelulares primarios en epimastigotas, por microscopia óptica y tinción con Giemsa. A tiempo 0 días (0d) se aprecia la morfología típica de los amastigotas caracterizados por presentar un cuerpo redondeado u oval, núcleo grande, redondo y excéntrico, un kinetoplasto en forma de barra cercano al núcleo y carecer de flagelo libre (Figura 7, foto 0d). A partir del día 1 de incubación se observa que comienza la rápida transformación de amastigotas en epimastigotas (Figura 7, foto 1d) y el predominio de formas epimastigotas típicas caracterizado por un aspecto alargado, núcleo central y kinetoplasto en barra situado en la región anterior del núcleo a partir del segundo día (Figura 7, foto 2d), los cuales se mantienen a los 4 y 5 días (Figura 7, foto 4d y 5d) de incubación y que coinciden con los datos obtenidos en la Tabla 3. Si bien no se aprecian diferencias morfológicas entre los epimastigotas (Figuras 6 y 7), los resultados indican que los eventos de diferenciación son diferentes.

### 4.3. Caracterización del perfil proteico de los epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo

En la Figura 8 se muestra el perfil proteico en gel SDS-PAGE al 10% teñido con la técnica de Coomassie-Plata, de los epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo. Se aprecia que los epimastigotas de 27 y 37°C (canal E27 y E37) tienen un perfil proteico común caracterizado por al menos 17 bandas proteicas (175, 130, 90, 80, 75, 72, 66, 60, 55, 50, dupleta 43/42, 39, 37, 35, 32, 30 y 27 kDa), con pequeñas diferencias en la intensidad de algunas bandas, sugiriendo que son equivalentes en proteínas aún cuando proceden de estadios diferentes y se multiplicaron a temperaturas diferentes. Se puede observar que estos epimastigotas obtenidos a 27 y 37°C muestran un alto grado de similitud con el perfil de bandas presente en la forma epimastigota mantenido en cultivo (canal Ec) empleado como estadio control, principalmente las bandas dominantes en intensidad (175, 90, 80, 72, 66, 60, 55, 50, dupleta 43/42, 39, 35, 32 y 27 kDa, ubicadas con punta de flecha a la derecha del canal Ec) como era de esperarse.



**Figura 8.** SDS-PAGE al 10% de las proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 teñidas con Coomassie-Plata. Cada canal tiene 16  $\mu$ g de proteína. T= tripomastigotas, A= amastigotas, E37= epimastigotas de 37°C, E27= epimastigotas de 27°C y Ec= epimastigotas de 6 días de cultivo en medio LITB. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores (M) de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

Al comparar los estadios de procedencia, se aprecian perfiles proteicos diferentes en número de bandas e intensidad de las mismas, uno para tripomastigotas (canal T) constituido por al menos 22 bandas, 18 de ellas (170, 130, 120, 90, 80, 75, 70, 66, 58, 55, 50, dupleta 43/42, 39, 35, 30, 29, 27 y 25 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal T) distribuidos entre los marcadores 225 y 25 kDa, y otro para amastigotas (canal A) constituido por 16 bandas, 11 de ellas (80, 66, 60, 55, 50,

dupleta 43/42, 39, 37, 32, 30 y 27 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal A) ubicadas entre los marcadores 100 y 25 kDa.

Se puede observar que los epimastigotas obtenidos (canal E37 y E27) comparten dos polipéptidos específicos (175 y 72 kDa, ubicados como triángulos blancos a la izquierda del canal Ec) con el estadio epimastigota mantenido en cultivo (canal Ec) y que están ausentes en los estadios de procedencia (canales T y A). Sin embargo, en el estadio tripomastigota (canal T) se identifican seis polipéptidos específicos (170, 120, 70, 58, 29 y 25 kDa) ausentes en los epimastigotas y amastigotas. No se tomaron en consideración algunas bandas por estar por encima o por debajo de los marcadores de peso molecular de referencia.

### 4.4. Caracterización del perfil glicoproteico de los epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo

En la Figura 9 se muestra el perfil glicoproteico en gel SDS-PAGE al 10% teñido con la técnica combinada de Ácido Periódico, Alcian Blue, Glutaraldehido, Plata (APABGP), de los epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo. La comparación de los perfiles glicoproteicos de epimastigotas de 27 y 37°C (canal E27 y E37) revela un alto grado de similitud y pequeñas diferencias en la intensidad de algunas bandas glicoproteicas al igual que lo observado en el perfil proteico (Figura 8). Se aprecia un perfil caracterizado por al menos 13 glicopéptidos (100, 85, 72, 66, 57, 50, dupleta 43/42, 39, 35, 32, 29, 27 y 25 kDa). Al comparar estos epimastigotas obtenidos a 27 y 37°C con la forma epimastigota mantenido en cultivo (canal Ec) se muestra un alto grado de similitud con el perfil de bandas propia de los epimastigotas (85, 72, 66, 57, 50, dupleta 43/42, 39, 35, 32 y 27 kDa, ubicadas con punta de flecha a la derecha del canal Ec) como observado en el perfil proteico.



**Figura 9.** SDS-PAGE al 10% de las glicoproteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 teñidas con APABGP. Cada canal tiene 20  $\mu$ g de proteína. T= tripomastigotas, A= amastigotas, E37= epimastigotas de 37°C, E27= epimastigotas de 27°C y Ec= epimastigotas de 6 días de cultivo en medio LITB. Az= 3,5  $\mu$ g de mezcla de glicoconjugados. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores (M) de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

Al comparar los estadios de procedencia a nivel glicoproteico, se aprecian acentuadas las diferencias en intensidad de algunos glicopéptidos con bandas dominantes y bandas comunes entre estadios. En los tripomastigotas (canal T) se presenta un perfil complejo, caracterizado por múltiples bandas, sobre todo de alto peso molecular que no pudieron ser resueltas en el gel, así como un perfil constituido por 15 glicopéptidos (120, 100, 85, 66, 60, 57, 55, 50, dupleta 43/42, 39, 35, 32, 29, 27 y 25 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal T) distribuidos entre los marcadores 225 y 25 kDa, en los amastigotas (canal A) el perfil está caracterizado por

13 glicopéptidos (100, 85, 67, 62, 57, 50, dupleta 43/42, 39, 37, 29, 27, 26 y 25 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal A) ubicados entre los marcadores 100 y 25 kDa.

Existen glicopéptidos estadio-específicos que sirven como marcadores de diferenciación. Durante la transformación en epimastigotas a 37°C se puede observar la disminución en la intensidad de algunas bandas propias de los amastigotas (85, 62 y 29 kDa, ubicados como triángulos blancos a la izquierda del canal E37) así como la aparición de bandas más intensas (37 y 35 kDa, ubicados como punta de flecha a la izquierda del canal E37). Igualmente, en los epimastigotas a 27°C se puede observar la disminución en la intensidad de la banda 60 kDa (ubicada como triángulo blanco a la derecha del canal E27) propia de los tripomastigotas y el aumento en la intensidad de la banda de 85 kDa (ubicada como punta de flecha a la derecha del canal E27).

## 4.5. Caracterización del perfil antigénico de los epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo empleando antisueros estadio específicos

La Figura 10 compara los antígenos revelados por el suero anti-epimastigota (anti-E) en los epimastigotas de 27, 37 y el control (canales E27, E37 y Ec), contrario a lo esperado por encima de las bandas comunes, se observa que cada epimastigota tiene un perfil antigénico característico con ausencia o presencia de bandas no compartidas y diferencia en la intensidad de algunas de ellas. Se aprecia una región de bandas de mediano y bajo peso molecular mucho más intensas en el epimastigota de 37°C (canal E37) que en el de 27°C (canal E27). En el epimastigota de 37°C (canal E37) son reconocidos por el suero anti-E 11 antígenos (120, 100, 72, 66, 60, dupleta 57/55, 44, 40, 37, 33 y 21 kDa) mientras que en el epimastigota de 27°C (canal E27) el perfil reconocido está caracterizado por al menos siete antígenos (100, 80, 72, dupleta 57/55, 44, 39 y 37 kDa). Al comparar estos epimastigotas obtenidos a 27 y 37°C con la forma epimastigota mantenido en cultivo (canal Ec) se aprecia que son

reconocidos 11 antígenos propios de los epimastigotas (100, 80, 72, 66, 60, dupleta 57/55, 44, 40, 37, 33 y 21 kDa, ubicados como punta de flecha a la derecha del canal Ec) y de éstos, seis son de naturaleza glicoproteica 100, 72, 66, 60, 44 y 33 kDa. Sugiriendo que las diferencias observadas en los epimastigotas obtenidos a 27 y 37°C podrían ser atribuibles a bandas compartidas con sus estadios de procedencia que no se observa en el epimastigota mantenido en cultivo.



**Figura 10.** *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 revelado con suero anti-E. Cada canal tiene 4  $\mu$ g de proteína incubado con suero anti-E (1/2.500) y conjugado anti-IgG peroxidasa de conejo (1/3.000) y revelado por luminografía. E37= epimastigotas de 37°C, E27= epimastigotas de 27°C y Ec= epimastigotas de 6 días de cultivo en medio LITB. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

Esa posibilidad se analiza en la Figura 11, donde se aprecia que el suero de conejo anti-TEMA preparado con una proporción equivalente de proteínas de los cua-



**Figura 11.** *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 revelado con suero anti-TEMA. Cada canal tiene 4  $\mu$ g de proteína incubado con suero anti-TEMA (1/2.500) y conjugado anti-IgG peroxidasa de conejo (1/8.000) y revelado por luminografía. T= tripomastigotas, A= amastigotas, E37= epimastigotas de 37°C, E27= epimastigotas de 27°C y Ec= epimastigotas de 6 días de cultivo en medio LITB. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

tro estadios (Tripomastigotas, Epimastigotas, Metacíclicos y Amastigotas) revela en cada estadio control un perfil antigénico diferente y característico del estadio (canales T, A y Ec). En el tripomastigota (canal T) son reconocidos seis antígenos (100, 80, 66, 57, 50 y 21 kDa), en el amastigota (canal A) siete antígenos (85, 66, 62, 57, 50, 40 y 21 kDa) y en el epimastigota mantenido en cultivo (canal Ec) siete antígenos (66, 60, 57, 50, 40, 29 y 21 kDa, ubicados como punta de flecha a la derecha del canal Ec). Se confirma que a pesar de la alta similitud entre los epimastigotas de 27 y 37°C, dado por un perfil de bandas comunes caracterizado por al menos seis antígenos (80, 66, 57, 50, 42 y 21 kDa, ubicados como punta de flecha a la izquierda

del canal E37) y de éstos, cuatro son de naturaleza glicoproteica (66, 57, 50 y 42 kDa) existen al menos cuatro bandas antigénicas diferentes entre ellos (90, 60, 39 y 30 kDa, ubicados como triángulo blanco a la izquierda del canal E27), indicando que antigénicamente son diferentes.

### 4.6. Estandarización antigénica mediante *Dot-Blot* de los epimastigotas de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo empleando *pool* de sueros

Para determinar de manera rápida y menos costosa la dilución óptima de los *pool* de sueros, a usar en los *Inmunobloting* contra los diferentes antígenos, se empleó la técnica del Dot-Blot. La Figura 12 muestra que los antígenos (epimastigotas de 27°C y 37°C) cargados en la membrana de nitrocelulosa en cantidades de 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 ng de proteína por punto, son revelados por la anti-IgG en el pool de sueros de pacientes chagásicos crónicos, con señales lumínicas (manchas oscuras) que se atenúan fuertemente a mayor dilución (1/20.000), confirmando la validez de la técnica. Se aprecia que diferentes cantidades del antígeno epimastigota de 37°C por punto, en las diferentes diluciones (cuadrícula 1 a 15), se revela con mayor intensidad que el antígeno epimastigota de 27°C (cuadrícula 16 a 30). A la dilución 1/5.000 se aprecian manchas intensas a 500 ng en los antígenos epimastigotas de 37°C y 27°C (puntos 1 y 16) que se atenúan considerablemente a medida que disminuye la cantidad de antígeno por punto (puntos 5 y 20). Esta atenuación se acentúa fuertemente a la dilución 1/20.000 (puntos 15 y 30) donde adicionalmente la cantidad de antígeno por punto es 16 veces menor. Para la titulación del *pool* de sueros de pacientes en fase crónica usando conjugado anti-IgG y los epimastigotas de 27°C y 37°C sería conveniente trabajar con un rango de dilución 5.000 y 10.000 que es capaz de visualizar hasta 31,25 ng de antígeno por punto y mantener la dilución del conjugado (1/10.000).



**Figura 12.** *Dot-Blot* de diferentes diluciones de *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos para identificar proteínas totales de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0. Se colocó cantidades variables de proteína por punto incubada con diferentes diluciones de *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos, conjugado anti-IgG humano peroxidasa (1/10.000) y revelado por luminografía. En la parte superior se identifican las diferentes cantidades de los antígenos por punto: 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 ng de E37= Epimastigotas de 37°C y de E27= Epimastigotas de 27°C. A la izquierda se identifican las diferentes diluciones del *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos. Los inmunocomplejos se visualizaron por luminografía.

La Figura 13 muestra las señales lumínicas inespecíficas reveladas usando *pool* de sueros de pacientes de otras patologías, *pool* de sueros de individuos sanos y conjugado anti-IgG. En la fila correspondiente al antígeno epimastigota de 37°C (cuadrícula 1 al 5) se aprecia que el *pool* de sueros de pacientes de otras patologías reveló señales lumínicas cuando las cantidades de antígeno fueron de 500, 250 y 125 ng (cuadrícula 1 al 3) y señales muy tenues en cantidades de 62,5 y 31,25 ng (cuadrícula 4 y 5). Mientras que con el antígeno epimastigota de 27°C (cuadrícula 6 al

10) reveló señales lumínicas con baja intensidad a 500 ng (cuadrícula 6) y muy débilmente cuando los antígenos fueron de 250, 125, 62,5 y 31,25 ng (cuadrícula 7 al 10). Por otro lado, el *pool* de sueros de individuos sanos reaccionó inespecíficamente con todos los antígenos (epimastigotas de 27°C y 37°C) con señales luminográficas muy débiles que se hacen casi imperceptible a medida que disminuye la cantidad de antígeno por punto (cuadrícula 11 al 20). Para la titulación de estos dos sueros, sería conveniente trabajar con una dilución 1/1.000 pues da un fondo de reacción inespecífica muy leve en las diferentes concentraciones de antígenos y disminuir la dilución del conjugado (<1/10.000).



**Figura 13.** *Dot-Blot* de diferentes *pool* de sueros para identificar proteínas totales de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0. Se colocó cantidades variables de proteína por punto incubada con *pool* de sueros de pacientes de otras patologías (1/1.000), *pool* de sueros de individuos sanos (1/1.000), conjugado anti-IgG humano peroxidasa (1/10.000) y revelado por luminografía. En la parte superior se identifican las diferentes cantidades de los antígenos por punto: 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 ng de E37= Epimastigotas de 37°C y de E27= Epimastigotas de 27°C. A la izquierda se identifican los diferentes *pool* de sueros. Los inmunocomplejos se visualizaron por luminografía.

En base a los resultados mostrados en las Figuras 12 y 13 se estableció que para garantizar una buena resolución entre bandas (antígenos) y un mínimo fondo (background) en los *Inmunobloting* se trabaje con una dilución 1/7.500 (entre 5.000 y 10.000) del *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos para revelar antígenos reconocidos por los anticuerpos IgG (conjugado anti-IgG 1/10.000) y dilución 1/1.000 del *pool* de sueros de pacientes de otras patologías y *pool* de sueros de individuos sanos para revelar inespecíficamente antígenos reconocidos por los anticuerpos IgG (conjugado anti-IgG 1/8.000).

# 4.7. Caracterización del perfil antigénico de los epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo empleando *pool* de sueros

La Figura 14 muestra el análisis por Inmunobloting de los perfiles antigénicos de epimastigotas de T. cruzi de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo revelados por el *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos diluido 1/7.500. Se aprecia en cada estadio control un perfil antigénico diferente y característico del estadio (canales T, A y Ec) con ausencia o presencia de bandas no compartidas y diferencia en la intensidad de algunas de ellas. En el tripomastigota (canal T) son reconocidos por el pool de sueros de pacientes chagásicos crónicos 11 antígenos (120, 90, 80, 72, 60, 55, 47, 40, 35, 30 y 21 kDa), en el amastigota (canal A) siete antígenos (90, 85, 60, 55, 40, 35 y 21 kDa) y en el epimastigota mantenido en cultivo (canal Ec) 14 antígenos (150, 120, 85, 72, 60, 55, 47, 39, 35, 30, 29, 27, 24 y 21 kDa, ubicados como trazos cortos a la derecha del canal Ec). Cuando se analizan los antígenos obtenidos se observa que en el epimastigota de 37°C (canal E37) son reconocidos 11 antígenos (120, 85, 72, 60, 55, 47, 39, 30, 29, 24 y 21 kDa) mientras que en el epimastigota de 27°C (canal E27) el perfil reconocido está caracterizado por al menos ocho antígenos (120, 82, 72, 60, 55, 47, 35 y 21 kDa). La comparación entre los epimastigotas de 27 y 37°C y el epimastigota mantenido en cultivo muestra seis bandas comunes (120, 72, 60, 55, 47 y 21 kDa, ubicados como triángulo blanco a la izquierda del canal Ec) a los tres antígenos y de éstas, dos bandas (60 y 55 kDa, identificados por punta de flecha blanca a la izquierda del canal T) son comunes con los antígenos de procedencia (canal T y A). Característicamente, cinco bandas son reveladas comunmente en el antígeno E37 y Ec (85, 39, 30, 29 y 24 kDa, ubicados como trazos cortos a la izquierda del canal E37) mientras que solo la banda de 35 kDa (ubicada como trazo corto a la izquierda del canal E27) es revelada en común en el antígeno E27 y Ec.



**Figura 14.** *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos. Cada canal tiene 4  $\mu$ g de proteína incubado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos (1/7.500) y conjugado anti-IgG humano peroxidasa (1/10.000) y revelado por luminografía. T= tripomastigotas, A= amastigotas, E37= epimastigotas de 37°C, E27= epimastigotas de 27°C y Ec= epimastigotas de 6 días de cultivo en medio LITB. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

Cuando estos mismos antígenos se incuban con un *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos diluido 1/800, los perfiles antigénicos de epimastigotas de *T. cruzi* de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo son totalmente diferentes. En la



**Figura 15.** *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos. Cada canal tiene 4  $\mu$ g de proteína incubado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos (1/800) y conjugado anti-IgM humano peroxidasa (1/3.000) y revelado por luminografía. T= tripomastigotas, A= amastigotas, E37= epimastigotas de 37°C, E27= epimastigotas de 27°C y Ec= epimastigotas de 6 días de cultivo en medio LITB. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

Figura 15 se aprecia que el perfil antigénico revelado es de menor intensidad y menor número de bandas en comparación al revelado por el *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos (Figura 14). Todos los antígenos presentan un perfil complejo, caracterizado por bandas de alto peso molecular que no pudieron ser resueltas en el gel. En el tripomastigota (canal T) son reconocidos cuatro antígenos (140, 80, 53 y 48 kDa), en el amastigota (canal A) tres antígenos (175, 80 y 60 kDa) y en el epimastigota mantenido en cultivo (canal Ec) seis antígenos (140, 100, 80, 72, 60 y 53 kDa, ubicados como trazos cortos a la derecha del canal Ec). Cuando se analizan los epimastigotas obtenidos se observa que son reconocidos cinco antígenos (140, 80, 69, 60 y 53 kDa) en el epimastigota de 37°C (canal E37) y cinco antígenos (140, 120, 80, 60 y 53 kDa) en el epimastigota de 27°C (canal E27). La comparación entre los epimastigotas de 27 y 37°C y el epimastigota mantenido en cultivo muestra cuatro bandas comunes (140, 80, 60 y 53 kDa, ubicados como punta de flecha a la izquierda del canal Ec) a los tres antígenos y de éstas, tres bandas (140, 80 y 53 kDa) son comunes con los antígenos de procedencia (canal T y A).



**Figura 16.** *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 revelado con *pool* de sueros de pacientes de otras patologías. Cada canal tiene 4  $\mu$ g de proteína incubado con *pool* de sueros de sueros de pacientes de otras patologías (1/1.000) y conjugado anti-IgG humano peroxidasa (1/8.000) y revelado por luminografía. T= tripomastigotas, A= amastigotas, E37= epimastigotas de 37°C, E27= epimastigotas de 27°C y Ec= epimastigotas de 6 días de cultivo en medio LITB. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

La Figura 16 muestra el análisis por *Inmunobloting* de los perfiles antigénicos de epimastigotas de *T. cruzi* de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo revelados por un *pool* de sueros de pacientes de otras patologías diluido 1/1.000. Se aprecia una baja intensidad y complejidad en los perfiles, revelando apenas cuatro bandas tenues (225, 90, 72 y 50 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal Ec) en el epimastigota mantenido en cultivo, tres de las cuales son comunes con el antígeno epimastigota E37 y E27 (90, 72 y 50 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal E37), tres bandas en el antígeno amastigota (canal A) y una en el tripomastigota (canal T). Al comparar el *pool* de sueros de pacientes de otras patologías con el *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos (Figura 16 *vs* Figura 14), se observa una banda (72 kDa) común en todos los estadios y una banda (90 kDa) común en el antígeno amastigota canal A). Al comparar el *pool* de sueros de pacientes de otras patologías con ún en el antígeno amastigota (canal A). Al comparar el *pool* de sueros de pacientes de otras patologías con ún en el antígeno amastigota (canal A). Al comparar el *pool* de sueros de pacientes de otras patologías con ún en el antígeno amastigota (canal A). Al comparar el *pool* de sueros de pacientes de otras patologías de otras patologías con el *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos (Figura 16 *vs* Figura 15), se observa solo la banda de 72 kDa común con el epimastigota mantenido en cultivo.

La Figura 17 muestra el análisis por *Inmunobloting* de los perfiles antigénicos de epimastigotas de *T. cruzi* de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo revelados por un *pool* de sueros de individuos sanos diluido 1/1.000. El *pool* de sueros de individuos sanos reconoció solo tres bandas antigénicas (75, 66 y 47 kDa, trazos cortos a la derecha del canal T) poco intensas en el antígeno de procedencia tripomastigota y la banda de 72 kDa (punta de flecha a la izquierda del canal E37) en los antígenos de epimastigota (canales E37, E27 y Ec), mientras que en el antígeno amastigota (canal A) no reveló bandas antigénicas. Al comparar el *pool* de sueros de individuos sanos con el *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos (Figura 17 *vs* Figura 14) y el *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos (Figura 17 *vs* Figura 15) se observan las bandas 47 y 72 kDa, común con los tripomastigotas y epimastigotas respectivamente.



**Figura 17.** *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 revelado con *pool* de sueros de individuos sanos. Cada canal tiene 4  $\mu$ g de proteína incubado con *pool* de sueros de individuos sanos (1/1.000) y conjugado anti-IgG humano peroxidasa (1/8.000) y revelado por luminografía. T= tripomastigotas, A= amastigotas, E37= epimastigotas de 37°C, E27= epimastigotas de 27°C y Ec= epimastigotas de 6 días de cultivo en medio LITB. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

### 4.8. Fraccionamiento de los antígenos de epimastigotas totales de *T. cruzi* (Dm28c) de 27°C y 37°C por electroelución múltiple

Las Figuras 18 y 19 muestran el análisis electroforético de las proteínas de epimastigotas de 27°C electroeluidas en las fracciones del rango de 225 y 25 kDa, que se corresponden al rango de los antígenos revelados por el *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos y crónicos. En el perfil total (canal E27, Figuras 18 y 19) se observan al menos 18 bandas proteicas de intensidad variable (175, 130, 100, 90,

80, 75, 72, 66, 60, 55, 50, dupleta 43/42, 39, 37, 35, 32, 30 y 27 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal E27), sugiriendo que los polipéptidos presentan concentraciones relativas diferentes y/o que tienen afinidad diferencial por el coomassie-plata. Se aprecia una relación directa entre la intensidad de los polipéptidos fraccionados (canales 8 a 20) y la intensidad de las bandas en el perfil total (canal E27). No se evidencia una relación directa entre cantidad de proteína ( $\mu$ g/canal) y las intensidades de las bandas. Esto puede ser debido a la afinidad diferencial de algunos polipéptidos por la plata metálica. Las fracciones de los tubos 20 a 30 no se tomaron en consideración por estar por debajo de los marcadores de peso molecular de referencia (resultados no mostrados).



**Figura 18.** SDS-PAGE al 10% de las fracciones 1 al 10 de las proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y teñidas con Coomassie-Plata. E27= epimastigotas de 27°C. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores (M) de peso molecular en kiloDaltons (kDa).



**Figura 19.** SDS-PAGE al 10% de las fracciones 11 al 20 de las proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y teñidas con Coomassie-Plata. E27= epimastigotas de 27°C. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores (M) de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

Las Figuras 20 y 21 muestran el mismo análisis electroforético para las proteínas de epimastigotas de 37°C en el rango de 225 y 25 kDa, que corresponden al rango de los antígenos revelados por el *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos y crónicos. En el perfil total (canal E37, Figuras 20 y 21) se observan al menos 17 bandas proteicas de diferente intensidad (175, 130, 90, 80, 75, 72, 66, 60, 55, 50, dupleta 43/42, 39, 37, 35, 32, 30 y 27 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal E37) en completa correspondencia con las proteínas separadas por SDS-PAGE de la Figura 8 canal E37. Se aprecia coincidencia entre la intensidad de los polipéptidos fraccionados (canales 6 a 20) y la de las bandas en el perfil total (canal E37), con

ausencia de relación entre la cantidad de proteína ( $\mu$ g/canal) estimada y las intensidades de las bandas en los canales, como descrito previamente. No se tomaron en consideración las fracciones de los tubos 20 a 30 por estar por debajo de los marcadores de peso molecular de referencia (resultados no mostrados).



**Figura 20.** SDS-PAGE al 10% de las fracciones 1 al 10 de las proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y teñidas con Coomassie-Plata. E37= epimastigotas de 37°C. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores (M) de peso molecular en kiloDaltons (kDa).



**Figura 21.** SDS-PAGE al 10% de las fracciones 11 al 20 de las proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y teñidas con Coomassie-Plata. E37= epimastigotas de 37°C. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores (M) de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

Las Figuras 22 y 23 muestran el análisis electroforético de las glicoproteínas de epimastigotas de 27°C electroeluidas en las fracciones del rango de 225 y 25 kDa. En el perfil total (canal E27, Figuras 22 y 23) se observan al menos 17 bandas glicoproteicas de intensidad variable (150, 120, 100, 80, 72, 66, 60, 57, 50, 47, dupleta 43/42, 39, 35, 32, 29, 27 y 25 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal E27). También se observa coincidencia entre la intensidad de los glicopéptidos fraccionados (canales 6 a 20) y la de las bandas en el perfil total (canal E27), así como ausencia de relación entre la cantidad de proteína ( $\mu$ g/canal) estimada y las

intensidades de las bandas en los canales, similar a lo observado en los perfiles proteico (Figuras 18 y 19).



**Figura 22.** SDS-PAGE al 10% de las fracciones 2 al 12 de las glicoproteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y teñidas con APABGP. E27= epimastigotas de 27°C. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal. Az= 3,5  $\mu$ g de mezcla de glicoconjugados. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores (M) de peso molecular en kiloDaltons (kDa).



**Figura 23.** SDS-PAGE al 10% de las fracciones 13 al 23 de las glicoproteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y teñidas con APABGP. E27= epimastigotas de 27°C. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal. Az= 3,5  $\mu$ g de mezcla de glicoconjugados. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores (M) de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

Las Figuras 24 y 25 muestran el mismo análisis electroforético para las glicoproteínas de epimastigotas de 37°C en el rango de 225 y 25 kDa. En el perfil total (canal E37, Figuras 24 y 25) se observan al menos 15 bandas glicoproteicas de diferente intensidad (150, 100, 85, 72, 66, 57, 50, 47, dupleta 43/42, 39, 35, 32, 29, 27 y 25 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal E37). También se aprecia coincidencia entre la intensidad de los glicopéptidos fraccionados (canales 6 a 23) y la de las bandas en el perfil total (canal E37), con ausencia de relación entre la cantidad de proteína ( $\mu$ g/canal) estimada y las intensidades de las bandas en los canales, como descrito previamente.



**Figura 24.** SDS-PAGE al 10% de las fracciones 2 al 12 de las glicoproteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y teñidas con APABGP. E37= epimastigotas de 37°C. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal. Az= 3,5  $\mu$ g de mezcla de glicoconjugados. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores (M) de peso molecular en kiloDaltons (kDa).



**Figura 25.** SDS-PAGE al 10% de las fracciones 13 al 23 de las glicoproteínas de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y teñidas con APABGP. E37= epimastigotas de 37°C. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal. Az= 3,5  $\mu$ g de mezcla de glicoconjugados. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores (M) de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

## 4.9. Caracterización de las bandas antigénicas fraccionadas de los epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) de 27°C y 37°C empleando *pool* de sueros de pacientes chagásicos

Las Figuras 26 y 27 muestran el perfil antigénico total de epimastigotas de 27°C revelado por el *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos (canal E27, Figuras 26 y 27) y los antígenos reconocidos en las fracciones proteicas separadas por electroelución (canales 4 a 19). Se aprecia que en el epimastigota de 27°C (canal E27), el *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos reveló 17 bandas con diferentes intensidades (195, 130, 120, 100, 85, 72, 66, 55, 50, 47, 42, 39, 35, 32, 29,

25 y 21 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal E27) mucho más que las ya descritas en la Figura 14, canal E27.



**Figura 26.** *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 2 al 12 de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal, incubado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos (1/7.500) y conjugado anti-IgG humano peroxidasa (1/10.000) y revelado por luminografía. E27= epimastigotas de 27°C. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

En las fracciones proteicas de los tubos 4 a 19, el *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos identificó 26 antígenos ( $\geq$  225, 195, 130, 120, 110, 100, 90, 85, 75, 72, 70, 66, 60, 55, 50, 47, 42, 39, 37, 35, 34, 32, 29, 27, 25 y 21 kDa, trazos cortos a la izquierda de los canales 4 a 19) mucho más bandas que las descritas en las proteínas separadas por SDS-PAGE y fraccionadas por electroelución de las Figuras 18 y 19. Se aprecian dos bandas antigénicas (130 y 50 kDa, punta de flecha a la izquierda del canal 5, Figura 26) no reveladas como bandas proteícas en el canal 5 de

la Figura 18 y 4 bandas antigénicas (150, 90 y 47 kDa, punta de flecha a la izquierda de los canales 13, 15 y 18, Figura 27) de mayor peso molecular que las identificadas en los canales 13, 15 y 18 de la Figura 19.



**Figura 27.** *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 13 al 23 de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal, incubado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos (1/7.500) y conjugado anti-IgG humano peroxidasa (1/10.000) y revelado por luminografía. E27= epimastigotas de 27°C. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

Las Figuras 28 y 29 muestran el perfil antigénico total de epimastigotas de 37°C revelado por el *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos (canal E37, Figuras 28 y 29) y los antígenos reconocidos en las fracciones proteicas separadas por electroelución (canales 4 a 20). Se aprecia que en el epimastigota de 37°C (canal E37), el *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos reveló 16 bandas de intensidad variable (195, 150, 130, 120, 90, 85, 75, 72, 66, 55, 47, 42, 35, 29, 25 y 21



kDa, trazos cortos a la izquierda del canal E37) mucho más que las ya descritas en la Figura 14, canal E37.

**Figura 28.** Inmunobloting (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 2 al 12 de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal, incubado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos (1/7.500) y conjugado anti-IgG humano peroxidasa (1/10.000) y revelado por luminografía. E37= epimastigotas de 37°C. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

En las fracciones proteicas de los tubos 4 a 20, el *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos identificó 27 antígenos ( $\geq$  225, 195, 150, 130, 125, 110, 100, 90, 85, 75, 72, 66, 60, 55, 50, 47, 43, 42, 40, 39, 35, 34, 32, 29, 27, 25 y 21 kDa, trazos cortos a la izquierda de los canales 4 a 20) mucho más bandas que las descritas en las proteínas separadas por SDS-PAGE y fraccionadas por electroelución de las Figuras 20 y 21. Se aprecia un antígeno (47 kDa, punta de flecha a la izquierda del canal 3, Figura 28) no revelado como banda proteica en el canal 3 de la Figura 20.



**Figura 29.** *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 13 al 23 de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal, incubado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos (1/7.500) y conjugado anti-IgG humano peroxidasa (1/10.000) y revelado por luminografía. E37= epimastigotas de 37°C. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

Las Figuras 30 y 31 muestran el perfil antigénico total de epimastigotas de 27°C revelado por el *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos (canal E27, Figuras 30 y 31) y los antígenos reconocidos en las fracciones proteicas separadas por electroelución (canales 6 a 15). Se aprecia que en el epimastigota de 27°C (canal E27), el *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos reveló 6 bandas de intensidad variable (150, 120, 100, 75, 57 y 50 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal E27).



**Figura 30.** *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 2 al 12 de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal, incubado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos (1/800) y conjugado anti-IgM humano peroxidasa (1/3.000) y revelado por luminografía. E27= epimastigotas de 27°C. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

En las fracciones proteicas de los tubos 6 a 12, el *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos identificó los mismos 6 antígenos (150, 120, 100, 75, 57 y 50 kDa, trazos cortos a la izquierda de los canales 6 a 12), mientras que en los tubos 13 a 20 no reconoció bandas antigénicas. En todos los canales (Figura 30 y 31) aparecieron dos bandas inespecíficas en torno al marcador de 50 kDa (punta de flecha a la izquierda del canal 3 y 14).



**Figura 31.** *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 13 al 23 de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, separadas por electroelución y revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal, incubado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos (1/800) y conjugado anti-IgM humano peroxidasa (1/3.000) y revelado por luminografía. E27= epimastigotas de 27°C. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

Las Figuras 32 y 33 muestran el perfil antigénico total de epimastigotas de 37°C revelado por el *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos (canal E37, Figuras 32 y 33) y los antígenos reconocidos en las fracciones proteicas separadas por electroelución (canales 5 a 16). Se aprecia que en el epimastigota de 37°C (canal E37), el *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos reveló 8 bandas con diferentes intensidades (150, 130, 85, 72, 55, 47, 42 y 32 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal E37).



**Figura 32.** *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 2 al 12 de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal, incubado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos (1/800) y conjugado anti-IgM humano peroxidasa (1/3.000) y revelado por luminografía. E37= epimastigotas de 37°C. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

En las fracciones proteicas de los tubos 5 a 16, el *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos identificó los mismos 8 antígenos (150, 130, 85, 72, 55, 47, 42 y 32 kDa, trazos cortos a la izquierda de los canales 5 a 16). En todos los canales (Figura 32 y 33) aparecieron dos bandas inespecíficas en torno al marcador de 50 kDa (punta de flecha a la izquierda del canal 3 y 14) al igual que lo observado en las Figuras 30 y 31.



**Figura 33.** *Inmunobloting* (SDS-PAGE 10%) de las fracciones 13 al 23 de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0 a 37°C, separadas por electroelución y revelado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos. Al pie del gel se muestra la cantidad de proteína ( $\mu$ g) por canal, incubado con *pool* de sueros de pacientes chagásicos agudos (1/800) y conjugado anti-IgM humano peroxidasa (1/3.000) y revelado por luminografía. E37= epimastigotas de 37°C. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

### 4.10. Evaluación de la calidad de los antígenos totales procedentes de epimastigotas de 27°C y 37°C mediante ELISA

La Tabla 4 muestra el título de los *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos, individuos sanos y pacientes con diversas patologías, contra antígenos totales de epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) de diferentes procedencias y temperaturas de cultivo analizados por ELISA. Se aprecia que para los dos antígenos, el suero usado como control positivo para la técnica de ELISA presentó un título de 1/5.120 y que el suero control negativo, un título menor que 1/20. El *pool* de sueros

de pacientes chagásicos crónicos presentó un título de 1/5.120 contra los dos antígenos producidos al igual a lo observado en el control positivo. El *pool* de sueros de pacientes de otras patologías un título de 1/320 contra los antígenos epimastigotas de 37°C y un título menor (1/160) contra los antígenos epimastigotas de 27°C. El *pool* de sueros de individuos sanos un título de 1/80 para ambos antígenos. Estos resultados demuestran que los antígenos epimastigotas obtenidos a 27°C y 37°C representan igual oferta antigénica mediante ELISA para los *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos y que las diferencias en reactividad solo pueden ser evidenciadas mediante la técnica de *Inmunobloting*.

	Antígeno			
Anticuerpo	E37	E27		
Control positivo	5120	5120		
Pool sueros chagásicos crónicos	5120	5120		
<i>Pool</i> sueros otras patologías	320	160		
Pool sueros sanos	80	80		
Control negativo	<20	<20		

**Tabla 4.** Titulación mediante la técnica de ELISA de los *pool* de sueros usando epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) obtenidos en medio ML15-HA pH 7,0

500 ng de antígeno por pozo (E37= epimastigotas de 37°C, E27= epimastigotas de 27°C) y conjugado anti-IgG humano peroxidasa (1/5.000). Los valores se expresan como el inverso del titulo y corresponden a datos obtenidos por duplicado, como descrito en Metodología.

#### **CAPÍTULO V**

#### **5. DISCUSIÓN**

En este trabajo se demostró que es posible obtener poblaciones puras y estables de epimastigotas de 37°C derivados de amastigotas obtenidos a partir de metacíclicos (amastigotas primarios) y epimastigotas de 27°C derivados de tripomastigotas (tipo hemático), cuyos perfiles proteicos y glicoproteicos son similares entre sí y significativamente diferentes de sus estadios de procedencia. Estos epimastigotas expresaron antígenos específicos que no tuvieron relevancia diagnóstica detectable por técnicas serológicas convencionales (ELISA e *Inmunobloting*).

La epimastigogénesis (diferenciación del tripomastigota hacia epimastigota) in vivo e in vitro se dispara por la caída de temperatura. In vitro, este proceso de transformación es dramáticamente afectado por factores como tensión de oxígeno (De Lima y col., 2005; Contreras y col., 2005) y nivel de glucosa en el medio (Tyler y Engman, 2000), acelerando o haciendo más lenta la transformación. La existencia de una morfología amastigota a 27°C de transición entre el tripomastigota y epimastigota ha sido demostrada y ampliamente estudiado (Graterol y col., 2014; Kessler y col., 2017). Se ha propuesto que T. cruzi in vitro se adaptan morfológica y molecularmente mimetizando propiedades biológicas y antigénicas de otros estadios (Contreras y col., 2006). Es evidente que en el proceso morfogenético de diferentes tripanosomatídeos las proteínas de choque térmico juegan un papel determinante en la diferenciación participando en la sobrevivencia del parásito como chaperonas de otras proteínas (Hombach y col., 2014). Exhaustivos estudios evidencian que diferentes familias de las proteínas de estrés térmico en T. cruzi están conservadas y son inducidas por aumento de temperatura y actúan como chaperonas durante los procesos de diferenciación (Rondinelli, 1994; Urményi y col., 2014), es sugestivo pensar que
algunas de ellas podrían estar participando para la sobrevivencia de los epimastigotas obtenidos a 37°C. El uso de estos estadios obtenidos axenicamente permitirá conocer elementos regulatorios involucrados en el control post-transcripcional en la expresión de genes estadio específicos (Araujo y Texeira, 2011).

En los estudios de morfogénesis de *T. cruzi* tales como metaciclogénesis, amastigogénesis y epimastigogénesis inducidas en condiciones axénicas, son influenciados por factores inherentes al aislado y al microambiente en el cual ocurre la diferenciación (Contreras y col., 2006). De ahí que la formulación y fabricación del medio ML15-HA que permitió la obtención de epimastigotas de 37°C y la producción de epimastigotas de 27°C similar a los epimastigotas estándar producidos en medios axénicos convencionales, representa un aporte que contribuye al estudio de propiedades estructurales y comportamientos fisiológico y bioquímico del parásito, evitando los inconvenientes que puedan derivar de su aislamiento a partir de cultivos de tejidos (Zaidenberg y col., 2000).

Para la obtención en condiciones axénicas de epimastigotas a 27°C derivados de tripomastigotas hemos utilizado diversos medios de cultivo. De Lima y col., (2007) trabajando con el clon EPm<sub>6</sub> de *T. cruzi* procedente de humanos en un medio químicamente no definido como el medio LIT B con 10% de SFB a 27°C evidenciaron que durante el proceso de transformación morfológica no ocurre multiplicación y el evento cursa con la aparición de una morfología de transición previo a su diferenciación en epimastigotas. Similares resultados se obtuvieron por Barrios y col., (2008) trabajando con el mismo clon a igual temperatura y usando un medio semi-definido como el medio MEMTAU con 5% de SFB, mostrando que los parásitos en diferenciación pasan por formas amastigotas antes de transformarse en epimastigotas y a partir del día 6 se incrementa progresivamente hasta 6 veces la población y los epimastigotas se hacen predominantes. Gigante y col., (2009) trabajando en condiciones equivalentes con el clon Dm28c (procedente de un

reservorio marsupial) e incubando en medio semi-definido ML15-HA con 5% de SFB mostraron que los mayores cambios morfológicos ocurren en las primeras 24 horas con una caída del porcentaje de tripomastigotas e incremento de los amastigotas y es a partir del día 2 que los epimastigotas se establecen como morfología predominante hasta el día 10, con un incremento de 59 veces el inóculo. En nuestro estudio se logró simular in vitro en medio ML15-HA con 10% de SFB a 27°C y reproducir el evento de transformación de tripomastigotas a epimastigotas reportado por Gigante y col., (2009) observándose el día 5 un aumento de 10,3 veces el inóculo, con un incremento progresivo del porcentaje de epimastigotas entre el día 2 y día 5 desde 25% hasta 87%. Se evidencia que el clon Dm28c es un parásito que responde rápidamente a los procesos de transformación a 27°C y confirma la sucesión de eventos durante el proceso de diferenciación reportados por otros autores (De Lima y col., 2007; Barrios y col., 2008). Se demuestra que en los medios LIT B y ML15-HA nutricionalmente más ricos que el medio semi-definido MEMTAU, el proceso de transformación de los tripomastigotas en epimastigotas ocurre a mayor velocidad indistintamente del aislado (EPm<sub>6</sub> ó Dm28c) como reportado por Graterol y col., (2013b).

Por otra parte, estudios que muestran el comportamiento de los amastigotas en los medios de cultivo para la obtención de epimastigotas han sido descritos. En contraste con los amastigotas intracelulares que se diferencian a tripomastigotas (Zaidenberg y col., 1995) los extracelulares lo hacen a epimastigotas (Engel y Dvorak, 1988). Zaidenberg y col., (2000) estudió el crecimiento de cultivos de amastigotas incubados a 27°C en el medio definido F29 evidenciando una fase estacionaria alrededor del día 6 del cultivo a partir del cual se observó transformación al estadio epimastigota. En estos cultivos sin renovación del medio, al cabo de 16 días de incubación, la población de parásitos consistía en 82% de epimastigotas y 18% de amastigotas. En los experimentos de Engel y Dvorak (1988), la transformación a epimastigotas fue inhibida por cambios del medio de cultivo. En nuestros experimentos a 37°C, el estadio de amastigota a partir del día 2, pudo transformarse en epimastigota sin renovación del medio de cultivo, lo que demuestra que es posible mantener y estudiar este estadio a una temperatura similar a la del hospedador humano.

Si bien a nivel morfológico mediante microscopia óptica, no se aprecian diferencias entre los epimastigotas obtenidos (Figuras 6 y 7), nuestros resultados muestran que los eventos de diferenciación son diferentes. El tripomastigota tipo hemático para transformarse a epimastigota a 27°C sufre un acortamiento para formar el amastigota y luego un alargamiento hasta formar el epimastigota que puede ocurrir al 2do día de incubación mientras que el amastigota para transformarse a epimastigota a 37°C lo hace más rápidamente al 1er día de incubación, lo que puede deberse además del estrés de temperatura, al cultivo de los parásitos en una condición de alta tensión de oxígeno que aumenta la velocidad de diferenciación a epimastigotas como ha sido reportado por Graterol y col., (2013a) y que puede estar asociado al metabolismo oxidativo utilizado por *T. cruzi* (Engel y col., 1987). Un estudio mediante microscopia electrónica de barrido de los eventos de transformación morfológica y de superficie de ambos epimastigotas (27 y 37°C) destacaría diferencias relevantes como las observadas entre amastigotas de *T cruzi* de diferentes procedencias (Navarro y col., 2003).

*T. cruzi* presenta perfiles proteicos y glicoproteicos con bandas comunes y específicas que caracterizan cada estadio. La comparación en proteínas de epimastigotas muestra perfiles similares indistintamente de la condición de cultivo o procedencia epidemiológica. Sin embargo, la comparación a nivel de glicoproteínas muestra algunas diferencias con bandas de distinta intensidad asociados a condiciones de mantenimiento o procedencia del epimastigota (Contreras y col., 1998; De Lima y col., 2008). Nuestros resultados confirman que existen cambios proteicos y glicoproteicos significativos de los epimastigotas obtenidos a 27 y 37°C respecto a

estadios de procedencia y una alta similitud en los perfiles entre epimastigotas de diferentes procedencias (Figuras 8 y 9).

El uso de sueros hiperinmunes contra estadios de T. cruzi son de gran utilidad para revelar antígenos proteicos o glicoproteicos específicos de estadio. En contraste con la alta capacidad resolutiva de los anticuerpos monoclonales, el uso de sueros anti-estadio son más ventajosos en estudios de morfogénesis de T. cruzi. La utilización de los anticuerpos monoclonales es limitada por cuanto identifican un evento puntual en un parásito heterogéneo poblacionalmente y donde un mismo epítopo puede estar presente en dos estadios diferentes (Beard y col., 1985; Chao y Dusanic, 1985; Pan y McMahon-Pratt, 1989). Los sueros hiperinmunes anti-estadio revelan simultáneamente la dominancia relativa de varios antígenos contra su estadio homólogo. Por tanto, sueros anti-estadio, preparados en conejo son comúnmente usados para estudiar cambios antigénicos in vitro que ocurren durante la transformación morfológica del parásito (Contreras y col., 1985; 2002; Navarro y col., 2003). Los sueros anti-epimastigota, anti-metacíclicos, anti-tripomastigota y anti-amastigota son útiles porque cada uno de ellos revela mediante Inmunobloting un perfil antigénico estadio específico. El uso en Inmunobloting de cada antisuero antiestadio por separado usando igual cantidad de proteínas está limitado porque cada antisuero presenta el más alto título contra su estadio homólogo. Esta limitación puede ser abolida usando un suero anti los cuatro estadios (anti-TEMA) que revele diferencialmente cada estadio y muestre una alta similitud con los perfiles antigénicos de cada suero por separado contra su estadio homólogo (Graterol y col., en preparación). En nuestro estudio, el suero anti-TEMA (Figura 11) reveló acentuados cambios antigénicos, en epimastigotas derivados de tripomastigotas, con su estadio de procedencia (canal E27 vs T) y mayor similitud en epimastigotas derivados de amastigotas y su estadio de procedencia (canal E37 vs A) y confirmó los resultados revelados por el suero anti-E (Figura 10). Lo más interesante de estos resultados es que los perfiles de epimastigotas de 27 y 37°C (canal E27 y E37) presentan bandas ausentes en los epimastigotas controles (canal Ec) indicando que comparten antígenos de los estadios de procedencia (canal T y A) y hacen de ellos un valioso material que vale la pena estudiar con fines diagnósticos. Se identificaron seis antígenos epimastigota específicos (72, 66, 57/55, 50, 44 y 33 kDa, Figuras 10 y 11) que son revelados por el antisuero anti-E y anti-TEMA, coincidiendo en el mismo rango que los reportados en la bibliografía como epimastigota específicos (Sher y Snary, 1982; Kirchhoff y col., 1984) ya sugeridos como marcadores de epimastigotas (Rangel-Aldao y col., 1986).

Se han reportado múltiples antígenos *T cruzi*-estadio-específicos, algunos de ellos de utilidad diagnóstica asociados a fases de la ECh (Kloetzel y col., 1975; Texeira y Yoshida, 1986; Andrews y col., 1988; Pan y McMahon-Pratt, 1989; Harth y col., 1989; Primavera y col., 1990; Berrizbietia y col., 2004). Estudios usando *Inmunobloting* han propuesto patrones de bandas antigénicas características para diferenciar pacientes chagásicos y de otras patologías (Israelsky y col., 1988; Mendes y col., 1997; Reiche y col., 1998; Riera y col., 2012).

En nuestro estudio, el uso del *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos con conjugado anti-IgG para analizar los epimastigotas de 37°C (E37) pretendió evaluar su calidad antigénica respecto a un epimastigota sabidamente útil para diagnóstico como control (Ec) y valorar cuán diferente era del epimastigota cultivado por corto tiempo en medio ML15-HA (E27) y a su vez identificar antígenos comunes con los estadios de procedencia. Aún cuando se observa un alto grado de similitud entre los tres epimastigotas (E37, E27 y Ec, Figura 14), los anticuerpos IgG del *pool* crónico revelaron diferencias antigénicas. La mayor similitud se observó intra epimastigotas de medio ML15-HA (E37 y E27) respecto a epimastigotas de medio LITB, lo que pudiera ser atribuible a la condición de mantenimiento (Contreras y col., 1998) y a la capacidad de estos anticuerpos para revelar diferencias significativas entre los antígenos del epimastigota control y los estadios de procedencia (Ec *vs* T y

A, Figura 14). Es evidente la calidad de la oferta antigénica que representa el epimastigota de 37°C para su empleo con fines diagnósticos. Los anticuerpos IgM del *pool* agudo mostraron mayor abundancia e intensidad de bandas antigénicas en los amastigotas primarios haciendo de este estadio la mejor oferta antigénica (A, Figura 15). Esos anticuerpos revelaron diferencias significativas entre los tres epimastigotas (E37, E27 y Ec, Figura 15), en particular la baja intensidad y menor número de bandas hace de los epimastigotas de medio LITB una pobre oferta antigénica para anticuerpos de fase aguda. Mientras que los epimastigotas derivados de una reciente diferenciación de sus estadios de procedencia parecen ser una mejor oferta antigénica

El hecho que los epimastigotas de 37°C muestren diferencias en los perfiles antigénicos cuando son revelados por suero de pacientes chagásicos agudos y crónicos, no es de extrañar por cuanto corresponden a anticuerpos diferentes dirigidos contra epítopos diferentes, sin embargo las bandas antigénicas de igual peso molecular revelados por ambos pool (80, 72, 60 y 55 kDa) podrían corresponder a antígenos revelados por anticuerpos comunes a ambos sueros. La reactividad de sueros de individuos sanos y de otras patologías con antígenos de T. cruzi como la encontrada en nuestros resultados (Figuras 16 y 17) ya ha sido descrita. Escalante y col., (2014) trabajando con antígenos de excreción/secreción de epimastigotas identificaron mediante Western blot 12 bandas inespecíficas de reacción cruzada con sueros de otras patologías (112, 100, 91, 69, 63, 58, 46, 42, 40, 36, 33 y 30 kDa) que coinciden con evidencias de otros autores mostrando la existencia de antígenos comunes (124, 107, 92, 65, 60, 59 y 32 kDa) entre Leishmania sp. y T. cruzi (Silveira-Lacerda y col., 2004). Esta reactividad cruzada se explica por la existencia de epítopos comunes entre ellos, glicoproteínas que contienen galactosil (Gal) terminal y proteínas derivadas del citoesqueleto, como la tubulina, que son semejantes en muchos tripanosomatídeos y al reconocimiento de que las proteínas capaces de ligar ácidos grasos "FABP" (fatty acid binding proteins) son específicas de los diferentes tejidos. Dentro de las limitaciones de operatividad y metodología no hay duda que los epimastigotas derivados de amastigotas de 37°C (E37) representan un antígeno interesante como oferta antigénica que debe ser estudiado con abordajes metodológicos de mayor resolución como *Inmunobloting* bidimensional.

La estandarización en el análisis inmunológico de fracciones de epimastigotas de 27 y 37°C representó una sucesión de ajustes para: a) fraccionamiento por electroelución (relación de lisis, cantidad de proteína a colocar en el electroelutor, ajuste del volumen de la fracción electroeluída, estimación de proteína en tampón de electroelución, concentración de proteínas por precipitación ácida, recuperación de la fracción proteica, adecuación de la muestra para la electroforesis SDS-PAGE), b) adecuar la cantidad de muestra en las fracciones para revelar proteínas, glicoproteínas y para la electrotransferencia de fracciones a la MNC con cantidades suficientes para análisis por *Inmunobloting* y c) estimación de la relación óptima antígeno/anticuerpo para los sueros de fase crónica y aguda. El ajuste de estas variables permitió adquirir la experticia para identificar diferencias entre antígenos de epimastigotas de 27 y 37°C usando sueros de pacientes chagásicos de fase aguda y crónica.

El análisis de los resultados (Figuras 18 a 25) evidencia la operatividad de la técnica de fraccionamiento (coincidencia entre las bandas en el perfil total con las fraccionadas). Se aprecia una relación directa entre la intensidad de los polipéptidos fraccionados (canales 8 a 20) y la intensidad de las bandas en el perfil total (canal E27, Figura 18 y 19). El patrón de fraccionamiento de los epimastigotas de 37°C es diferente de los de 27°C, que pudiesen ser debido a variables inherentes al operador. Llama la atención la regularidad en el decrecimiento del peso molecular de los polipéptidos fraccionados, sugiriendo diferencias en el contenido de proteínas en los epimastigotas de 37°C. En la Figura 20 y 21 también se aprecia coincidencia entre la intensidad de los polipéptidos fraccionados (canales 6 a 20) y la de las bandas en el perfil total (canal E37). Era de esperar que a mayor cantidad de proteína total de cada

banda fraccionada colocada en el canal se correspondiera a una mayor intensidad en la tinción. En algunos casos no se aprecia esta correlación en epimastigotas de 27 (Figuras 18, 19 y 22, 23) y epimastigotas de 37 (Figuras 20, 21 y 24, 25). Eso es debido a que la técnica de tinción de proteínas usada no es cuantitativa (Coomassie blue y plata metálica) y depende de la afinidad diferencial de algunos polipéptidos por la plata metálica, similar situación ocurre con las glicoproteínas y la tinción de APABGP.

Las diferentes bandas reveladas tanto en el antígeno total como en las fracciones aisladas por electroelución, indican que independientemente de la purificación, las fracciones de proteína de estos epimastigotas después de un elaborado procesamiento conservan sus propiedades antigénicas al ser reconocidas por los anticuerpos IgG e IgM en los *pool* de sueros de pacientes chagásicos crónicos y agudos (Figuras 26 a 33). Como fue discutido previamente la mejor oferta antigénica para fase aguda la representaron los antígenos de amastigota y epimastigotas de 37°C (canales A, E37, Figura 15) por la mayor intensidad y número de bandas reconocidas por los anticuerpos IgM, mientras que para la fase crónica revelaron como mejor antígeno los epimastigotas de 37°C y epimastigotas controles (canales E37 y Ec, Figura 14). Esta observación se convalidó con los análisis comparativos de antígenos revelados por los pool crónicos y agudos en las fracciones de epimastigotas de 27 y 37°C, debido a una mayor capacidad discriminante. Las bandas antigénicas son reconocidas con gran intensidad desde las primeras fracciones (corresponden a antígenos de mayor peso molecular) sin diferencias significativas para el *pool* de suero de fase crónica (Figura 26 y 28), mientras que los epimastigotas de 37°C ofrecen mayor número de antígenos y mayor intensidad al iniciarse la señal lumínica desde los primeros canales (Figura 28). Los anticuerpos IgM no revelaron bandas en los epimastigotas de 27°C correspondiente a fracciones menores que 50 kDa (Figura 31), mientras que si las revelaron en las fracciones menores de 50 kDa en los epimastigotas de 37°C (Figura 33). Adicionalmente, la posibilidad de aumentar la concentración de antígeno fraccionado por canal garantiza incrementar aún más la intensidad de la señal luminográfica.

Un ajuste más fino en este abordaje metodológico podría evitar la eventual presencia de señales luminográficas espurias de mayor o menor peso molecular, que no se corresponden con los polipéptidos separados en la fracción por SDS-PAGE e identificados por Coomassie-Plata. Las bandas con pesos moleculares mayores que los polipéptidos de esa fracción, pudieron ser producto de la agregación de polipéptidos antigénicos de menor peso molecular, lo que se reduciría incrementando la astringencia en el procesamiento de la muestra y en el caso de las señales luminográficas de menor peso molecular que podría ser debido a fragmentos antigénicos producidos por proteólisis de proteínas de mayor peso molecular, podría ser corregido incrementando la mezcla de inhibidores de proteasas. La factibilidad demostrada de nuestro abordaje metodológico reduce la complejidad de resultados con antígenos totales, al poder reducir el análisis a un grupo particular de polipéptidos de aquella(s) banda(s) de interés diagnóstico para análisis por *Inmunobloting* bidimensional.

El análisis de los antígenos totales de epimastigotas de 27 y 37°C mediante ELISA con sueros sabidamente negativos y positivos como controles y con el *pool* de pacientes chagásicos crónicos usados en el *Inmunobloting*, más que buscar diferencias en términos de títulos fue evidenciar su viabilidad para el diagnóstico. Como era de esperar ambos antígenos fueron vistos como iguales por el suero control positivo así como por el *pool* de sueros. Dado que el *Inmunobloting* reveló diferencias entre ambos antígenos, sería interesante aumentar la especificidad de la técnica de ELISA utilizando sólo las fracciones de los antígenos inmunodominantes de 27°C y 37°C y comprobar si hay diferencias en los títulos de sueros de pacientes en fase aguda y crónica de la ECh.

## CONCLUSIONES

- Se logró producir formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* Dm28c a 27°C y 37°C por cultivo axénico en medio ML15-HA.
- 2.- Se evidenció diferentes cinéticas de transformación de amastigotas y tripomastigotas, en ambas condiciones con predominio de epimastigotas al tercer día de incubación y un acentuado rendimiento poblacional en epimastigotas a 27°C derivados de tripomastigotas.
- 3.- Se demostró cambios significativos en los perfiles proteicos y glicoproteicos de los epimastigotas respecto a estadio de procedencia (amastigotas y tripomastigotas) y alta similitud intra epimastigotas de diferentes procedencias respecto a epimastigotas controles mantenidos en cultivo por tiempo prolongado.
- 4.- Existen diferencias antigénicas entre epimastigotas reveladas por un suero hiperinmune estadio específico (anti-E) y confirmadas por un suero hiperinmune de los cuatro estadios (anti-TEMA).
- 5.- El suero anti-TEMA evidenció la mayor similitud antigénica entre los epimastigotas de 37°C con su estadio de procedencia (amastigota) que entre los epimastigotas de 27°C y su estadio de procedencia (tripomastigotas) compatible con cinéticas de transformación diferentes.
- 6.- Se estableció el fraccionamiento y análisis antigénico con alta capacidad discriminante para epimastigotas de diferentes procedencias (E27 y E37) mediante la operatividad de la técnica de fraccionamiento antigénico por

electroelución múltiple simultáneamente con el análisis mediante *Inmunobloting*.

- 7.- Los epimastigotas de 27 y 37°C mostraron diferencias antigénicas detectadas por *pool* de sueros de pacientes crónicos y agudos, en antígenos totales y fraccionados por electroelución múltiple y la presencia de antígenos de igual peso molecular que son revelados por ambos anticuerpos.
- 8.- Los epimastigotas de diferentes procedencias (E27 y E37) expresan antígenos específicos sin relevancia diagnóstica detectable por técnicas serológicas convencionales como la técnica de ELISA.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aguiar C, Batista AM, Pavan TB, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, Costa SC. (2012). Serological profiles and evaluation of parasitaemia by PCR and blood culture in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benzonidazole. Trop Med Int Health. 17(3): 368-73.
- Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez JA, Abate T, Naranjo L, Paiva M, Rivas L, Castro J, Márques J, Mendoza I, Acquatella H, Torres J, Noya O. (2010). Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. J Infect Dis. 201(9): 1308-15.
- Alarcón de Noya B, Martínez J. (2009). Transmisión oral de la enfermedad de Chagas en Venezuela: un segundo brote escolar. Salus. 13(2): 9-10.
- Alarcón M, Moreno E, Colasante C, de Yarbuh AL, Cáceres K, Araujo S. (2011). Presencia de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en el plasma seminal de ratones con infección aguda. Bol Mal Salud Amb. 51(2): 237-9.
- Almeida de Faria M, Freymüller E, Colli W, Alves MJ. (1999). *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. Exp Parasitol. 92(4): 263-74.
- Almeida IC, Ferguson MA, Schenkman S, Travassos LR. (1994). Lytic anti-alphagalactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositolanchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. Biochem J. 304(3): 793-802.
- Almeida IC, Gazzinelli R, Ferguson MA, Travassos LR. (1999). *Trypanosoma cruzi* mucins: potential functions of a complex structure. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94(1): 173-6.
- Andersen P, Heron, I. (1993). Simultaneous electroelution of whole SDSpolyacrylamide gels for the direct cellular analysis of complex protein mixtures. J Immunol Method. 161(1): 29-39.
- Andrews NW, Robbins ES, Ley V, Hong KS, Nussenzweig V. (1988). Developmentally regulated, phospholipase C-mediated release of the major

surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J Exp Med. 167(2): 300-14.

- Añez N, Crisante G, Rojas A, Díaz N, Añez-Rojas N, Carrasco H, Parada H, Aguilera M, Moreno G, Galíndez I, Sandoval R, Sandoval I, Vásquez L, Nava O, Guerra F, Uzcátegui G, Yépez J, Rodríguez C, Bonfante R. (2003). La cara oculta de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Bol Mal Salud Amb. 43(2): 45-57.
- Añez N, Crisante G, Rojas A. (2004). Update on Chagas disease in Venezuela: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99(8): 781-7.
- Araújo PR, Teixeira SM. (2011). Regulatory elements involved in the posttranscriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 106(3): 257-66.
- Barrios JG, Contreras O, Graterol D, Navarro MC, Contreras VT, De Lima AR. (2008). *Trypanosoma cruzi*: Epimastigogénesis en condiciones axénicas. Cambios morfológicos, peptídicos, glicopeptídicos y antigénicos. Acta Cient Venez. 59(1): 29-38.
- Beard CA, Wrightsman RA, Manning JE. (1985). Identification of monoclonal antibodies against the trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* by use of iminobiotinylated surface polypeptides. Mol Biochem Parasitol. 16(2): 199-212.
- Berenguer JG. (2007). Manual de Parasitología: Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario Vol. 31. Barcelona: Edicions Universitat.
- Berrizbietia M, Ndao M, Gottschalk M, Aché A, Vásquez F, Lacouture S, Medina M, Ward BJ. (2004). Development and comparison of enzyme immunoassays for diagnosis of Chagas' disease using fixed forms of *Trypanosoma cruzi* (Epimastigotes, Amastigotes, and Trypomastigotes) and assessment of antigen stability for the three assays. J Clin Microbiol. 42(4): 1766-9.
- Bonfante-Cabarcas R, Rodríguez-Bonfante C, Vielma B, García D, Saldivia A, Aldana E, Curvelo JL. (2011). Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* y factores asociados en un área endémica de Venezuela. Cad Saúde Pública. 27(10): 1917-29.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-54.

Brener Z. (1973). Biology of Trypanosoma cruzi. Annu Rev Microbiol. 27: 347-82.

- Burleigh BA, Andrews NW. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. Annu Rev Microbiol. 49: 175-200.
- Cannova DC, Arvelo L, Simons MI. (2003). Seroepidemiología de tripanosomiasis americana, sector Las Cuevas estado Carabobo. Salus. 7(1): 28-33.
- Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. (2015). Congenital Chagas disease: an update. Mem Inst Oswaldo Cruz. 110(3): 363-8.
- Carreira JC, Jansen AM, de Nazareth Meirelles M, Costa e Silva F, Lenzi HL. (2001). *Trypanosoma cruzi* in the scent glands of *Didelphis marsupialis*: the kinetics of colonization. Exp Parasitol. 97(3): 129-40.
- Carvalho ADM. (1973). Estudos sobre a posição sistemática, a biologia ea transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (*Hemiptera, Reduviidae*). Rev Pat Trop. 2: 223-74.
- Cervantes-Landín A, Martínez-Martínez I, Reyes P, Shabib M, Espinoza-Gutiérrez B. (2014). Estandarización de la técnica Dot-ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* y su comparación con ELISA y Western blot. Enferm Infecc Microbiol Clin. 32(6): 363-8.
- Chagas C. (1909). Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1(2): 159-218.
- Chao D, Dusanic DG. (1985). Monoclonal antibodies to metacyclic stage antigens of *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg. 34(4): 694-701.
- Chiller TM, Samudio MA, Zoulek G. (1990). IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 43(6): 650-6.
- Contreras V, De Lima A, Navarro M. (2006). Morfogénesis de *Trypanosoma cruzi*: Factores relevantes para la diferenciación *in vitro*. Rev Acta Biol Venez. 26(2): 49-60.
- Contreras V. (1994). Elemento de apoyo para trabajar en la enfermedad de Chagas. Valencia: Clemente Editores, 1<sup>era</sup> Ed, Universidad de Carabobo.

- Contreras VT, Arteaga R, Graterol D, De Lima AR, Farías M, Pineda W, Navarro MC. (2005). Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico: factores relevantes. LV Convención anual de AsoVAC, 20 al 25 de Noviembre de 2005. Caracas, Venezuela.
- Contreras VT, De Lima AR, Zorrilla G. (1998). *Trypanosoma cruzi*: Maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 93(6): 753-60.
- Contreras VT, Navarro MC, De Lima AR, Arteaga R, Duran F, Azkue J y Franco Y. (2002). Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 97(8): 1213-20.
- Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. (1985). *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol Biochem Parasitol. 16(3): 315-27.
- Cooley G, Etheridge RD, Boehlke C, Bundy B, Weatherly DB, Minning T, Haney M, Postan M, Laucella S, Tarleton RL. (2008). High throughput selection of effective serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. PLoS Negl Trop Dis. 2(10): e316.
- Council for International Organizations of Medical Sciences. (2002). Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. Disponible en: <u>http://www.cmdlt.edu.ve/04-institucion/pdfs/CIOMS.pdf</u>
- Coura JR, Dias JCP. (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104(1): 31-40.
- Coura JR. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed A background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 102(1): 113-22.
- Crisante G, García P, Rojas A, Graterol D, Contreras V, Añez N. (2015). Validation of *Trypanosoma cruzi*-GPI anchored membrane proteins for specific sero-diagnosis of Chagas disease. Am J Microbiol Biotech. 2(3): 26-37.
- De Lima AR, Aparicio A, Berrocal A, Navarro MC, Graterol D, Contreras V. (2007). Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico: cambios peptídicos, glicopeptídicos y enzimáticos. Salus. 11(2): 39-47.
- De Lima AR, Arteaga R, Zorrilla G, Garboza R, Flores G, Araque W, Contreras V. (1996). Glicoproteínas estadio específicas de *Trypanosoma cruzi*. Acta Cient Venez. 47(1): 211.

- De Lima AR, Farías MN, Tortolero E, Navarro MC, y Contreras VT. (2001). Purificación parcial y empleo de fracciones glicosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Acta Cient Venez. 52: 235-47.
- De Lima AR, Graterol D, Arteaga R, Farías M, Pineda W, Navarro MC, Contreras VT. (2005). Cambios morfológicos, peptídicos y glicopeptídicos durante la epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico. LV Convención anual de AsoVAC, 20 al 25 de Noviembre de 2005. Caracas, Venezuela.
- De Lima AR, Navarro MC, Arteaga RY, Contreras VT. (2008). Cultivation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in low glucose axenic media shifts its competence to differentiate at metacyclic trypomastigotes. Exp Parasitol. 119(3): 336-42.
- De Moreno MR, Smith JF, Smith RV. (1985). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie bluesilver stain procedure. Anal Biochem. 151(2): 466-70.
- De Sousa MA. (1983). A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-cellulose columns. Mem Inst Oswaldo Cruz. 78(3): 317-33.
- De Souza W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Curr Pharm Des. 8(4): 269-85.
- Deane MP, Lenzi HL, Jansen A. (1984). *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 79(4): 513-5.
- Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 97(5): 603-12.
- Dias JCP. (2000). Epidemiología. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Eds. Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Dias JCP. (2006). Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Rev Soc Bras Med Trop. 39(4): 370-5.
- Díaz-Bello Z, Zavala-Jaspe R, Díaz-Villalobos M, Mauriello L, Maekelt A, Alarcón de Noya B. (2008). Diagnóstico confirmatorio de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en donantes referidos por bancos de sangre en Venezuela. Invest Clin. 49(2): 141-50.

DPDx CDC. (2013).

Disponible en: http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html

- Dutra WO, Rocha MO, Teixeira MM. (2005). The clinical immunology of human Chagas disease. Trends Parasitol. 21(12): 581-7.
- Engel JC, Dvorak JA. (1988). *Trypanosoma cruzi*: cell biological behavior of epimastigote and amastigote forms in axenic culture. J Protozool. 35(4): 513-8.
- Engel JC, Franke de Cazzulo BM, Stoppani AO, Cannata JJ, Cazzulo JJ. (1987). Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigotelike forms during growth and differentiation to epimastigotes. Mol Biochem Parasitol. 26(1-2): 1-10.
- Engvall E, Perlmann P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 8(9): 871-4.
- Escalante H, Jara C, Davelois K, Iglesias M, Benites A, Espinoza R. (2014). Estandarización de la técnica de Western blot para el diagnóstico específico de la enfermedad de Chagas utilizando antígenos de excreción-secreción de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Rev Perú Med Exp Salud Publica. 31(4): 644-51.
- Faucher J, Baltz T, Petry KG. (1995). Detection of an "epimastigote-like" intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 81(5): 441-3.
- Ferrer E, Lares M, Viettri M, Medina M. (2013). Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 31(5): 277-82.
- Ferrer E. (2015). Técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Saber. 27(3): 359-71.
- Flores M. (2005). Estudio Socio-Epidemiológico de la enfermedad de Chagas en los Caseríos El Pueblito y Las Minas del Central Tacarigua Municipio Carlos Arvelo, Estado Carabobo (trabajo de ascenso). Valencia: Universidad de Carabobo.
- Frevert U, Schenkman S, Nussenzweig V. (1992). Stage-specific expression and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun. 60(6): 2349-60.

- Gigante G, González G, Linares E. (2009). Estudio de la Epimastigogénesis, Metaciclogénesis y Amastigogénesis del clon Dm28c de *Trypanosoma cruzi* en medio ML15-HA (tesis de grado de la Escuela de Bioanálisis). Valencia: Universidad de Carabobo.
- Goitia-Aular M, Boiso JF. (1982). Cultivo del *Trypanosoma cruzi* (cepa Elpidio Padrón) en un medio semidefinido. Efecto de algunas variaciones en la composición y condiciones del mismo. Acta Cient Venez. 33(6): 488-96.
- Goldenberg S, Avila AR. (2011). Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation. Adv Parasitol. 75: 285-305.
- Graterol D, Arteaga R, Castillo A, Díaz G, Mundaray O, Pineda W, Navarro MC, Domínguez MI, De Lima AR, Contreras VT. (2013a). Cambios morfológicos, proteicos, glicoproteicos y antigénicos de *Trypanosoma cruzi* cultivado en medio axénico con tensiones de oxígeno diferentes. Salus. 17(Supl): 4-11.
- Graterol D, Arteaga R, Pineda W, Navarro MC, Domínguez MI, De Lima AR, Contreras VT. (2014). *Trypanosoma cruzi:* Estudios morfológicos y moleculares de epimastigotas derivados de amastigotas primarios. LXIV Convención anual de AsoVAC, 19 al 21 de Noviembre de 2014. Caracas, Venezuela.
- Graterol D, Domínguez MI, De Lima AR, Arteaga R, Pineda W, Navarro MC, Contreras VT. (2011). *Trypanosoma cruzi:* concentración de suero fetal bovino, tamaño del inóculo y edad de los amastigotas son factores involucrados en la transformación amastigota-epimastigota. LXI Convención anual de AsoVAC, 13 al 18 de Noviembre 2011. Maracay, Venezuela.
- Graterol D, Ramírez D, Ramos A, Arteaga RY, Mundaray O, Pineda W, Navarro MC, Domínguez MI, De Lima AR, Contreras VT. (2013b). Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* Dm28c en medio ML15-HA: Análisis proteico, glicoproteico y antigénico. Salus. 17(Supl): 12-8.
- Guzmán-Marín E, Zavala-Castro J, Acosta-Viana K, Rosado-Barrera M. (1999). Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Rev Biomed. 10(3): 177-84.
- Harth G, Haidaris CG, So M. (1989). Purification and characterization of stagespecific glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 33(2): 143-50.

- Harth G, Mills AA, Souto-Padrón T, de Souza W. (1992). *Trypanosoma cruzi* glycoprotein 72: immunological analysis and cellular localization. Mol Cell Biochem. 109(1): 25-36.
- Herbert B. (1999). Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis. 20(4-5): 660-3.
- Hombach A, Ommen G, MacDonald A, Clos J. (2014). A small heat shock protein is essential for thermotolerance and intracellular survival of *Leishmania donovani*. J Cell Sci. 127(21): 4762-73.
- Hubsch RM, Chiechie N, Comach G, Rangel R, Gusmao RD. (1988). El ensayo inmunoenzimático en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. I. Estudio comparativo de dos preparaciones antigénicas de *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 83(3): 277-85.
- Israelski DM, Sadler R, Araujo FG. (1988). Antibody response and antigen recognition in human infection with *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg. 39(5): 445-55.
- Kessler RL, Contreras VT, Pinto N, Guarneri AA, Villamizar LH, Camacho G, Batista M, Thomaz V, Krieger MA, Probst CM. (2017). Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. Mol Microbiol. 104(5): 712-36.
- Kirchhoff LV, Hieny S, Shiver GM, Snary D, Sher A. (1984). Cryptic epitope explains the failure of a monoclonal antibody to bind to certain isolates of *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. 133(5): 2731-5.
- Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. (1996). Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. J Clin Microbiol. 34(5): 1171-5.
- Kloetzel J, Camargo ME, Giovannini VL. (1975). Antigenic differences among epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J Protozool. 22(2): 259-61.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227(5259): 680-5.
- Lebendiker M. (2002). Protein Precipitation Protocols. In The Protein Purification Facility. Disponible en:

http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/ProteinPrecipitation.html

- Low HP, Tarleton RL. (1997). Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein and its identification as a member of the *Trypanosoma cruzi* sialidase superfamily. Mol Biochem Parasitol. 88(1-2): 137-49.
- Manso Alves MJ, Kawahara R, Viner R, Colli W, Mattos EC, Thaysen-Andersen M, Larsen MR, Palmisano G. (2017). Comprehensive glycoprofiling of the epimastigote and trypomastigote stages of *Trypanosoma cruzi*. J Proteomics. 151: 182-92.
- Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. (2007). Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. PLoS Negl Trop Dis. 1(2): e114.
- Matsumoto TK, Hoshino-Shimizu S, Nakamura PM, Andrade HF, Umezawa ES. (1993). High resolution of *Trypanosoma cruzi* amastigote antigen in serodiagnosis of different clinical forms of Chagas' disease. J Clin Microbiol. 31(6): 1486-92.
- Mendes RP, Hoshino-Shimizu S, Moura da Silva AM, Mota I, Heredia RA, Luquetti AO, Leser PG. (1997). Serological diagnosis of Chagas' disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. J Clin Microbiol. 35(7): 1829-34.
- Ministerio de Salud de la Nación. (2012). Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Disponible en: <u>http://www.fac.org.ar/neuquen/cientifica/Guias\_chagas\_2012.pdf</u>
- Ministerio del Poder Popular para la Salud. (2014). Guía para el diagnóstico, atención y manejo clínico de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. Disponible en: <u>http://svmi.web.ve/wh/documentos/Guia\_Chagas\_2015.pdf</u>
- Moller HJ, Poulsen JH. (2002). Staining of glycoproteins/proteoglycans in SDS-Gels. In: The Protein Protocols Handbook. Totowa, NJ: JM Walker. 2<sup>da</sup> Ed.
- Moncayo A, Ortiz Yanine MI. (2006). An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). Ann Trop Med Parasitol. 100(8): 663-77.
- Mordini OD. (2010). Clasificación Enfermedad de Chagas. Consenso Internacional Buenos Aires 2010. Disponible en: <u>http://www.fac.org.ar/1/revista/11v40n3/consenso/chagas/mordini.php</u>

- Moriana S, Ortiz G, Fanjul G. (2016). Rompiendo el silencio. Una oportunidad para los pacientes de Chagas. Coalición Global de la Enfermedad de Chagas. Disponible en: <u>http://www.coalicionchagas.org/documents/5415804/5524305/Informe+Rompi</u> endo+el+silencio/03be7d65-ff10-4b8d-bd1d-efc3f7673b44
- Nakazawa M, Rosa DS, Pereira VR, Moura MO, Furtado VC, Souza WV, Barros MN, Abath FG, Gomes YM. (2001). Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potencially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. Clin Diagn Lab Immunol. 8(5): 1024-7.
- Navarro MC, De Lima AR, Askue J, Contreras VT. (2003). Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 98(1): 83-91.
- Navarro MC, Graterol D, Arteaga R, De Lima AR, Domínguez MI, Pineda W, Contreras VT. (2010). Isoformas de la proteína Hsp90 de *Trypanosoma cruzi* asociadas a la amastigogénesis *in vitro*. LX Convención anual de AsoVAC, 14 al 19 de Noviembre 2010. Ciudad Bolívar, Venezuela.
- Neira I, Silva FA, Cortez M, Yoshida N. (2003). Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. Infect Immun. 71(1): 557-61.
- O'Daly JA, Carrasco H, Fernandez V, Rodríguez MB. (1994). Comparison of chagasic and non-chagasic myocardiopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Acta Trop. 56(4): 265-87.
- Organización Mundial de la Salud. (1991). Control de la enfermedad de Chagas. Comité de Expertos. Serie de Informes Técnicos No. 811 Ginebra 1-95.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Centro de prensa. Nota descriptiva N°340; Disponible en: <u>http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/</u>
- Otani MM, Vinelli E, Kirchhoff LV, del Pozo A, Sands A, Vercauteren G, Sabino EC. (2009). WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. Transfusion. 49(6): 1076-82.
- Otero S, Sulleiro E, Molina I, Espiau M, Suy A, Martín-Nalda A, Figueras C. (2012). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in non-endemic areas:

evaluation of a screening program in a tertiary care hospital in Barcelona, Spain. Am J Trop Med Hyg. 87(5): 832-6.

- Pan AA, McMahon-Pratt D. (1989). Amastigote and epimastigote stage-specific components of *Trypanosoma cruzi* characterized by using monoclonal antibodies. Purification and molecular characterization of an 83-kilodalton amastigote protein. J Immunol. 143(3): 1001-8.
- Pan SC. (1971). Cultivation and morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* in improved liquid media. J Protozool. 18(4): 556-60.
- Pan SC. (1978). *Trypanosoma cruzi*: intracellular stages grown in a cell-free medium at 37°C. Exp Parasitol. 45(2): 215-24.
- Piras MM, Piras R, Henríquez D, Negri S. (1982). Changes in morphology and infectivity of cell culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* fibroblast. Mol Biochem Parasitol. 6(2): 67-81.
- Primavera KS, Umezawa ES, Peres BA, Camargo ME, Hoshino-Shimizu S. (1990). Chagas' disease: IgA, IgM and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote, tripomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 32(3): 172-80.
- Ramirez MI, Ruiz R de C, Araya JE, Da Silveira JF, Yoshida N. (1993). Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasión. Infect Immun. 61(9): 3636-41.
- Rangel-Aldao R, Comach G, Allende O, Cayama E, Delgado V, Piras R, Piras M, Henriquez D, Negri S. (1986). *Trypanosoma cruzi*: polypeptide markers of epimastigotes and trypomastigotes. Mol Biochem Parasitol. 20(1): 25-32.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. (2010). Chagas disease. Lancet. 375(9723): 1388-402.
- Reiche EM, Cavazzana M, Okamura H, Tagata EC, Jankevicius SI, Jankevicius JV. (1998). Evaluation of the western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg. 59(5): 750-6.
- Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, Gállego M, Tebar S, Portús M. (2012). Identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. Am J Trop Med Hyg. 86(3): 412-6.

- Rondinelli E. (1994). Conservation of heat-shock proteins in *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Today. 10(5): 172-6.
- Saldaña A, Sousa OE. (1996). *Trypanosoma rangeli*: epimastigote inmunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. J Parasitol. 82(2): 363-6.
- Sánchez B, Monteón V, Reyes PA, Espinoza B. (2001). Standardization of microenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. Arch Med Res. 32(5): 382-8.
- Santiago N, Hillyer GV. (1986). Isolation of potential serodiagnostic *Fasciola hepatica* antigens by electroelution from polyacrylamide gels. Am J Trop Med Hyg. 35(6): 1210-7.
- Schenkman S, Kurosaki T, Ravetch JV, Nussenzweig V. (1992). Evidence for the participation of the Ssp-3 antigen in the invasion of nonphagocytic mammalian cells by *Trypanosoma cruzi*. J Exp Med. 175(6): 1635-41.
- Schuster FL, Sullivan JJ. (2002). Cultivation of clinically significant hemoflagellates. Clin Microbiol Rev. 15(3): 374-89.
- Sher A, Snary D. (1982). Specific inhibition on the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* by a monoclonal antibody. Nature. 300(5893): 639-40.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. (2012). Oral transmission of Chagas disease. Clin Infect Dis. 54(6): 845-52.
- Silveira-Lacerda EP, Silva AG, Junior SF, Souza MA, Kesper N, Botelho-Filho A, Umezawa ES. (2004). Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. Vox Sang. 87(3): 204-7.
- Sosa-Estani S, Segura EL. (2015). Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem-a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 110(3): 289-98.
- Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, De Souza W. (2012). Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis. 6(8): e1749.
- Teixeira MM, Yoshida N. (1986). Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. Mol Biochem Parasitol. 18(3): 271-82.

- Teixeira SM, Russell DG, Kirchhoff LV, Donelson JE. (1994). A differentially expressed gene family encoding "amastin", a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. J Biol Chem. 269(32): 20509-16.
- Tonelli RR, Silber AM, Almeida de Faria M, Hirata IY, Colli W, Alves MJ. (2004). L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Cell Microbiol. 6(8): 733-41.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 76(9): 4350-4.
- Traviezo LE, Bonfante-Garrido R. (2004). Estudio seroepidemiológico de la enfermedad de Chagas en la localidad de Caballito, Municipio Simón Planas, Estado Lara. Venezuela. Parasitol Latinoam. 59(1-2): 46-50.
- Tyler KM, Engman DM. (2000). Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. Cell Motil Cytoskeleton. 46(4): 269-78.
- Tyler KM, Engman DM. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol. 31(5-6): 472-81.
- Umezawa ES, Souza AI, Pinedo-Cancino V, Marcondes M, Marcili A, Camargo LM, Camacho AA, Stolf AM, Teixeira MM. (2009). TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. Acta Trop. 111(1): 15-20.
- Urményi TP, Silva R, Rondinelli E. (2014). The heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. Subcell Biochem. 74: 119-35.
- Villalta F, Kierszenbaum F. (1982). Growth of isolated amastigotes of *Trypanosoma cruzi* in cell-free medium. J Protozool. 29(4): 570-6.
- Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, Brenière SF. (1994). High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. FEMS Microbiol Lett. 124(3): 419-23.
- Zaidenberg A, Tournier H, Schinella G, Buschiazzo H. (1995). *Trypanosoma cruzi:* Influencia del plasma humano en la morfogénesis de tripomastigotes sanguíneos en un medio de cultivo acelular. Rev Latinoam Microbiol. 37(1): 71-7.

- Zaidenberg A, Tournier HA, Schinella GR, Buschiazzo HO. (2000). *Trypanosoma cruzi:* Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. Rev Latinoam Microbiol. 42(1): 21-6.
- Zeledon R, Rabinovich JE. (1981). Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. Annu Rev Entomol. 26(1): 101-33.