



14
29
3173
3174

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"



DIFERENCIACIÓN ANTIGENICA, PROTEICA Y GENOMICA DE 12
CEPAS DE T.cruzi

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
GUILLERMINA CAMPOS VALDÉZ

México, D.F

Junio de 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



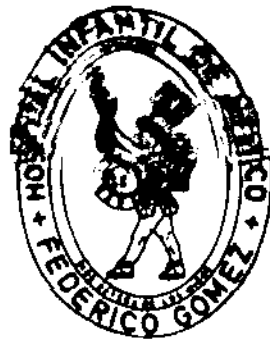
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Parasitología del Hospital
Infantil de México "Federico Gómez"**



**La dirección estuvo a cargo de
Dra. Enequina Jiménez Cardoso, Jefe del Laboratorio de Investigación en Parasitología del
Hospital Infantil de México "Federico Gómez", y el
Asesor interno Q.F.B. Martha Sánchez Rodríguez, Jefe del Laboratorio de Análisis Clínicos
de la FES-Zaragoza**

J U R A D O

PRESIDENTE	DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA
VOCAL	DRA. ENEDINA JIMÉNEZ CARDOSO
SECRETARIO	Q.F.B. MARTHA A SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
1er. SUPLENTE	Q.F.P. JOEL SAUCEDO CONSTANTINO
2do SUPLENTE	Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZALEZ MELENDEZ

DEDICATORIAS

A Dios:

Por permitirme concluir un ciclo más de mi vida

A mis padres:

Por todo el amor y confianza que me han dado, logrando de mí una buena profesionalista y a quienes espero nunca defraudar.

A mis hermanos:

Por el apoyo brindado durante todo el tiempo

A mi abuelita:

Por toda la ternura que me brinda

A mis hijos Ivan y Esteban.

Dedico con mucho cariño y ternura por ser los motivos de mi vida

A ti GR:

Por que significas todo.

A la Dra. Enedina:

Por infundirme confianza y seguridad.

A la Q.F.B. Martha Sánchez:

Por su apoyo incondicional.

A mis maestros:

Por sus conocimientos

A mis amigos:

Elenita, Alberto, Luz, Laura, Lulú, Cony, la señora Gloria, el LAE Dario Vazquez por su apoyo.

A todo el personal del Laboratorio de Investigación en Parasitología

CONTENIDO

	PAG
RESUMEN	1
I. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA	3
1.1 Biología de <i>T.cruzi</i>	5
1.1.1 Posición taxonómica	5
1.1.2 Morfología	6
1.1.3 Ciclo de vida	9
1.2 Mecanismos de Transmisión	11
1.3 Vectores	11
1.3.1 Reservorios	12
1.4 Patología de la enfermedad	12
1.5 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas	14
1.5.1 Métodos parasitológicos directos	14
1.5.2 Métodos parasitológicos indirectos	15
1.5.3 Métodos serológicos	16
1.5.4 Diagnóstico de la fase aguda	17
1.5.5 Diagnóstico de la fase crónica	17
1.6 Heterogeneidad de <i>T.cruzi</i>	18
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20

5.4.11	Inmunotransferencia	28
5.4.12	Tinción con Nitrato de Plata	29
5.4.13	Extracción de DNA de <i>T. cruzi</i>	30
5.4.14	Purificación del DNA	30
5.4.15	Amplificación	31
5.4.16	Digestión del DNA con endonucleasas de restricción	32
5.4.17	Electroforesis sobre gel de agarosa	32
5.4.18	Análisis estadístico	32
5.4.19	Diagrama de Flujo	32
VI	RESULTADOS	33
6.1	Figuras	37
VII	DISCUSIÓN	40
VIII	CONCLUSIONES	43
IX	BIBLIOGRAFÍA	44
APÉNDICE I	Medio de Cultivo LIT	53
APÉNDICE II	Protocolo de Electroforesis	54
APÉNDICE III	Protocolo de Inmunotransferencia	56
APÉNDICE IV	Preparación de Soluciones	57

RESUMEN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una enfermedad compleja, de difícil diagnóstico y alta prevalencia en América Latina. Su agente causal es un parásito protozooario hemoflagelado llamado *Trypanosoma cruzi*. Se han estudiado diferentes cepas de *T. cruzi*, mostrando gran heterogeneidad entre sí, debido a las diferencias en sus propiedades biológicas: infectividad, patogenicidad, tropismo celular, patrones isoenzimáticos, contenido de DNA total y digestión del DNA del cinetoplasto por medio de enzimas de restricción. Esta heterogeneidad causa en los individuos infectados una amplia gama de signos y síntomas, ocasionando que la enfermedad sea más compleja y el diagnóstico laborioso y complicado. El objetivo del presente trabajo fue implementar las condiciones metodológicas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para usarla como herramienta en el estudio y caracterización de 12 aislados de *T. cruzi*, así como en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

En la metodología se partió del uso de 12 fuentes de aislamiento, de las cuales se obtuvieron antígenos totales y se extrajo el DNA total de los Trypanosomas. El ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la Inmunotransferencia se usaron para el análisis de sueros de ratones Balb/c infectados con los antígenos totales de los aislados de *T. cruzi*. La PCR se utilizó para amplificar el DNA purificado, y digerir la amplificación obtenida. En los resultados, se encontró la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* y de antígenos reconocidos por los diferentes isótipos de los anticuerpos producidos. Se formaron tres grupos en base al número de proteínas presentes. El grupo I: Progreso, BP8, Cid, los Tuxtla, Cocula y Zachila presentan dos proteínas una de 116 y otra de 45 KDa. El Grupo II: Amarillo, Petaquillas, Ninoa, Fidelfa y Miguz reconocieron una proteína de 45 KDa y finalmente el grupo III: Agripina solo presentó una proteína de 66 KDa. Además se logró amplificar una banda de 320 pb de el DNA purificado de los aislados de

1. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA

La enfermedad de Chagas o Trypanosomiasis Americana, es una enfermedad que resulta de la infección con el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1909 por el Dr. Carlos Chagas en su país natal, Brasil; es limitada al Continente Americano, particularmente a los países de América Latina tropical y subtropical.¹ La Tripanosomiasis Americana es transmitida principalmente por un insecto triatómimo perteneciente a la familia Reduviidae,² a través de las materias fecales. Se han reportado otros mecanismos de transmisión: transfusión sanguínea, trasplante de órganos, transmisión congénita, accidentes en el laboratorio, a través de la leche materna, entre otros.^{3,4}

La enfermedad de Chagas constituye una amenaza permanente para casi la cuarta parte de la población de América Latina.⁵ En México, la tripanosomiasis americana, se conoce desde 1940,⁶ pero solo en los últimos años, ha crecido el interés en el estudio de la enfermedad.⁷ Por mucho tiempo se ha especulado sobre la importancia de la misma en nuestro país. Aún existe toda una gama de suposiciones al respecto, desde las que la consideran un padecimiento exótico y le niegan cualquier importancia, hasta las que la asumen como un importante problema de salud pública.⁸ La enfermedad de Chagas, se distribuye en focos dispersos en todas las entidades federativas del país,⁹ la gran mayoría de los casos ocurridos, se han localizado en regiones de la vertiente del océano pacífico desde el estado de Sonora hasta Chiapas. Los estados de la República Mexicana en los que se han encontrado más casos humanos de la enfermedad de Chagas diagnosticados serológicamente son los de Chiapas, Yucatán, Zacatecas, Jalisco, Guerrero, Oaxaca y Morelos, lo que señala transmisión muy activa de la tripanosomiasis en dichas regiones.¹⁰

T. cruzi. Aunque, no se observaron diferencias significativas en la digestión con EcoR1.

Este trabajo, proporciona datos que apoyan la heterogeneidad entre aislados mexicanos de *T. cruzi*, lo cual influyo directamente en los resultados. Se exhibe heterogeneidad proteica y antigénica, sugiriendo la existencia de diferencias en el genoma de *T. cruzi*, solo que se requiere el uso de otras enzimas. Además, los resultados obtenidos en este trabajo permitieron el establecimiento de la técnica de PCR para la amplificación del DNA de *T. cruzi* como una alternativa en las pruebas diagnósticas.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La realización del diagnóstico de la enfermedad de Chagas en nuestro país, aún sigue siendo un reto, las principales razones son las características de la población afectada, que solo a últimas fechas tiene acceso a servicios de salud, el desconocimiento de la historia natural de la enfermedad y, finalmente, el pobre uso de los métodos paraclínicos indispensables para el diagnóstico parasitológico y/o serológicos necesarios para corroborar la impresión clínica. Estos métodos paraclínicos no son accesibles para muchos médicos en áreas rurales.

Hasta entonces, las técnicas de diagnóstico serológico disponibles en nuestro país presentan problemas variados, que van desde la sensibilidad, la especificidad hasta el costo y tiempo en el que se llevan a cabo, además de que algunas tienen la gran desventaja de presentar reacciones cruzadas con otros parásitos. Considerando estos antecedentes, es necesario desarrollar más el área de diagnóstico, estandarizando nuevas metodologías que eviten todas estas dificultades.

Dentro del desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico se ha logrado establecer un método, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite diagnosticar la enfermedad de Chagas en fase crónica. Por lo que, al implementar las condiciones metodológicas, que hagan de la técnica de PC una prueba rápida, sensible y barata, se podrá usar en el diagnóstico de la enfermedad, tanto en la etapa aguda como en la crónica.

Con este trabajo se pretende implementar las condiciones metodológicas que nos permitan desarrollar una técnica de PCR más rápida y sensible para usarla en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en sus dos etapas. Además de ser usada como herramienta en el estudio de aislados de *T.cruzi* para su caracterización.

Según Gutteridge y Rogerson *T.cruzi* se adapta a los cambios de medio ambiente, a que está expuesto en su ciclo de vida, debido a que tiene disponible todo el tiempo la maquinaria metabólica que requiere para cada caso, ya que no existen diferencias cualitativas en las enzimas metabólicas de los tres principales estadios del parásito. Aunque no se han encontrado enzimas estadio-específicas, algunos perfiles isoenzimáticos si son específicos de un estadio del ciclo de vida de *T.cruzi*.⁶⁵

Los estudios isoenzimáticos de varios aislados de *T.cruzi* en Brasil, identificaron por primera vez dos grupos diferentes, provenientes de distintos ciclos de transmisión, uno de un ciclo silvestre (Z1) y otro de un ciclo doméstico (Z2). Un tercer grupo fue identificado en Brasil, denominado zimodemo 3 (Z3) aislado en ciclos silvestres y domésticos. No se ha visto una clara relación de la patología de la enfermedad con el zimodemo del parásito, y una de las causas es que se pueden encontrar en el mismo paciente mezclas de zimodemas.⁶⁶

1.6 Heterogeneidad de *T.cruzi*

Se han reportado diferencias geográficas en los aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas, tanto en prevalencia como severidad de la enfermedad, los mega síndromes que se observan en la fase crónica parecen estar confinados a ciertas áreas geográficas.⁵⁹ Lo anterior se ha atribuido a diferencias genéticas de susceptibilidad en los humanos, pero estudios en el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) y tipificación isoenzimática de pacientes chagásicos en Brasil no muestran ninguna relación del genotipo con los aspectos clínicos de la enfermedad.⁶⁰ Por otra parte se ha propuesto que la heterogeneidad genética en *T.cruzi* puede ser uno de los factores que provoquen las diferencias observadas en la enfermedad.⁶¹ Dicha heterogeneidad se ha reportado en diferentes características del parásito como crecimiento in vitro, contenido de DNA total, antigenicidad, infectividad a células in vitro, en la especificidad de anticuerpos monoclonales, comportamiento en ratones, patrones en la digestión del DNA del cinetoplasto por endonucleasas y en la distribución de neuraminidasa en cepas con tropismo al músculo esquelético. También se ha demostrado heterogeneidad en aislados mexicanos de *T.cruzi* en estudios con fragmentos de restricción en genes de RNA ribosomal y en patrones de digestión de DNA con endonucleasas, pudiéndose agrupar a las cepas con respecto a su origen geográfico.⁶² Sin embargo, algunos trabajos han reportado homogeneidad entre los aislados mexicanos de acuerdo a sus patrones isoenzimáticos.⁶³

Las enzimas son producto de genes, por lo tanto se puede considerar que diferencias en la expresión de una determinada enzima entre dos organismos revela diferencias genéticas entre éstos. Por otro lado el valor de las enzimas como marcadores genéticos depende de su grado de estabilidad.⁶⁴

una sensibilidad y especificidad superior al 95%,⁵⁰ Western blot que permite el reconocimiento de antígenos⁵¹ y PCR.⁵² Estudios previos han demostrado que la ELISA es una prueba apropiada para el trabajo de campo, ya que es una técnica fácil de montar y su estandarización puede mostrar alta sensibilidad y especificidad.⁵³ Por su parte el Western blot, permite identificar proteínas antigénicas reconocidas por los pacientes, las que pueden ser purificadas y hacer 100% específico el diagnóstico evitando falsos positivos por reacciones cruzadas.⁵⁴

1.5.4 Diagnóstico de la fase aguda

El diagnóstico de una infección reciente con *T.cruzi* puede hacerse mediante una microscopía directa, con o sin la ayuda de métodos indirectos tales como el xenodiagnóstico, el cultivo sanguíneo o la inoculación de animales susceptibles.⁵⁵ En zonas endémicas, donde ocurre la mayoría de los casos de infección reciente, no es común el uso de métodos indirectos debido a que no se cuenta con insectos reproducidos en laboratorios.⁵⁶ El frotis sanguíneo grueso, el examen de sangre fresca y el método de Strout o el capilar son las técnicas usadas con mayor frecuencia en la práctica. Como alternativa puede emplearse la serología siempre que sea posible disponer periódicamente de muestras de suero del paciente. Cuando los síntomas no son los característicos de una infección reciente, el examen parasitológico es negativo y la prueba serológica positiva es difícil afirmar que la infección es reciente.⁵⁷

1.5.5 Diagnóstico de la fase crónica

Durante las infecciones crónicas, los métodos parasitológicos directos generalmente producen resultados negativos y aún el xenodiagnóstico es solamente positivo en el 50% de los casos y tiene que repetirse varias veces antes de obtener un resultado positivo. Por otra parte cualquiera de las pruebas serológicas antes mencionadas dan resultados positivos.⁵⁸

y 60 días después de la succión de sangre, se examinan sus heces e intestino bajo el microscopio para detectar tripomastigotes o epimastigotes de *T. cruzi*. Una fuente de error en el xenodiagnóstico es la presencia de *T. rangeli*, que se encuentra en seres humanos pero no es patógeno.⁴² Por otra parte existe también la posibilidad de utilizar el cultivo sanguíneo para la amplificación de parásitos en el diagnóstico de la enfermedad en las zonas endémicas, en las cuales no se cuenta con colonias de vectores criados en el laboratorio para poder efectuar el xenodiagnóstico. Se emplean medios líquidos, tales como LIT (Liver Infusion Tryptosa),⁴³ o BHI (Brean Heart Infusión), y la eficiencia del método puede aumentarse mediante la centrifugación diferencial de la sangre antes de inocuar el medio. También para evaluar la curación después del tratamiento se utilizan repetidos cultivos sanguíneos, junto con métodos serológicos.⁴⁴ Cada método cuenta con un porcentaje de sensibilidad en las diferentes fases de la enfermedad, dando como resultado la presencia de errores en los resultados, ya que la fase aguda ofrece una mayor posibilidad de encontrar parásitos en circulación, en contraste con la fase crónica en donde el parásito ha invadido tejido y no es tan constante su presencia en el torrente circulatorio.⁴⁰

1.5.3 Métodos serológicos

Los ensayos serológicos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, son eficaces para detectar anticuerpos contra el parásito, más no para detectar la presencia del parásito. Estos ensayos han mostrado alta sensibilidad pero carecen de especificidad del 100% debido a la presencia de reacciones cruzadas contra antígenos de otros parásitos tales como *Leishmania sp* y *T. Rangeli*.⁴⁵ Diferentes técnicas se han venido utilizando, entre las más utilizadas se encuentran: la prueba de fijación de complemento de Machado y Guerrero, la aglutinación directa, aglutinación en látex, inmunofluorescencia,⁴⁶ hemaglutinación indirecta cuya sensibilidad es menor al 70% y cuya especificidad es aproximadamente de 95%,⁴⁷ DIG-ELISA,⁴⁸ DOT-ELISA,⁴⁹ ELISA que presenta

1.5 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

1.5.1 Métodos parasitológicos directo

Por lo general, la observación directa del parásito se efectúa en la sangre. Las técnicas más comúnmente usadas son el frotis sanguíneo grueso, o el examen de sangre fresca colocada entre un portaobjetos y un cubreobjetos. En tanto que el examen de preparaciones coloreadas permite la caracterización morfológica del parásito, las preparaciones con sangre fresca permiten detectar más fácilmente a los parásitos debido a su movilidad.³⁷ Por otra parte los métodos de concentración de parásitos aumentan la probabilidad de detectar la parasitemia uno de estos métodos es el de Strout que consiste en dejar que la sangre se coagule, centrifugar el suero a baja velocidad para eliminar los glóbulos rojos restantes y finalmente centrifugar a una mayor velocidad para concentrar los parásitos en el sedimento.³⁸ Una manera eficiente de modificar este método es recolectar sangre en un tubo capilar con heparina, centrifugar el tubo y examinar bajo el microscopio la interface entre los glóbulos rojos y la capa amarillenta de leucocitos. También puede cortarse el tubo capilar a un nivel entre los glóbulos rojos y la capa amarillenta para después examinar una gota bajo el microscopio.³⁹

1.5.2 Métodos parasitológicos indirectos

El Xenodiagnóstico representa el método parasitológico más sensible y específico para la detección de *T.cruzi* en sangre de individuos infectados. Su sensibilidad va desde el 100% en individuos que se encuentran en la fase aguda de la enfermedad y del 25 al 50% en individuos chagásicos crónicos.⁴⁰ Entre el 17 y el 70% de los individuos seropositivos pueden resultar positivos por este método.⁴¹ Para el xenodiagnóstico es necesario contar con triatomíneos libres de infección criados en el laboratorio. La técnica consiste en emplear 40 ninfas, distribuidas 10 por cada prueba, y permitir que se alimenten con la sangre del paciente. A los 30



Durante esta fase no hay manifestaciones clínicas o de alteraciones electrocardiográficas y radiológicas habiendo una disminución casi total en la sintomatología. Su patología no es particularmente remarcable y no muestra evidencias de daño en el funcionamiento de órganos. La fase permanece latente durante años, reportándose que en áreas endémicas ésta se manifiesta durante las tres primeras décadas de vida.³²

Fase crónica

Es la forma más evidente de la enfermedad de Chagas, no solo por incapacitar a las personas infectadas en la edad más productiva de su vida, sino porque con frecuencia los lleva a la muerte. Esta fase de la enfermedad se presenta solo en un 10 al 30% de individuos infectados, siendo los megasíndromes y la cardiopatía chagásica la forma más común e importante, aunque puede haber manifestaciones menos comunes como encefalitis, exocrinopatías y endocrinopatías. En los órganos afectados hay disfunción del tejido debido a una hipertrofia de las capas musculares así como también fibrosis que trae como consecuencia un engrosamiento de la pared de los órganos.³³ Sus manifestaciones pueden aparecer 10 o 30 años después de la fase aguda, avanzando progresivamente hasta lograr la total destrucción del tejido, provocado por sustancias citotóxicas liberadas por el parásito.³⁴

En varias áreas endémicas de América Latina se observa con más frecuencia la forma digestiva de la infección chagásica consistente en visceromegalias, especialmente en megacolon y megaesófago.³⁵ En México se han descrito algunos casos de estos megasíndromes, en los estados de Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Jalisco y Tabasco, la cardiopatía chagásica crónica es la más frecuente.³⁶



Fase aguda.

Esta fase tiene una duración de 4-5 semanas post-infección. Es muy frecuente en niños menores de 5 años y con menor incidencia después de los 15 años,²⁹ pero también puede presentarse a cualquier edad. La enfermedad se manifiesta por una reacción febril de moderada severidad que raramente excede de los 40°C, con carácter de intermitente o continúa.

Hay dolor muscular, sudor, hepatoesplenomegalia moderada, irritabilidad extensa, linfadenopatía, anorexia y algunas veces vómito y diarrea. Puede haber manifestaciones de miocarditis con dilatación cardíaca y cambios electrocardiográficos, hipotensión y taquicardia; la agresión al sistema nervioso central puede manifestarse por una encefalomielitis o meningoencefalitis de consecuencias letales en un 8% de los casos y que afecta principalmente a niños.³⁰ Las lesiones en la fase aguda de la enfermedad son de tipo inflamatorio, caracterizadas por una ruptura de células y la aparición de tripomastigotes en la sangre en donde antígenos y sustancias tóxicas son liberadas, aunque el parásito puede encontrarse en cualquier parte del organismo tiene predilección por células del sistema retículo endotelial, músculo esquelético o cardíaco y por el sistema nervioso central aunque la infección en células del músculo liso en esófago y colón son también frecuentes en algunos casos, en éstos sitios los infiltrados celulares están compuestos por neutrófilos polimorfonucleares, monocitos y linfocitos.³¹

Fase indeterminada o de latencia

Caracterizada por una serología positiva y/o un xenodiagnóstico positivo. Los parásitos continúan una lenta multiplicación intracelular dentro de los órganos y tejidos del hospedero.

1.3.1 Reservorios

Otro aspecto importante en el estudio de la enfermedad de Chagas, es el que concierne a los reservorios, un tema poco estudiado y por lo tanto un área con poca información de lo que ocurre en el país. En México se han reportado como reservorios del parásito a: *Didelphis marsupialis* (tlacuache), *Dasyus novemcinctus* (armadillo), *Cannis familiaris* (perro) y *Mus musculus* (ratón). Finalmente en 1993, un estudio realizado en el estado de Morelos, reporta la presencia de reservorios peridomésticos de *T.cruzi* como importantes en la infección para esa zona del país, señalando a *Suis domesticus* (cerdo) como un reservorio infectado naturalmente.²⁶

1.4. Patología de la enfermedad

Se conocen de tres a cuatro fases en el desarrollo de la infección.²⁷

Periodo de incubación.

Tiene una duración de 7 a 10 días, comenzando poco después de la penetración al tejido conectivo del hospedero, provocando una reacción inflamatoria local conocida como signo de Romaña si la vía de entrada fue a través de la mucosa palpebral, teniendo como consecuencia un edema indoloro en los párpados, conjuntivitis y adenopatía regional; o bien chagomas de inoculación si la vía de entrada fue en cualquier otro lugar del cuerpo; en algunos casos pueden presentarse edemas generalizados. Durante este periodo preliminar de incubación los amastigotes proliferan dentro de las células del tejido infectado para desarrollarse en tripomastigotes. Al romper la célula los tripomastigotes se liberan hacia el torrente sanguíneo para infectar de nuevo a otras células propagándose la infección.²⁸

1.2. Mecanismos de Transmisión

La transmisión de esta enfermedad se da habitualmente a través de triatóminos vectores y por contaminación de la piel y mucosas con las deyecciones del insecto como ya se menciona en el ciclo biológico; también se transmite por transfusión sanguínea proveniente de individuos infectados con *T.cruzi*, este mecanismo es el responsable de alrededor del 20% de los casos de tripanosomiasis americana, siendo la segunda causa de infección en el hombre.²² Otros mecanismos de transmisión menos comunes lo constituyen la vía transplacentaria (de madres chagásicas embarazadas hacia sus bebés, con un riesgo de infección de 0.5 al 6% para los hijos),²³ el trasplante de órganos, la ingesta de leche materna, accidentes de laboratorio, el uso de animales de laboratorio, el desollamiento de animales y la ingestión de carne parasitada semicruda o de bebidas contaminadas con materia fecal de triatóminos.²⁴

1.3. Vectores

Existen varias especies de reduvidos transmisores importantes de *T.cruzi*. En la República Mexicana se distribuyen un mínimo de 25 especies del género *Triatoma*, una del género *Rhodnius*, una del género *Dipetalogaster*, dos del género *Paratriatoma*, una del género *Panstrongylus*, dos del género *Belminus* y dos del género *Eratyrus*. En total, 34 especies de triatóminos pertenecientes a siete géneros distribuidas en todos los estados, en su mayor parte ubicados en la vertiente del Pacífico, lo que hace suponer que la zona probablemente endémica abarque cerca de las dos terceras partes del territorio nacional; sin embargo es probable que el número sea mucho mayor y la distribución más amplia, pero el atraso mexicano en el estudio de la tripanosomiasis americana ha impedido su conocimiento. Por su mayor distribución geográfica y domesticidad, las especies mexicanas de mayor importancia son: *R. prolixus*, *T. barbieri*, *T. dimidiata*, *T. phyllosoma*, *T. longipennis* y *T. picturata*.²⁵

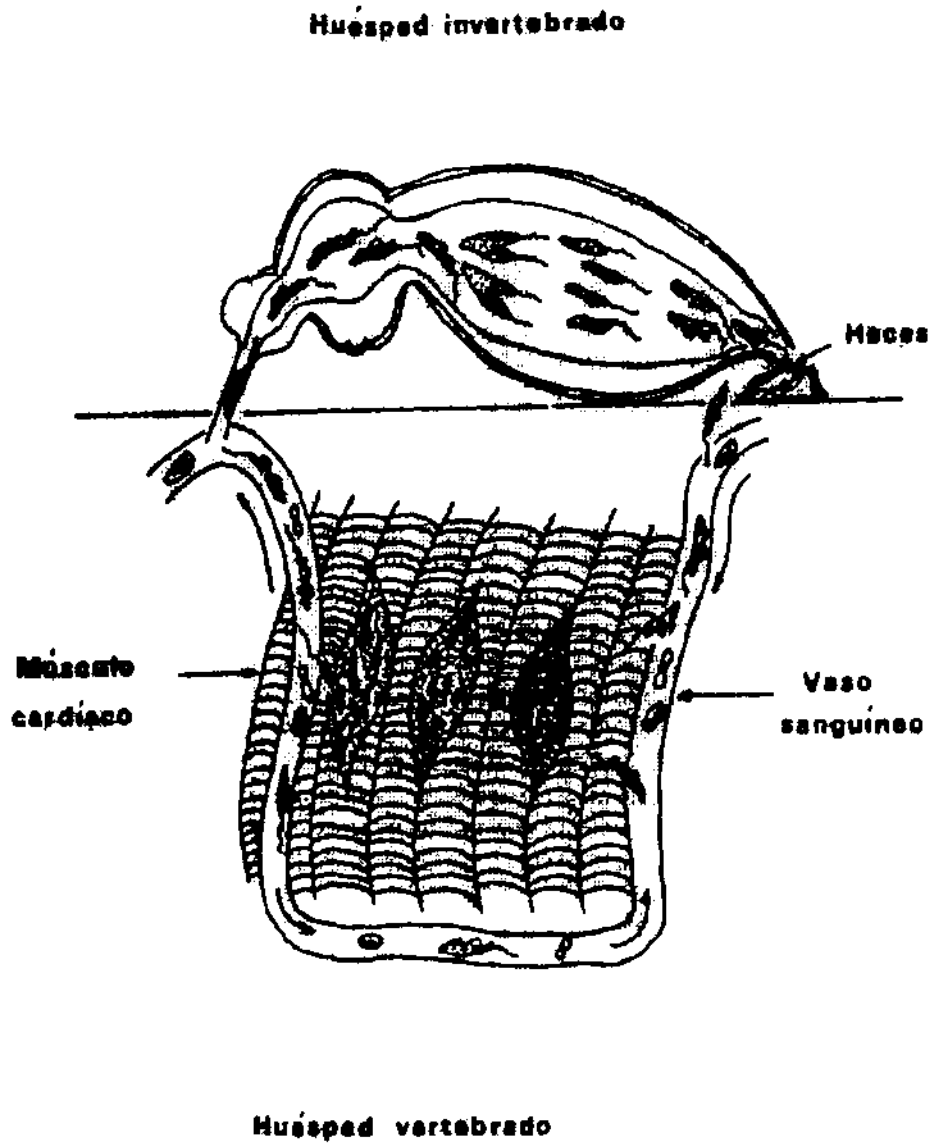


Figura 3. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Se muestran las diferentes fases de desarrollo de *T. cruzi* en el vector y en el hospedero humano. (Tomado de Katz, M., Despommier, D.D. y Gwadz, R.W. 1988. *Parasitic Diseases*. Springer Verlag. New York. 301 pp.

1.1.3 Ciclo de vida

El *T. cruzi* es un parásito heterogéneo, ya que en uno de los estadios de su vida vive en la sangre o fijo en tejidos de una gran variedad de vertebrados, y durante otro estadio, habita en el intestino de los invertebrados hematófagos. Esto depende de la capacidad que tiene el parásito de transformarse o adaptarse a cambiar según cambie su medio ambiente.²⁰

Por lo tanto, el ciclo de vida empieza una vez que los tripomastigotes metacíclicos (liberados con las deyecciones del triatoma al momento de alimentarse) penetran en la piel del vertebrado hospedero a través de punciones o abrasiones cutáneas, se introducen en las células del tejido laxo, vecino al sitio de la penetración y adquieren la forma de amastigote. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria, repletan la célula que termina por romperse, y los parásitos salen a la circulación bajo el aspecto de tripomastigotes diseminándose por todo el organismo. Estos tripomastigotes penetran en nuevas células, se transforman en amastigotes para reproducirse, rompen las células repletas del parásito y vuelven a circular como tripomastigotes, repitiéndose muchas veces este ciclo. El ciclo biológico se completa cuando los tripomastigotes son ingeridos por los triatomas hematófagos. En resumen, en los triatomas la infección es del tubo digestivo, con tripomastigotes en el intestino anterior y posterior, y con epimastigotes en el intestino medio. En el mamífero la infección es sanguínea y tisular. (Figura 3)²¹

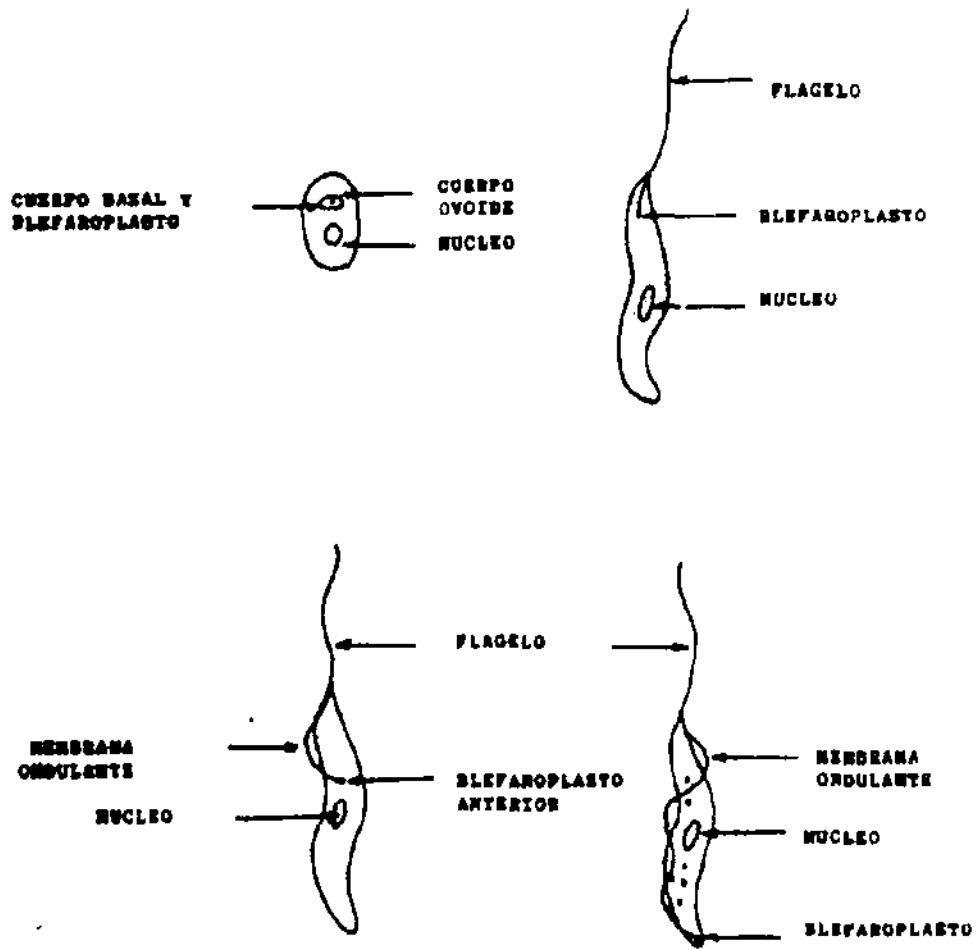


Figura 2. Estadios evolutivos del *Trypanosoma cruzi*. Tomado de Mehlhorn, H. and Piekarski, G. Fundamentos de Parasitología. De. Acribia. Zaragoza, España pp32 y 43.

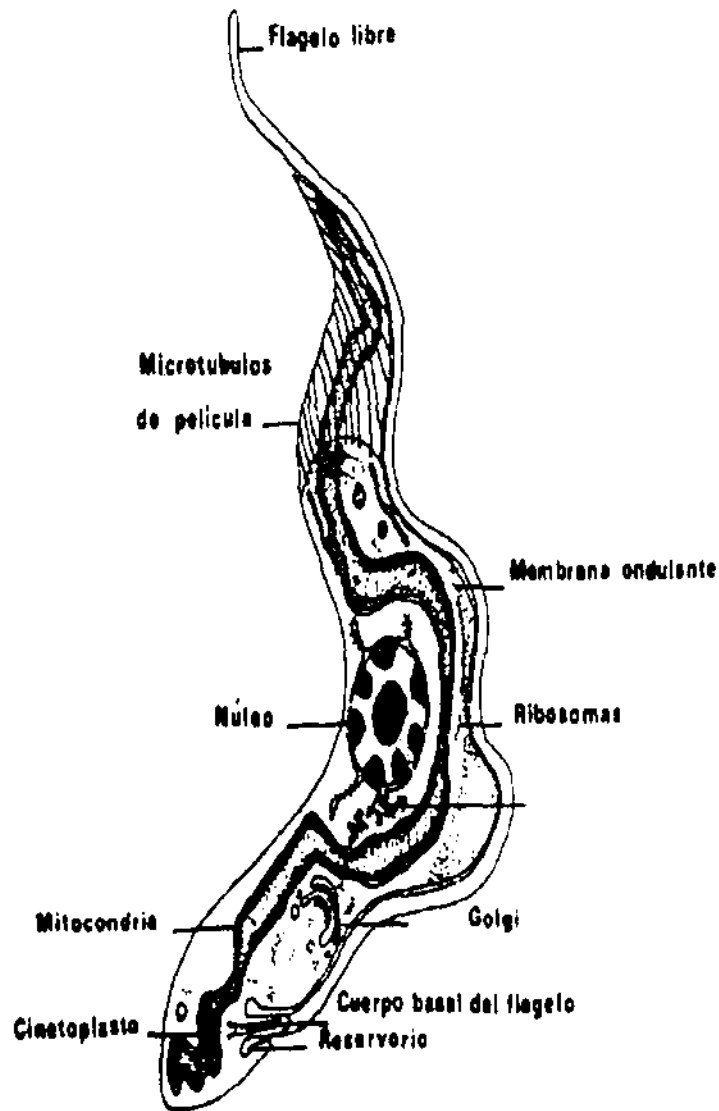


Figura 1 Esquema de la ultraestructura del *Trypanosoma cruzi*. Tomado de Zeemann.

1.1.2 Morfología

T. cruzi presenta variaciones morfológicas, fisiológicas, ecológicas y patogénicas que han permitido identificar cepas diferentes y por eso se ha propuesto considerarlo como el **complejo cruzi**, en lugar de una simple especie. (Figura 1)

T. cruzi en sus diversos hospederos y en medios de cultivo presenta cuatro estadios morfológicos: **epimastigotes**, **tripomastigotes**, **amastigotes** y **promastigotes**,¹⁶ pero generalmente sólo se consideran los tres primeros estadios. (Figura 2)¹⁷

El **tripomastigote** es un flagelado de cuerpo alargado que mide de 20-25 μm de longitud y 2 μm de ancho, presenta un gran núcleo centrovesicular, cinetoplasto subterminal posterior al núcleo y el cual está formado principalmente por DNA y se encuentra asociado a una gran mitocondria. El flagelo está adherido a la membrana ondulante del parásito y sale libre en la porción anterior para moverse activamente como un chicote. Este estadio morfológico se encuentra en la sangre de mamíferos, así como para los triatómos cuando éstos chupan sangre de un animal u hombre infectados.

El **epimastigote**, es de aspecto fusiforme, con 20 a 40 μm de longitud y el cinetoplasto se encuentra anterior al núcleo, el flagelo forma una pequeña membrana ondulante. Este estadio morfológico se multiplica en el intestino de los triatóminos profusamente, para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos, así como también en los medios de cultivo

El **amastigote**, es la forma redondeada, mide de 2-3.5 μm , sin flagelo libre; al microscopio electrónico el flagelo se ve dentro de una bolsa; además presenta un núcleo y cinetoplasto. Se encuentra en el interior de las células del hospedero mamífero y ahí se multiplica profusamente. (Figura 2)¹⁸⁻¹⁹

1.1. Biología de *T.cruzi*

1.1.1 Posición taxonómica

Reino	: <i>Protista</i>
Subreino	: <i>Protozoa</i>
Phylum	: <i>Sarcomastigophora</i>
Subphylum	: <i>Mastigophora</i>
Clase	: <i>Zoomastigophora</i>
Orden	: <i>Kinetoplastida</i>
Suborden	: <i>Trypanosomatina</i>
Familia	: <i>Trypanosomatidae</i>
Género	: <i>Trypanosoma</i>
Especie	: <i>cruzi</i> . ¹³

El subphylum Mastigophora incluye a todos los protozoarios que comúnmente se conocen como flagelados, se caracterizan por tener flagelos en su forma trofozoide. Muchas especies habitan en sistema circulatorio y tejidos su reproducción es asexual por fisión binaria intracinetal.¹⁴

T.cruzi se incluye en el orden Kinetoplastida, debido a que presenta una estructura característica: el cinetoplasto, el cual se localiza en la región anterior del cuerpo, asociado a mitocondria; está constituido fundamentalmente por ácidos nucleicos que le confieren la capacidad de autoduplicación. Los miembros de la familia Trypanosomatidae tienen forma alargada, presentan un solo núcleo y un blefaroblasto del cual se origina un flagelo que forma el margen exterior de la membrana ondulante. Son polimórficos, pudiendo presentar estadios flagelados y no flagelados a lo largo de su ciclo de vida.¹⁵

La tripanosomiasis como muchas enfermedades parasitarias esta ligada al subdesarrollo económico y social. La estructura de la población y los movimientos poblacionales, como la migración del campo a las ciudades e inmigración, constituyen otro factor de riesgo en la transmisión de la enfermedad. ¹¹ La falta de servicios de salud en las zonas rurales así como el no contar con métodos de diagnóstico accesibles, constituyen otro factor de riesgo en la transmisión de la enfermedad en estas zonas. Cabe mencionar, que la heterogeneidad entre cepas de *T.cruzi*, causa problemas graves en el diagnóstico, ocasionando falsos positivos o negativos. ¹² Por tales motivos, es de gran interés estudiar al parásito y su entorno.

iii. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Implementar las condiciones metodológicas de la técnica de PCR, para usarla como herramienta en el estudio y caracterización de aislados de *T.cruzi* así como en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

3.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones metodológicas de la técnica de PCR, amplificando una secuencia muy conservada y altamente repetitiva de el DNA cromosomal de *T.cruzi*, para ser usada en el estudio de aislados del parásito así como en el diagnóstico de la enfermedad.
- Determinar la especificidad y reproducibilidad de la técnica de PCR empleando diferentes cultivos axenicos de *T.cruzi*.
- Caracterizar 12 parásitos diferentes de *T.cruzi*, determinando semejanzas proteicas, antigénicas y genéticas.

IV. HIPÓTESIS

Si la PCR es una técnica sensible y específica que amplifica cantidades mínimas de DNA, usando iniciadores con una secuencia específica de *T.cruzi*, entonces esta amplificación puede servir para la identificación y caracterización de aislados del parásito y por lo tanto usarse como prueba diagnóstica de la enfermedad de Chagas.

V. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

5.1 Tipo de estudio

El estudio es de tipo observacional, prospectivo y comparativo, con variables y condiciones controladas previamente establecidas con el fin de obtener resultados específicos.

5.2 Población de estudio

Se usaron 12 parásitos de *T.cruzi* obtenidos de pacientes con enfermedad de Chagas, donados por el Instituto Nacional de Referencias Epidemiológicas (INDRE).

5.3 Variables:

5.3.1 Variables dependientes

La presencia de diferencias proteicas, antigénicas y genéticas entre los aislados de *T.cruzi*.

5.3.2 Variables independientes

La secuencia de los iniciadores para la PCR

VI RESULTADOS

Los resultados obtenidos al usar los extractos proteicos para determinar el título de anticuerpos por el método de ELISA, utilizando los sueros de ratones inmunizados con *T.cruzi* se presentan en la Tabla 2, en donde se observa la relación que existe entre los títulos más altos y la capacidad inmunogenica. Las cepas Progreso, Agripina, BP8, y Cocula; (esta última presentó un patrón proteico de 5 bandas) mostraron títulos que van desde 1:1024 a 1:2048 con su respectivo patrón proteico de 11 a 18 bandas. Las cepas Cid, Zachila y Tuxtla presentaron títulos de anticuerpos de 1:512 (moderados) con un patrón proteico muy abundante, por último, las cepas Ninoa, Petaquillas, Amarillo, Fidelfa y Miguz tuvieron títulos muy bajos (1:8), y solo 2 bandas proteicas.

CEPA	TITULO DE ANTICUERPOS	No. DE BANDAS PROTEICAS
AGRIPINA	1:1024	16
PROGRESO	1:1048	11
AMARILLO	1:8	2
PETAQUILLAS	1:8	2
BP8	1:1024	18
NINOA	1:8	2
CID	1:512	14
FIDELFA	1:8	2
TUXTLAS	1:512	11
MIGUZ	1:8	2
COCULA	1:2048	5
ZACHILA	1:512	15

TABLA 2. Correlación entre las bandas antigénicas y el título de anticuerpos.

5.4.16 Digestion del DNA con endonucleasas de restricción.

Las digestiones se llevaron a cabo preparando las mezclas de reacción con 1 µg de DNA, amortiguador de enzima y 1 µL de la enzima EcoRI. La digestión se realizó a 37°C, durante 18 hrs. La reacción se detuvo a -20°C.⁷²

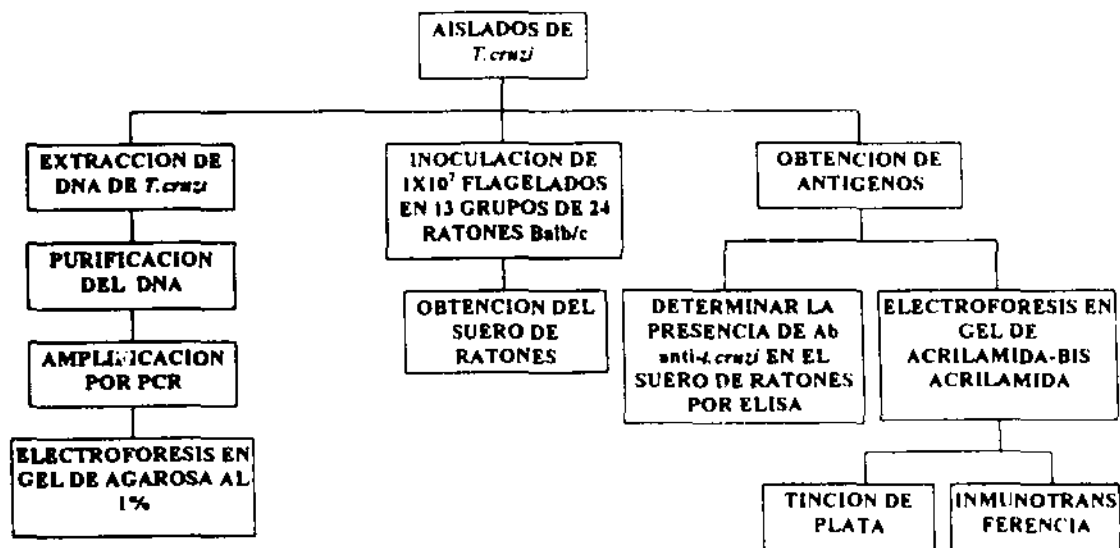
5.4.17 Electroforesis sobre gel de agarosa.

Los fragmentos amplificados y las digestiones de DNA se separaron según sus pesos moleculares por electroforesis sobre un gel de agarosa al 1%, usando como amortiguador de corrida TAE (Tris acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M) con bromuro de etidio (1mg/mL). Se corrió el gel a 80 volts durante 45 min. Enseguida el gel se observó sobre luz UV y se fotografió.

5.4.18 Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos fueron analizados por comparación

5.4.19 Diagrama de Flujo.



5.4.15 Amplificación por PCR.

Se trabajó en condiciones de máxima esterilidad posible, ya que una sola molécula de DNA contaminante pudo ser amplificada y afectar nuestros resultados. Para verificar la especificidad de las bandas de amplificación con los iniciadores, se realizó con un testigo negativo (con todos los reactivos necesarios para la amplificación pero con DNA de ameba).

La amplificación se basa en ciclos repetitivos de desnaturalización del DNA molde al calentar a 94°C por un minuto, seguido de una disminución de la temperatura a 58°C que permite el alineamiento de los iniciadores con las secuencias complementarias que se encuentran en el DNA y un posterior calentamiento a 72°C, donde comienza la síntesis de nuevas cadenas de DNA con los deoxirribonucleótidos (dNTP) que se encuentran en el medio de reacción, por la Taq polimerasa, a partir del extremo 3'-OH de cada iniciador.

La mezcla de reacción se realizó en 100 µL de:

1. - 10 µL de amortiguador específico de Taq polimerasa pH 8.3: Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM. (Todos los reactivos son PERKIN ELMER CETUS)
2. - 2 µL de cada dNTP 2 µM: dATP, dCTP, dGTP, dTTP.
3. - 1 µL de cada iniciador conteniendo 50 ng de cada uno. La secuencia es O1 5' CGC-AAA-CAG-ATA-TTG-ACA-GAG 3' y O2 5' AAC-CAC-AGG-TCA-CAC-ACT-TGT 3'.⁷¹
4. - x µL del DNA a amplificar conteniendo 200 ng.
5. - 0.5 µL de Taq polimerasa 2.5 U/100 µL
6. - 10 µL de MgCl₂ 200 nanoM.
7. - Agua cbp 100 µL.

Las muestras preparadas se colocaron en el termociclador con el siguiente programa:

- 1 ciclo de 5 min. a 94°C.
- 30 ciclos de 1 min. a 94°C, 45 seg. a 58°C, y 2 min. a 72°C
- 1 ciclo de 5 min. a 72°C, finalizando con 20 min. a 4°C



5.4.13 Extracción de DNA de *T. cruzi*

El DNA fue extraído a partir de los sedimentos obtenidos después de la cosecha de cada uno de los doce aislados de *T. cruzi*. Se resuspenden 1×10^8 flagelados/mL en una solución de cloruro de sodio 0.15M, EDTA 0.1M, Proteínasa K (SIGMA) a una concentración final de 0.1 mg/mL y dodesil sulfato de sodio al 0.5% final. La mezcla se incubó durante 3 h a 55°C en un baño María. Las proteínas se eliminaron por extracciones sucesivas. Se agregó primero una solución de Fenol pre-calentado a 65°C, pH 8 en relación volumen a volumen a la suspensión digerida y se mezcló vigorosamente, luego se centrifugó 10 min a 10000 r.p.m y 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se realizó una segunda extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. De igual forma se realizaron otras dos extracciones con una solución de cloroformo-alcohol isoamílico y éter, recuperando siempre la fase acuosa que es la que contiene el DNA.

El DNA recuperado en la fase acuosa se precipitó con acetato de sodio al 10% del volumen final y 2.5 volúmenes de etanol frío, toda la noche a -20°C. Después se centrifugó a 8000 xg durante 30 min. a 4°C. Se obtuvo el DNA precipitado, se secó y se resuspendió en 100 μ L de TE y RNasa a una concentración final de 20 mg/mL. La solución se incubó 30 min. a 37°C. Se realizó una última extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para purificar y eliminar el RNA. Finalmente se re-precipitó en acetato de sodio al 10% del volumen final y 2.5 volúmenes de etanol frío, durante 1 h. a -20°C. El DNA se secó y se resuspendió en un volumen mínimo de TE.

Una vez obtenido, la medición de la absorbancia del DNA se llevó a cabo a 260 nm, obteniendo la D.O. para calcular su concentración y verificar su pureza.

5.4.14 Purificación del DNA.

Una vez obtenido el DNA se purificó usando el Kit PREP-A-GENE™ DNA PURIFICATION de BIO-RAD. Se purificaron 2 μ g de el DNA obteniendo al final un 85% de rendimiento. La pureza se determinó leyendo la D O a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro SORVALL DU6000.

tiras de membrana para incubarlas a temperatura ambiente por espacio de 2 h con las muestras del suero de ratones inmunizados diluidos 1:1000 en PBS, cabe mencionar que para cada ensayo se metieron dos controles, uno positivo y otro negativo con los que se validaron los resultados de cada experimento. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (Immunology Products No. 97045A) a una dilución 1:500 en PBS-Tween. Las tiras se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Las incubaciones con cada uno de los anticuerpos fueron sucedidas por dos lavados de 15 minutos cada uno con PBS-Tween. Las tiras se revelaron agregando el sustrato 4-Cloro, 1-Naftol (SIGMA) en una concentración de 3 mg/mL en PBS y peróxido de hidrogeno. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y se paró con agua destilada

5.4.12 Tinción con Nitrato de Plata

Se determinó cualitativamente, el número de proteínas totales y su peso molecular de los doce aislados *de T.cruzi*. Mediante una electroforésis en Gel Preparativo de Poliacrilamida al 10%, se prepararon 400 ug de proteínas del extracto total de cada uno de los aislados. El gel fue fijado en ácido tricloroacético al 20% durante 2 h. Se lavo en metanol al 50% y dos veces en agua para rehidratar el gel. Posteriormente, el gel se colocó en solución diamino de plata (Hidróxido de Sodio 0.36%, Amonio 35% y Nitrato de plata al 20%) durante 15 min. Inmediatamente después se adiciono solución reductora (Ácido Cítrico al 1% y Formaldehído 36%) hasta visualizar las bandas proteicas. Lavar en agua dos veces y detener la reacción con metanol 45% y ácido acético 10%.

5.4.10 ELISA

Se determino el título de anticuerpos anti-*T.cruzi* en el suero de los ratones inmunizados. Este ensayo también se hizo con sueros de ratones sin inmunizar como control negativo. Se utilizaron placas Nuclon, las cuales se sensibilizaron con 10 µg/mL de extracto total de la cepa COCULA en PBS. Se incubaron toda la noche a 4°C, posteriormente fueron centrifugadas a 2500 r.p.m. durante 5 min. En una centrifuga IEC Centra-8. Los sitios de pegado inespecífico se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con Albúmina Sérica Bovina (SIGMA) al 5% en PBS-Tween (Monofosfato de Sodio 0.36g, Difosfato de Sodio 1.05g, Cloruro de Sodio 8.77g, Tween 20 0.20 mL, pH 7.2) Se realizaron 5 lavados de la placa con PBS-Tween. Se agregaron por triplicado las muestras de suero diluidas 1:500 en solución de anticuerpo incluyendo los controles con los cuales se validaron los resultados para el experimento. Se incubo durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente las placas se lavaron como ya se menciono. Se agregó el segundo anticuerpo, anti-IgG de ratón acoplada a peroxidasa (Immunology Products No 97045A) diluido 1:1000. Las placas se incubaron 1 h a temperatura ambiente después se lavaron en forma similar a los pasos anteriores y finalmente la reacción se reveló agregando como sustrato O-Fenildiamina (SIGMA) en amortiguador citrato-fosfato pH 5. Las placas se incubaron 15 min a temperatura ambiente. La reacción se paró con ácido sulfúrico 4N. Se midió la densidad óptica a 450 nm en un lector para ELISA LKB WALLAC Ollivetti.

5.4.11 Inmunotransferencia

Mediante un corrimiento electroforetico en gel de Poliacrilamida al 10%⁶⁹ (Apéndice 2) se prepararon 400 µg de proteínas del extracto total de la cepa COCULA. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.2µM (Trans-Blot-Transfer Médium Bio-Rad) durante 90 min. a 350 mA, 120 V⁷⁰ en amortiguador de transferencia (Apéndice 4) La membrana se bloqueó durante toda la noche a 4°C Albúmina Sérica Bovina al 1% en PBS-Tween. Se cortaron

5.4.6 Esquema de Inmunización

Se distribuyó en forma aleatoria 13 grupos de 24 ratones de la raza Balb/c de 8 semanas de edad, se inocularon directamente 1×10^7 flagelados de *T.cruzi*/mL, como única inoculación. Después de 30 días se sacrificaron.

5.4.7 Preparación de antígeno

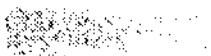
Después de cosechar, el cultivo se revisó al microscopio para verificar que no se encontrara contaminado. Se contó el número de parásitos por mL usando una cámara de Neubauer. El botón formado se resuspendió en 1 mL de solución de lisis con inhibidores de proteasas (PMSF 1Mm y PHMB-Tris 10mM). Se rompieron las células por congelación durante 30 min. Se centrifugaron a 10 000 r.p.m durante 10 min. a 4°C. El sobrenadante (extracto total) se recuperó y almacenó en tubos ependorf a -20°C hasta su uso.⁶⁶

5.4.8 Cuantificación de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas del extracto se realizó leyendo la densidad óptica en un espectrofómetro SORVALL DU6000 a 280 nm.

5.4.9 Estandarización de ELISA

En el ensayo se determinó el título de anticuerpos anti-*T.cruzi* en los ratones utilizando diluciones del suero de 1:250, 1:500 y 1:1000 para determinar la dilución óptima. Cada muestra se analizó por triplicado. El punto de corte mediante el cual se determinó el rango de positividad de la placa se estableció por medio de la media poblacional más/menos dos desviaciones estándar



NOMBRE	PROCEDENCIA	ORIGEN
Agripina	Morelos	Triatomino
BP8	Veracruz	Tiacuache
Cid	Oaxaca	Humano
Cocula	Oaxaca	Humano
Zachila	Guadalajara	Humano
Amarillo	Guadalajara	Humano
Progreso	Veracruz	Humano
Tuxtias	Veracruz	Humano
Fidelfa	Morelos	Humano
Petaquillas	Guerrero	Humano
Miguz	Morelos	Triatomino
Ninoa	Oaxaca	Humano

Tabla 1. Origen geográfico y huésped mamífero o vector de las 12 aislados de *T.cruzi* usados en este estudio.

5.4.5 Cultivo de Parásitos

Se cultivaron epimastigotes de los doce aislados de *T.cruzi*, los cuales se mantuvieron a 28°C por un periodo de 8 días en medio LIT (Liver Infusión Triptose)⁸⁷ (Apéndice 1) a pH 7.2. Los aislados se cultivaron en cajas Nunc de 50 mL conteniendo 15 mL de medio LIT y un total aproximado de 1×10^8 parásitos/mL. Para llevar a cabo la investigación el parásito, fue cosechado en tubos Costar de 50 mL a 1500xg/10 min. a 4°C en una centrifuga refrigerada Sorvall RT6000B. Los parásitos fueron lavados con PBS 1X (Fosfato de Sodio 10mM y Cloruro de Sodio 150mM) (Apéndice 4). Se dividió en dos partes: una para inmunizar ratones y la otra para extraer el DNA y el antígeno.

Vasos de precipitado Pyrex	2000, 500, 250, 200, 150, 100, 50, 5 mL
Frascos Pyrex con tapón de rosca	500, 250, 100 mL
Matraz Erlenmeyer Pyrex con tapón de rosca	1000, 500, 250, 125 mL
Pipetas serológicas Kimax	25, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2 mL

5.4.3. Material diverso

Cajas para cultivo celular Nunc	200 mL
Tubos Costar	15 y 50 mL
Placas Nunclon Delta	
Tubos eppendorf	1, 0.5 mL
Puntas amarillas RT20 Rainin Instrument Co, Inc	100 1000 μ L
Pipeta Costar	1000 μ L
Pipeta Robbíns Scientific	25 μ L
Papel filtro S&S poro	0.4 mm
Papel de nitrocelulosa	0.22 mm
Pipeta multicanal Labsystems & Flow Laboratories	200 μ L
Gradillas.	

5.4.4 Parásitos

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se emplearon doce parásitos diferentes de *T.cruzi* aisladas de vectores y de humanos infectados obtenidas dentro de la República Mexicana (Tabla 1). Los aislados fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE)

5.4 Material y Métodos.

5.4.1. Equipo.

Incubadora JM Ortiz a 37°C y 50°C

Centrifuga refrigerada Sorvall RT 6000B

Camara electroforética mini-protean II Cell de Bio-Rad

Camara electroforética SE-250 Mighty Small II Hoeffer

Camara de transferencia electroforética TE 22 mini-Transphor

Thermostatic Circulator 2719 Multitemp II

Centrifuga IEC Centra-8

Lector de ELISA LKB WALLAC Olivetti

Espectrofotómetro Bekman DU 640

Microcentrifuga Nanofuge

Microcentrifuga Costar 10 Continua

Termociclador Perkin Elmer Cetus

Transiluminador de UV Mighty Brightly Hoeffer

Camara instantanea Polaroid DS34

Rotator de agitación variable Yan Kee

Baño Metabólico J.M. Or.

Camara electroforética para geles submarinos mini-sub Cell Bio-Rad

Termometro -10 a 200°C

5.4.2. Material de vidrio

Tubos de ensaye Pyrex	13X75 mL
Tubos de ensaye Pyrex	13X100 mL
Tubos de ensaye Pyrex con tapón de rosca	18X150 mL
Matraz aforado Pyrex	1000, 500, 250, 100, 10 mL
Probetas Pyrex	1000, 500, 250, 100, 10 mL

VII DISCUSION

La variabilidad protéica y antigénica de los 12 diferentes aislados de *T.cruzi* sugiere formar con ella tres grupos. El grupo I con las cepas Progreso, BP8, Cid, Tuxtla, Cocula y Zachila en donde el común denominador son las proteínas de 116 y 45 Kda. El grupo II quedó integrado por las cepas Amarillo, Petaquillas, Ninoa, Fidelfa y Miguz con una proteína de 45 Kda común en ellas y finalmente el grupo III constituido por la cepa Agripina, con una sola proteína de 66 Kda. Además, la mayoría de los aislados incluyó un número diferente de proteínas en un rango de peso molecular muy variable, pero muy semejantes entre ellas. Evidentemente, esto nos pone de manifiesto similitudes y diferencias entre cepas de la misma especie.

Existen estudios publicados que reportan diferencias antigénicas entre las tres formas principales de *T.cruzi*⁷³ y otros reportan la existencia de variabilidad protéica y antigénica en que influye el trasmisor de la Tripanosomiasis Africana.⁷⁴ En el *T.cruzi* también podrían presentarse diferencias entre cepas.

Además, de acuerdo a nuestra experiencia, para obtener mejores resultados, recomendamos usar cosechas de cultivos frescos o en su defecto que no tengan más de 8 días de cosechados, ya que las proteínas se degradan.

El significado de estos resultados se puede explicar por el hecho de que fueron obtenidas de diferentes pacientes con ubicación geográfica y vector diferente, y más aún provenientes de cultivos en donde existe una limitante como es el mantenerse en cultivo axénico durante un cierto tiempo, en donde, junto con la información genética "per se" del parásito, ésta puede modificarse mostrando un genotipo diferente.

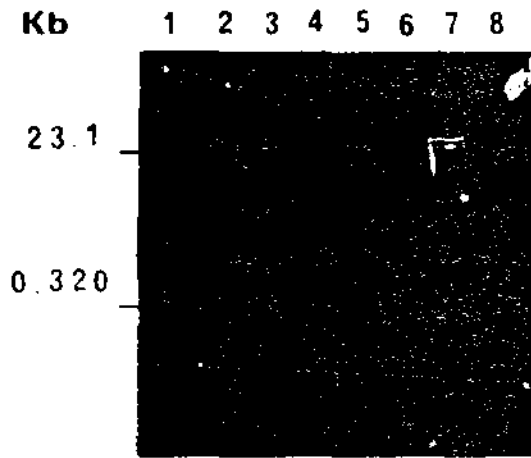


Figura 9 Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observa el corrimiento electroforético de el DNA genómico y el DNA de PCR de las cepas 1-2) BP8, 3-4) Ninoa, 5-6) Cid, y 7-8) Fidelfa. Teñido con Bromuro de Etidium

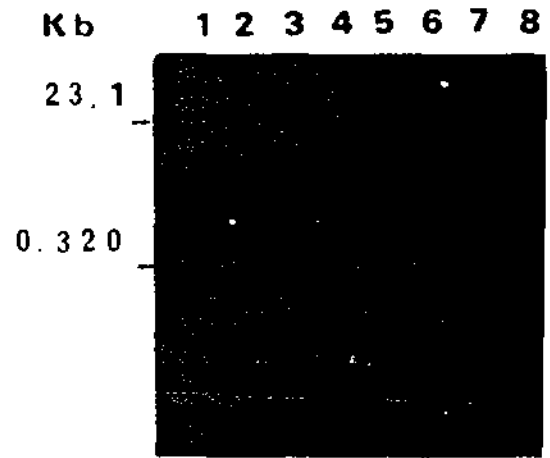


Figura 10 Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observa el corrimiento electroforético de el DNA genómico y el DNA de PCR de las cepas 1-2) Tuxtla, 3-4) Miguz, 5-6) Cocula, y 7-8) Zaachila. Teñido con Bromuro de Etidium

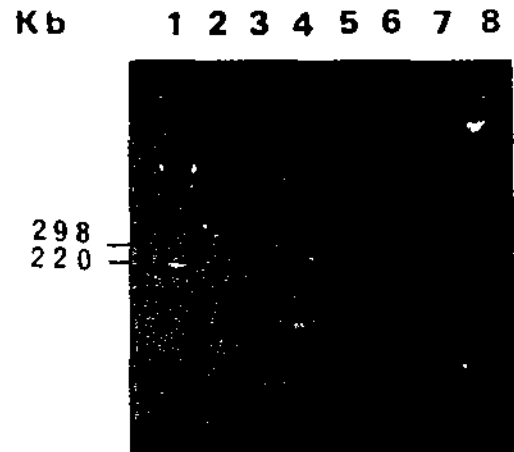


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observa el corrimiento electroforético de las ampliaciones de 1) T. cruzi, 2) E. histolytica, 3) G. lamblia, 4) A. castellanii. El gel se tiñó con Bromuro de Etidium

Figura 12 Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observa el corrimiento electroforético de los productos de digestión con EcoRI en el DNA de PCR de las cepas 1) PM, 2) Agripina, 3) Progreso, 4) Amarillo, 5) Petaquillas, 6)BP8, 7) Ninoa, y 8) Cocula. El gel se tiñó con Bromuro de Etidium

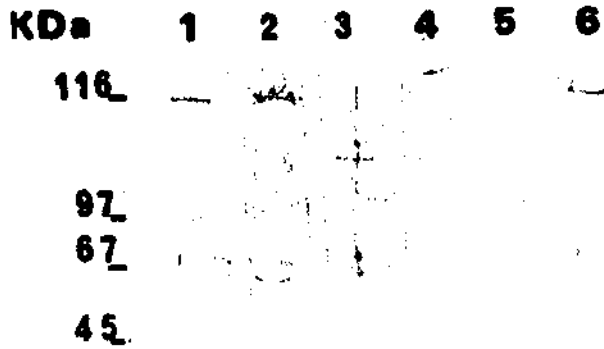


Figura 5. Inmunotransferencia revelado con 4-CN y H₂O₂. Se observan las diferencias antigénicas de las cepas: 1) BPK, 2) Tuxtlas, 3) Progreso, 4) Petaquillas, 5) Amarillo y 6) Cid

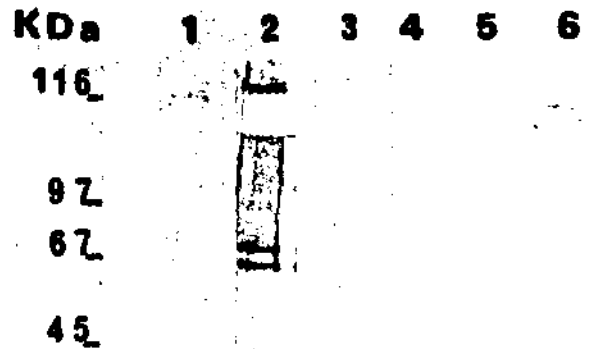


Figura 6. Inmunotransferencia revelado con 4-CN y H₂O₂. Se observan las diferencias antigénicas de las cepas: 1) Zachila, 2) Agripina, 3) Ninoa, 4) Fidelfa, 5) Cocula y 6) Miguz

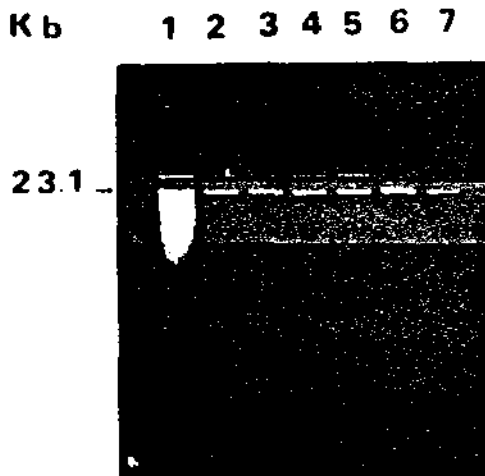


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se presenta el corrimiento electroforético de el DNA purificado de 5 cepas: 1) PM, 2) Agripina, 3) Progreso, 4) Amarillo, 5) Petaquillas y 6) BPK

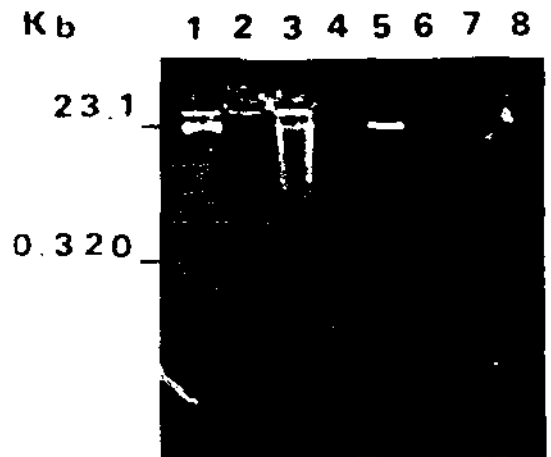


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observa el corrimiento electroforético de el DNA genómico y el DNA de PCR de las cepas: 1-2) Agripina, 3-4) Progreso, 5-6) Amarillo, y 7-8) Petaquillas. El gel se tiñó con Bromuro de Etridium

Los productos de digestión con la enzima EcoRI, se muestran en la Figura 12, en donde se puede observar que los fragmentos obtenidos para cada una de las cepas son iguales

6.1 FIGURAS

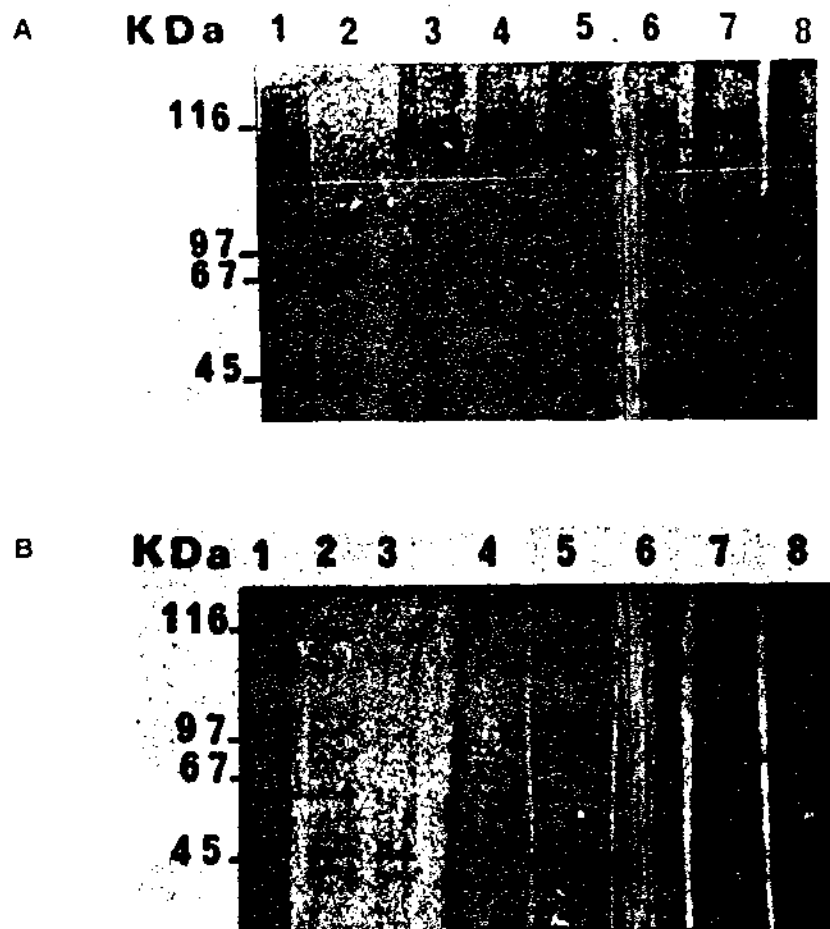


Figura 4 Electroforesis en gel de Acrilamida-Bis Acrilamida al 10%. Se observa el patrón electroforetico total de las 12 cepas teñidas con Nitrato de Plata. El orden es el siguiente. En la Figura 4 **A** el 1) Pesos moleculares, 2) Negativo, 3) BP8, 4) Tustlas, 5) Progreso, 6) Petaquillas, 7) Amarillo y 8) Cid. En la Figura **B** el orden es el siguiente: 1) Pesos moleculares, 2) Negativo, 3) Zuchila, 4) Agripua, 5) Smao, 6) Fidelfa, 7) Cocula y 8) Miguz.

En este caso, al determinar la pureza se trato de eliminar el aceite mineral que quedo en exceso en el tubo, el cual afecta en la lectura espectrofotométrica.

CEPA	DNA $\mu\text{g/mL}$ AISLADO	RELACIÓN 260/280	DNA $\mu\text{g/mL}$ PURIFICADO	RELACIÓN 260/280	DNA $\mu\text{g/mL}$ AMPLIFICADO
AGRIPINA	78.57	1.3	74.38	1.7	179.22
PROGRESO	54.38	1.3	12.56	1.7	136.98
AMARILLO	32.85	1.1	19.53	1.5	134.87
PETAQUILLAS	62.67	1.3	9.65	1.9	144.27
BP8	68.50	1.5	10.43	1.9	144.27
NINOA	28.37	1.2	12.19	1.6	140.31
CID	58.53	1.2	32.50	1.6	149.12
FIDELFA	72.48	1.4	56.56	1.8	149.12
TUXTLAS	36.12	1.2	26.42	1.6	144.27
MIGUZ	153.98	1.4	22.04	1.8	179.22
COCULA	61.71	1.5	20.47	1.9	136.87
ZACHILA	45.58	1.5	21.41	1.9	149.12

TABLA 4. Aislamiento, purificación y amplificación de el DNA genómico de 12 cepas de *T.cruzi*.

Las Figuras 8, 9, y 10 muestran los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% del DNA genómico y amplificado de cada una de las cepas.

Se observa en todas las cepas, la presencia de una banda de 23.1 Kb que corresponde al DNA genómico y una banda de 0.320 Kb que corresponde a la amplificación.

Además, en la Figura 11 se observa el resultado de un corrimiento electroforetico usando DNA de *T.cruzi*, *Entamoeba histolitica*, *Giardia lamblia* y *Acanthamoeba castellani*. en donde solo se obtuvo una banda de amplificación de 0.320 Kb para el DNA de *T.cruzi*

CEPA	No. DE BANDAS TOTALES	PM (KDa)	No DE BANDAS ANTIGENICAS	PM (KDa)	GRUPO
AGRIPINA	16	94, 66 Y 45	16	66	III
PROGRESO	17	116-45	11	116-45	I
AMARILLO	15	116-45	2	45	II
PETAQUILLAS	17	116-45	2	45	II
BP8	19	116-45	18	116-45	I
NINOA	5	94-45	2	45	II
CID	17	116-45	14	116-45	I
FIDELFA	20	94-45	2	45	II
TUXTLAS	15	116-45	11	116-45	I
MIGUZ	21	116-45	2	45	II
COCULA	18	116-45	5	116-45	I
ZACHILA	19	116-45	15	116-45	I

TABLA 3. Relación del bandeo entre las 12 cepas de *T. cruzi*

Con respecto a los resultados de la extracción y purificación del DNA total de las 12 cepas de *T. cruzi* así como los de amplificación, se encuentran en la Tabla 4. Se observa que con el método de extracción fenólica se obtienen concentraciones bastante aceptables para cada una de las cepas, con una pureza aproximada de 1.1 a 1.5, dependiendo esto del RNA y de las proteínas de la muestra que no fueron extraídas. La pureza se obtuvo dividiendo la D.O. de 260 entre la de 280 nm, en cada una de las cepas. (Tabla 4)

También se puede observar, que con el método de purificación, la concentración de el DNA genómico se ve disminuida en relación a la concentración obtenida inicialmente. Aunque en el DNA purificado la pureza aumento, encontrándose desde 1.5 a 1.9. Estos resultados se presentan en la Figura 7

Después de los 30 ciclos de amplificación con 200ng de DNA genómico de cada una de las cepas de *T. cruzi*, se obtienen concentraciones de $6-8 \times 10^8$ veces más del DNA amplificado en cada una de estas cepas

Se obtuvieron aproximadamente 18.75×10^7 flagelados/mL en los cultivos de cada una de las cepas.

De los extractos proteicos, se encontró que la separación de las proteínas de las 12 cepas de *T.cruzi* por electroforesis, mostró diferencias entre ellas, relacionadas con el peso molecular. (Figura 4) Entre las cepas se presentaron con mayor intensidad de 16 a 18 bandas totales, de las cuales, el peso molecular vario dentro del rango de 45,000 a 116,250 Daltones (Da).

En la Figura 4A se muestra que las cepas BPB, Tuxtlas, Progreso, Petaquillas, Amarillo y Cid, no presentan grandes diferencias entre ellas, además de tener una banda común en todas, que corresponde a 116,250 Da

Por otro lado, las cepas Zachila, Agripina, Ninoa y Fidelfa no presentan la banda de 116,250 Da, por lo demás son semejantes entre sí. (Figura 4B)

Las cepas Cocula y Miguz, solo muestran la banda de 116,250 Da ya que no tienen buena separación en el patrón electroforetico. Todos estos resultados se observaron, con la ayuda de la Tinción de Plata.

El número de bandas obtenidas en el Souther blot para cada una de las cepas fue variable, esto dependió de la antigenicidad de cada una de éstas. El bandeo correspondió al mismo rango de pesos moleculares que el visualizado con la Tinción de Plata. Estos resultados se presentan en las Figuras 5 y 6. La relación de las bandas totales y las antigénicas de todas las cepas se presenta en la Tabla 3, indicándose el rango de pesos moleculares para cada una.

En la tabla podemos observar, que no todas las cepas presentan el mismo número de bandas en su patrón proteico y antigénico



VIII CONCLUSIONES

El análisis de Inmunotransferencia reveló variabilidad proteica y antigénica entre las 12 cepas mexicanas de *T. cruzi*, encontrando diferencias en algunas, lo que nos llevo a formar 3 grupos isoenzimáticos diferentes.

Por medio del estudio con la PCR se logró establecer las condiciones metodológicas para llevar a cabo la amplificación del DNA de *T. cruzi*, obteniendo amplificaciones de 0.320 Kb. Se corroboró entonces el valor de la PCR para realizar estudios genéticos resultando ser una técnica rápida, muy sensible y específica capaz de detectar al parásito y evitar así las reacciones cruzadas.

Al realizar los cortes con la enzima de restricción EcoRI, se encontró que los fragmentos cortados son iguales o casi iguales en todas las cepas ya que no se pudo diferenciar la banda. Esto no quiere decir que no existan diferencias en el genoma del parásito, sino que la enzima utilizada para el estudio no nos permite hacer una diferenciación en bandas con pesos moleculares muy cercanos.

El uso de las técnicas de Biología Molecular ha venido a revolucionar el diagnóstico de las enfermedades infecciosas difíciles de detectar, como se puede observar con el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En este estudio la amplificación de fragmentos comunes bien conservados de la región del DNA cromosomal, nos proporcionó un método específico y sensible capaz de detectar células de *T.cruzi*, independientemente del huésped y del vector con el fin de diagnosticar la enfermedad.

Comparando estos resultados con los estudios que se han hecho acerca de la implementación de las diferentes condiciones para la realización de la técnica de PCR,⁷⁹ podemos llegar a decir que es una metodología con muchas ventajas que nos lleva a diagnosticar la enfermedad de Chagas con rapidez, precisión y especificidad, que se puso de manifiesto al amplificar bandas de DNA de 0.320 Kb. Requena y colaboradores, reportan amplificaciones de 0.33 Kb, obtenidas de la misma región,⁸⁰ lo que nos hace suponer que nuestros resultados en la amplificación pertenecen al DNA cromosomal de *T.cruzi* y que de esta manera se evitan las reacciones cruzadas, principalmente las que ocurren con *Leishmania*,⁸¹ siendo éste uno de los principales problemas que se presentan en el diagnóstico de la enfermedad.

La PCR implementada por nosotros será de gran utilidad, en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en cualquier estadio, dando resultados confiables, exactos en un tiempo más corto; y en la identificación y caracterización de cepas de *T.cruzi*, dado que se amplifica una región muy conservada del protozoario

Igualmente, los resultados obtenidos de la variabilidad antigénica, nos indican la diferente respuesta huésped-parásito en todas las cepas. De ello se manifiesta que, no todas las proteínas de peso molecular mayor fueron antigénicas, como se observa en el grupo I con las cepas Progreso, BP8, Cid y Tuxtla, a diferencia de las cepas Amarillo, Petaquillas y Fidelfa (grupo II), en donde solo dos de sus proteínas fueron antigénicas correspondiendo al peso molecular de 45 Kda. No se mostró diferencia entre las cepas del grupo II, siendo esta proteína la más antigénica de acuerdo al título de anticuerpos. Se puede suponer que esta proteína es de utilidad diagnóstica, como sucedió en los estudios donde trabajaron con una proteína de 72 Kda (hsp 70),⁷⁵ con cepas de *T.cruzi*.

Otro punto al respecto, es el reportado en investigaciones hechas con las proteínas de citoplasma/núcleo y proteínas mitocondriales⁷⁶ de *T.cruzi*, en donde se dice que son las que confieren antigenicidad al parásito y siendo igualmente dependiente de factores tales como la temperatura, el estado del huésped, el transmisor y otros.

Estudios realizados sobre el tema, indican la existencia de proteínas codificadas, causantes de la antigenicidad⁷⁷ y algunos autores mencionan que los antígenos de *T.cruzi* son estado-específicos y su expresión varía de acuerdo a la cepa⁷⁸. Por lo que inferimos que si hay una plasticidad genética en el DNA de las regiones no conservadas de *T.cruzi*.

De acuerdo a nuestros resultados de variabilidad genética, al digerir el DNA de los doce aislados de *T.cruzi* con EcoRI, no mostraron diferencias entre ellas.

La explicación es que la enzima cortó en sitios conservados del genoma de *T.cruzi* siendo éstos muy parecidos en las doce cepas estudiadas. Para observar diferencias se tendría que digerir con otras enzimas y encontrar tal variabilidad, que evidentemente existe por resultados obtenidos.

IX BIBLIOGRAFIA

1. Brener, Z. **Biología del *Trypanosoma cruzi***. Ann Rev Microbiol 1973;27:347-532.
2. Aguilar, R., Noguera, B., Calvo, M. L. **Estudio Comparativo de la Susceptibilidad de Cinco Especies de Triatomíneos Insecta Reducida a la Infección con *Trypanosoma cruzi***. Rev Lat Amer Microbiol 1993;35:201-6.
3. **Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre**. Sal Pub Méx 1993;35(1):56-62.
4. Reyes, B.M., Lorca, M, Muñoz, P and Cabrera, A. **Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns**. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:2846-50.
5. OMS, 1991. **Control de la Enfermedad de Chagas**. Informe de un comité de Expertos de la OMS Serie Informes Técnicos No 811, Ginebra 101 pp
6. Mazzotti, L. **Dos casos de la Enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca**. Gac Med Mex 1940;70:417-20.
7. Reyes, P.A. **Chagas Disease in North América**. Am Heart J 1993;126:1496.
8. Velazco, C.O. **La enfermedad de Chagas en México** Infectologia 1992;12:783-91.
9. Tay, J, Schenone, H, Sánchez, J.T., Robert, L. **Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana** Bol Chil Parasitol 1992;47:43-53.
10. Sistema Nacional de Salud. **Casos nuevos de enfermedades** Boletín de Información Estadística. 1994,2(14):35-9.
11. OPS. **La Historia Natural, la Epidemiología y el Control de la Enfermedad de Chagas**. 1984,serie No 92.

12. Reyes, P.a., Monteon, V., Pérez, R., Jiménez, D.M., Quiroz, F.L., Negrete, M.C., Rosales, J.L. **Estudio de la Enfermedad de Chagas en una comunidad del Estado de Puebla.** Mem XI Congreso Nacional de Parasitología. Querétaro, Qro. 1994.
13. Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, E. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. y Wallace, F. G. **A Newly Revised Classification of the Protozoa** J Protozool 1980;27:37-58.
14. Chagas, C. **Nova Tripanosomíaze Humana. Estudio sobre lo Morfologia o Ciclo Evolutivo de Schizotripanum cruzi gen; n. sp. Ajente Etiológico de Nova Entidade Morbida do Men.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1:159-218
15. Cheng, C. T. **General Parasitology.** Academic Press 2a Ed. New York 1965
16. Pereira, M. E. **Cell Biology of Trypanosoma cruzi.** En: **Modern Parasite Biology.** Ed. Freeman. New York. 1990;66-77.
17. Schmidt, G.D. y Roberts, L.S. **Fundamentos de Parasitología** C.E.C.S.A México. 1984;655.
18. Sleigh, M. A. **Protozoa and other Protistas.** Cambridge University press New York. 1989;342.
19. Tay, J., Aguilera, Velasco, C., R.L. y Quiroz G.M. **Parasitología Medica** Mendez, C.F. 1984;105-127 México, D.F.
20. Dimock, A.K., Davis, D.CH and Kuhn, E.R. **Effect of Elevated Environmental Temperature on the Antibody Response of Mice to Trypanosoma cruzi during the Acute Phase of Infection** Infect Immun 1991;59(12):4377-82.
21. García, E.S and Azambuja, P. **Development and Interactions of Trypanosoma cruzi within the Insect Vector.** Parasitol Today 1991;7:241-4



22. Catala, S.S., Gorla, D.E., Basombrio, M.A. **Vectorial Transmission of *Trypanosoma cruzi* an experimental field study with susceptible and immunized hosts.** Am J Trop Med Hyg 1992;47(1):20-6.
23. OMS 1986. **Epidemiología y Control de la Tripanosomiasis: Informe de un Comité de Expertos de la OMS.** Serie Informes Técnicos No. 739 Ginebra 98.
24. Calvo, M.M de L., Noguera, T.B., Alejandre, A.R y Cortés, J.M. **Infección Experimental con *Trypanosoma cruzi* a través de Agua y Alimentos Contaminados.** Rev Lat Amer Microbil 1994;36:67-9
25. Alejandre, A.R., Noguera, T.B., Calvo, M.M de L y Cortés, J.M **Estudio Comparativo de la Susceptibilidad de cinco especies de Triatomíneos (Insecta: Reduviidae) a la infección con *Trypanosoma cruzi*.** Rev Lat Amer Microbil 1993;35:201-6.
26. Barr, C.S., Holes, A.R and Klei, R.T. **Electrocardiographic and echocardiographic features of Trypanosomiasis in dogs inoculated with North American *Trypanosoma cruzi* isolates.** Am J Vet Res 1992;53(4):521-7
27. Moncayo, A. **Chagas' Disease: Epidemiology and Prospects for Interruption of Transmission in the Americas** Rapp Trimest Sanit Mond 1992;45:276-9.
28. Dusanic, G.D. 1991. ***Trypanosoma cruzi*. (*Schistotrypanum cruzi*).** In (Ed) Academic Press, London Parasitic Protozoa Vol 1:137-194
29. Shikanai, M.A., Brisola, M.C., Quedes, L.A., Siqueira, G.S., Barone, A.A., Dias, JCP., Amato Neto, V and Chapedeiro, E. **Possible oral transmission of Acute Chagas' Disease in Brazil.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1991;33(5):351-7.
30. Velazco, C.O., Guzman, B.C., Ibañez, B.S **Enfermedad de Chagas en México.** Insectol 1992;12:783-91

31. Primavera, K.S., Umezawa, E.S., Peres, B.A., Camargo, M.E and Hoshino, S.S. **Chagas' Disease: IgA, IgM and IgG antibodies to T.cruzi Amastigote, Trypomastigote and Epimastigote Antigens in Acute and in different Chronic forms of the disease.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1990;32(3):172-80.
32. Magalhaes, J.B and Andrade, S.G. **Investigation on the Possibility of Spontaneous cure of mice infected with different strains of *Trypanosoma cruzi*.** Rev do Inst Med Trop de Sao Paulo 1994;36(6):481-4
33. Mendoza, G.J de D., Miranda, L.E., Velazco, C.O., Tinoco, R.O and Maciel, P.M de J. **Cardiopatía Chagásica Crónica. Presentación de 60 casos** Arch Inst Cardiol Mex 1991;65(6):546-50.
34. Avila, A.H., Borges, P.A., Thiemann, O., De Paiva, E., Degraeve, W., Moreed, M.C. and Simpson, L. **Detection of *Trypanosoma cruzi* in Blood Specimens of Chronic Chagasic Patients by Polymerase Chain Reaction Amplification of Kinetoplast Minicircle DNA: Comparison with Serology and Xenodiagnosis.** J Clin Microbiol 1993;31(9):2421-6.
- 35.
36. Zavala, C.J.E., Gutierrez, F.H., Barrera, P.M.A., Bolio, S.A.J and Zavala, V.J.E. **Cardiopatía Chagásica Crónica detectada en pacientes del Hospital General Regional O'Horan, Merida, Yucatan, México.** Arch Inst Cardiol Mex 1992;65(6):541-45.
37. OMS. 1991. **Control de la Enfermedad de Chagas.** Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Serie Informes Técnicos No. 811. Ginebra 101 págs
38. Strout, R.G. **a Method for Concentrating Hemoflagellate.** J Parasitol 1962;48:100.
39. Feilij, H., Muller, L. González, C.S. **Direct Micromethod for Diagnosis of Acute and Congenital Chagas' Disease.** J Clin Microbiol 1983;7:241-44
40. Wyler, D.J. **Modern Parasite Biology.** Freeman. New York 1990 64-78

41. Avila, H.A., Borges, P.J., Thiemann, O., De Paiva, E., Degrave, W., Morel, C.M., Simpson, L. **Detection of Trypanosoma cruzi in Blood Specimens of Chronic Chagasic Patients by Polymerase Chain Reaction Amplification of Kinetoplast Minicircle DNA: comparison with Serology and Xenodiagnosis.** J Clin Microbiol 1993;31:2421-6.
42. Bronffen, E., De Assis, R.F., Brandao, G., Machado, N., Perillo, M.M., Romanha, A.J., Chiari, E. **Aisolamento de Amostras do Trypanosoma cruzi por Xenodiagnostico e Hemocultura de Paciente na Fase Cronica da Doenca de Chagas.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84:237-240.
43. Chiari, E., Dias, D.J., Lana, M., Chiari, C.A. **Hemocultures for the Parasitological Diagnosis of Human Chronic Chagas' Disease.** Rev Soc Bras Med Trop 1989;22:19-28
44. Luz, Z.M., Coutinho, M.C., Cancado, R., Krettli, A.U. **Hemocultura: Técnica Sensível na Detecção do Trypanosoma cruzi em Pacientes Chagásicos na Fase Crônica da Doença de Chagas.** Rev Soc Bras Med Trop 1994;27:143-8.
45. Avila, H.A., Borges, P. J., Thiemann, O., De Pavia, E., Degrave, W., Morel, C.M., Simpson, L. **Detection of Trypanosoma cruzi in Blood Specimens of Chronic Chagasic Patients by Polymerase Chain Reaction Amplification of Kinetoplast Minicircle DNA: Comparison with Serology and Xenodiagnosis.** J Clin Microbiol 1993;31:2421-26.
46. Camargo, M.E., Segura, E.E., Kagan, I.G., Souza, J.M., Cavalheiro, J.R., Yanovsky, J.F., Guimaraes, C.S. **Three Years of Collaboration on the Standardization of Chagas' Disease Serodiagnosis in the Americas: An Appraisal.** Pan Am Health Org Bull 1986;20:233-44
47. Zicker, F., Smith, P.G., Luquetti, A.U., Olivera, S.O. **Mass Screening for Trypanosoma cruzi Infections Using the Immunofluorescence, ELISA, and**

Hemagglutination Test on Serum Samples and Blood Evaluates fromm Filter-Paper. Bull WHO. 1990;68:465-77.

48. Castilla, M., Santos, G.M., Guzman, B.C., Bautista, G.R. **A New Method for Diagnosis of Chagas' Disease: Diffusion-In-Gel-Enzima-Linked-Immunoabsorbent-Assay.** J Parasitol 1988;74:805-9.

49. Monteón, V., Sosa, T., Reyes, P. A. **Serological Test for American Trypanosomiasis . A comparative Study.** Rev Latinoam Microbiol 1993;31:35-8.

50. Peralta, J.M., Teixeira, M.M., Shreffler, W.G., Pereira, J.B., Burns, J.M., Sleath, P.R., Read, S.G. **Serodiagnosis of Chagas' Disease by Enzime-Linked-Immunsorbent Assay Using Two Sintetic Peptides as Antigens** J Clin Microbiol 1994;32:971-4.

51. Affranchino, J., Ibañes, C., Luquette, A., et al. **Identificatioonof a Trypanosoma cruzi antigen that is shed during the acute phase of Chagas disease.** Mol Biochem Parasitol 1989;34:221-8.

52. Degrave, W., Thiemann, O., Avila, H., Borges, J., Morel, C and Simpson, I. **Molecular Probes and PCR in the Diagnosis of Chagas' Disease** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991;86:71-72

53. Zicker, F., Smith, P.G., Luquetti, A.U., Olivera, S.O. **Mass Screening for Trypanosoma cruzi Infections Using the Immunofluorescence, ELISA, and Hemagglutination Test on Serum Samples and Blood Evaluates from Filter-Paper.** Bull WHO 1990;68:465-77

54. Malchiodi, L.E., Chiaramonte, M.G., Taranti, N.J., Zwirner, N.W., Margni, R.A. **Cross-reactivity Studies and Diferential Serodiagnosis of Human Infections Caused by Trypanosoma cruzi and Leishmania spp.; use of Immunoblotting and ELISA with a Purified Antigen (Ag 163B6).** Clin Exp Immunol 1994;97:413-23.

55. Valdespino, J.L., Velasco, C.O., Escobar, G.A., Del Rio, Z.A., Ibañez, B S Magos, C. **Enfermedades Tropicales en México. Diagnóstico, Tratamiento y Distribución Geográfica** INDRE, 1994;381 pags

56. Reyes, P. **Enfermedad de Chagas en México.** Arch Inst Cardiol Méx 1984;54:1-2.
57. Dias, P.J. **Chagas' Disease.** Parasitol Today 1987;3:336-47.
58. Bronffen, E., De Assis, R.F., Brandao, G., Machado, N., Perillo, M.M., Romanha, A.J., Chiari, E. **Aisolamento de Amostras do *Trypanosoma cruzi* por Xenodiagnostico e Hemocultura de Paciente na Fase Cronica da Doença de Chagas.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84:237-40.
59. Miles, M.A., Póvoa, M.M., Prata, A., Cedillos, R.A., De Souza, A.A. y Macedo, V. **Do Radically Dissimilar *Trypanosoma cruzi* Strains (Zimodemes) Cause Venezuelan and Brazilian Forms of Chagas' Disease** The Lancet 1981;1338-40.
60. Luquetti, A.O., Miles, M.A., De Rezende, J.M., De Souza, A.A., Póvoa, M.M. y Rodrigues, J. ***Trypanosoma cruzi* Zymodemes Associated with Acute and Cronical Chagas' Disease in Central Brazil** Trans R Soc Trop Med Hyg 1986;80:462-70.
61. Dvorak, J.A. **The Natural Heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: Biological and Medical Implications.** J Cell Biochem 1984;24:357-71
62. Zavala, C.J., Velasco, C.O. y Hernández, R. **Molecular Characterization of Mexican Stocks of *Trypanosoma cruzi* Using Total DNA.** Am J Trop Med Hyg 1992;47:201-9
63. Galván, S.G., Rubio, J., Sánchez, R., Ortega, J y Castañeda, M. **Phenetic Variation in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* isolates** Comp Biochem Physiol 1983;74B:573-78.
64. Miles, M.A., Lanham, S., De Souza, A. y Póvoa, M. **Further Enzymic Characters of *Trypanosoma cruzi* and their Evaluation for Strain Identification.** Trans R Soc Trop Med Hyg 1980;74:221-37.
65. Bogliolo, A. y Godfrey, D. **Isoenzyme Changes During the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*.** Trans R Soc Trop Med Hyg 1987;81 222-9.

66. Miles, M.A. **Isoenzyme Characterization**. Rev Soc Brasil Med Trop 1985;18(Suplemento):53-9.
67. Chiari, E., Dias, D.J., Lana, M. y Chiari, C.A. **Hemocultures for the Parasitological Diagnosis of Human Chronic Chagas' Disease**. Rev Soc Bras Med Trop 1989;22:19-28.
68. Bollag, D.M., Edelstein, S.J. **Protein Methods**. Willey-Liss (Eds). 1ª De. New York. 1991;227.
69. Laemmli, U.K. **Cleavage of Structural Proteins Durin the Assembly of the Head of Bacteriophage T4**. Nature. 1970;270:680-5.
70. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. **Electrophoretic Transfer of Proteins from Poliacylamide Gels to Nitrocellulose Sheets**. Procedure and some applications. Proc Nat Acad Sci 1979;75:4350-4
71. Requena, J.M., López, M.C and Alonso, C. **Genomic Repetitive DNA Elements of *Trypanosoma cruzi***. Parasitology Today 1996;12(7):279-83
72. Solari, A., Muñoz, S., Venegas, J., Wallace, A., Aguilera, X., Brenière, S y Tibayrenc, M. **Characterization of Chilean, Bolivian and Argentinian *Trypanosoma cruzi* Populations by Restriction Endonuclease and Isoenzyme Analysis**. Exp Parasitol 1992;75:187-95.
73. Cheng, T.C. 1986. **General Parasitology**. Academic Press College. New York. 827
74. WHO. 1986. **Epidemiology and Control of African Trypanosomiasis** Report of a WHO Technical Report Series No. 811, Geneva.
75. Requena, J.M et al. **Complete nucleotide sequence of the hsp 70 gene of *T.cruzi***. Nucleic Acids Res 1989;17:797
76. Vazquez, M.P., Schijman, A G and Levin, M.J **A short Interspersed repetitive element provides a new 3' acceptor site for trans-splicing in certain ribosomal P2beta protein genes of *Trypanosoma cruzi***. Mol Biochem Parasitol 1994;64:327-36.



77. Tibayrenc, M. y Ayala, F.J. **Isoenzyme Variability in *Trypanosoma cruzi*, The Agent of Chagas' Disease: Genetical, Taxonomical and Epidemiological Significance.** Evolution. 1988;42:277-92
78. Requena, J.M. et. al. **Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification.** Mol Biochem Parasitol 1992;51:271-80.
79. Zavala, C.J., Velasco, C.O. y Hernández, R. **Molecular Characterization of Mexican Stocks of *Trypanosoma cruzi* Using Total DNA.** Am J Trop Med Hyg 1992;47:201-9.-
80. Requena, J.M., Soto, M. and Alonso, C. **Isolation of *Trypanosoma cruzi* specific nuclear repeated DNA sequences.** Biol Res 1993;26:11-8
81. Tibayrenc, M. y Le Ray, D. **General Clasification of the Isoenzymic Strains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and Comparison with T.(S.) *C Marinkellei*, T. (*Herpetosoma*) *Rangelli* and *Leishmania sp.*** Ann Soc Belge Méd Trop 1984;64:239-48.

APÉNDICE I

Medio de cultivo LIT (Liver Infusion Tryptosa) para *Trypanosoma cruzi*

Composición:

- Cloruro de Potasio (KCl) 0.4g
- Cloruro de Sodio (NaCl) 4.0g
- Fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄) 8.0g
- Glucosa 2.0g
- Tryptosa (DIFCO, núm de cat. 0124-01-0) 5.0g
- Infusión de Caldo de Hígado (DIFCO, núm. cat. 0269-17-7) 5.0g
- Hemina (SIGMA, núm. cat. H-2250) 25.0mg
- Suero Fetal de Bovino (GIBCO, núm. cat. 200-614AJ) 100mL
- Se pesan 0.25g de Hemina y se disuelven en 5mL de trietanol amina (SIGMA núm. cat. T-1377).

Preparación:

Con excepción de la hemina y el SFB, todos los componentes se disolvieron en agua bidestilada, ajustándose a un pH de 7.2, esterilizando en autoclave a 120°C con una presión de 1 atmósfera durante 20 minutos. Posteriormente se sometió a una prueba de esterilidad, dejándose a temperatura ambiente durante tres días y en completa oscuridad, finalizando ese período el medio se complementó con hemina, tomando 50µL por cada 100mL de medio (quedando a una concentración de 25µg de hemina/mL) y con el SFB al 10% inactivado. Antes de usarse, se realizó la prueba de esterilidad anteriormente señalada.

APENDICE II

Protocolo de electroforesis en condiciones reductoras

Los análisis electroforéticos de los antígenos correspondientes a los cuatro aislados de *T.cruzi*, se realizaron en una cámara Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad).

Preparación de los geles:

1. Gel separador al 12%

Acrilamida al 30%-bisacrilamida al 0.8% 1.66 mL

4X Tris-HCl pH 8.8 1.25 mL

Agua bidestilada 2.08 mL

Desgasificar la solución al vacío con agitación continua, durante 15 minutos antes de agregar los siguientes reactivos:

Persulfato de Amonio al 10% 0.016 mL

TEMED 0.003 mL

Agregar la solución entre los cristales de la cámara y esperar a que polimerice

2. Gel concentrador al 5%

Acrilamida al 30%-Bisacrilamida al 0.8% 0.27 mL

4X Tris-HCl pH 6.8 0.417 mL

Agua bidestilada 1.017 mL

Desgasificar al vacío en agitación continua durante 15 minutos y posteriormente agregar los siguientes reactivos:

Persulfato de Amonio al 10% 0.008 mL

TEMED 0.002 mL

Agregar la solución sobre el gel separador colocando inmediatamente y con cuidado de no hacer burbujas un peine con las separaciones necesarias del número de muestras que se desea analizar.

Muestra de análisis:

La muestra que se desea analizar debe prepararse en una dilución 1:4 con un amortiguador preparado en las siguientes condiciones:

Tris-HCl pH 6.8	0.5 M
SDS	2%
Azul de bromofenol	1%
Glicerol	20%
2-β-mercaptoetanol	2%

La muestra diluida se hierve durante 5 minutos para desnaturalizar el contenido de proteínas y despues de hervirse se agrega en el gel concentrador

Condiciones de corrida:

La separación de proteínas por electroforesis se realiza a 200 Volts durante 45 minutos aproximadamente usando un amortiguador de corrida preparado en las siguientes condiciones.

Tris-HCl	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.1%

APÉNDICE III

Protocolo de Técnica de Inmunotransferencia

Para realizar la técnica de Inmunotransferencia se usó la cámara Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad. Para realizar el inmunoblot previamente se realiza un gel de electroforesis como previamente se explicó en el apéndice II. El gel se remoja junto con un par de esponjas, un par de papel filtro y papel de nitrocelulosa (Schuell and Schleier No. cat. 401396) durante 10 minutos en un amortiguador para transferencia*

*Amortiguador de transferencia

Trisma-basé	25mM
Glicina	192mM
Metanol	20% a pH 8.3

Pasado este tiempo se procede a colocar dentro de un cassette en forma de emparedado un papel filtro una esponja, el gel, el papel de nitrocelulosa y nuevamente un papel filtro y una esponja colocándolos con mucho cuidado evitando que se formen burbujas que impidan el paso de las proteínas hacia el papel de nitrocelulosa. El cassette se coloca dentro de la cámara junto con una unidad de enfriamiento congelada dejándola transferir durante una hora a 100 volts. Transcurrido ese tiempo se corta una tira de papel transferido y se tiñe con colorante negro amido** para comprobar que la transferencia fue bien realizada lavándolo con una solución desteñidora***

**Colorante de Negro Amido

Colorante Negro Amido	0.1%
Isopropanol	25%
Acido acético	10%

***Solución desteñidora

Isopropanol	25%
Acido acético	10%

APÉNDICE IV

Preparación de Soluciones

Para preparar las soluciones siempre se usó agua milliQ.

*Fosfato bufferado salino PBS pH 7.2

Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.36g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	1.10g
Cloruro de sodio (NaCl)	8.77g
Disolver en agua destilada, ajustar el pH a 7.2 y aforar a 1Lt	

*Fosfato bufferado salino plus PBST 0.05% (V/V) Tween 20

Tween 20	0.20mL
PBS	400mL

*Amortiguador de Lisis para Trypanosomas.

Nonidet P-40 1%	0.1mL
Cloruro de Sodio NaCl 150mM, stock 5M	1.5mL
Tris-HCl 10mM pH 7.6, stock 1M	0.1mL
PMSF 100mM, stock 1M	0.1mL
EDTA 2mM, stock 0.5M	0.044 μL
Aprotinina	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Pepstatina	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Leupeptina	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Mezclar suavemente sobre el buffer Tris-HCl todas las soluciones. Llevar a un volumen final de 10 mL con agua milliQ

APÉNDICE IV

Preparación de Soluciones

Para preparar las soluciones siempre se usó agua milliQ.

*Fosfato bufferado salino PBS pH 7.2

Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.36g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	1.10g
Cloruro de sodio (NaCl)	8.77g
Disolver en agua destilada, ajustar el pH a 7.2 y aforar a 1Lt	

*Fosfato bufferado salino plus PBST 0.05% (V/V) Tween 20

Tween 20	0.20mL
PBS	400mL

*Amortiguador de Lisis para Trypanosomas.

Nonidet P-40 1%	0.1mL
Cloruro de Sodio NaCl 150mM, stock 5M	1.5mL
Tris-HCl 10mM pH 7.6, stock 1M	0.1mL
PMSF 100mM, stock 1M	0.1mL
EDTA 2mM, stock 0.5M	0.044 μ L
Aprotinina	1 μ g/mL
Pepstatina	1 μ g/mL
Leupeptina	1 μ g/mL

Mezclar suavemente sobre el buffer Tris-HCl todas las soluciones. Llevar a un volumen final de 10 mL con agua milliQ.

***Solución bloqueadora patrón PBST con BSA 5%**

PBST	100mL
Albumina Serica Bovina	5g

***Buffer Citrato-Fosfato pH 5.0**

Acido Citrico $C_6H_8O_7H_2O$	0.1M
Fosfato de Sodio dibásico Na_2HPO_4	0.2M

Medir el pH de la solución de fosfato de sodio 0.2M y ajustar a pH 5 con ácido citrico 0.1M.

***Solución reveladora**

Solución reguladora de citratos	10 mL
o-Fenilendiamina	0.020g
H_2O_2	15 μ L
Aforar a 50 mL con agua milliQ	

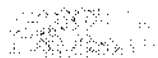
***Solución stop H_2SO_4 4N**

Acido sulfurico H_2SO_4	10.11 mL
Agua milliQ	39.89 mL

***Solución de tratamiento de muestra**

Tris-HCl 0.5M, pH 6.8	1mL
Glicerol	0.8mL
SDS 10%	1.6mL
2- β -mercaptoetanol 10%	0.4mL
Azul de Bromofenol 0.05%	0.2mL
H_2O milliQ	4mL

Diluir la muestra 1:4 con la solución y calentar a 95°C por 4 minutos



***Solución de Acrilamida bis-acrilamida**

Acrilamida 30%	58.4g
Bis 2.7%	1.6g
H ₂ O milliQ	200mL

Filtrar y almacenar a 4°C en la oscuridad.

***Solución reguladora Lower pH 8.8**

Tris-HCl	27.23g
H ₂ O milliQ	150 mL

Tomar el pH a 8.8. Almacenar a 4°C.

***Solución reguladora Upper pH 6.8**

Tris-Base	6g
H ₂ O milliQ	100mL

Tomar el pH 6.8. Almacenar a 4°C

***Persulfato de Amonio 10%**

Persulfato de Amonio anhidro	0.1g
H ₂ O milliQ	1mL

***Solución de corrimiento electroforético 5X, pH 8.3**

Glicina	43.2g
Tris-base	9.0g
SDS	3.0g
H ₂ O milliQ	600mL

Almacenar a 4°C. Antes de usar calentar a 37°C, si ocurre precipitación

Diluir 60 mL de patrón con 240mL de agua para un corrimiento electroforético

***Solución reguladora Tris-base 25mM, pH 8.3**

Tris-base 25mM	3.94g
H ₂ O milliQ	1 Lt.
Ajustar el pH a 8.3 y completar a un litro.	

***Solución de Transferencia Towin.**

Tris-base 25mM	3.94g
Glicina 192mM	14.4g
Metanol absoluto	200mL
H ₂ O milliQ	cbp 1Lt.

***Solución reveladora de sustrato 4-Cloro-1-Naftol. 4CN**

PBS	42mL
4CN	8.3mL
H ₂ O ₂ 3%	16.6μL
Proteger de la luz. Preparar justo antes de usarla.	

***Solución patrón de 4CN.**

4CN	30mg
Metanol	10mL

***Solución de lisis celular.**

Cloruro de Sodio NaCl 0.15M	0.87g
Etilendiaminotetracético EDTA 0.1M	3.72g
Proteinasa K 1mg/mL	25μL
SDS10%	70μL
Para un volumen de 600μL	

*Fenol

Se realiza bajo campana de extracción. Solubilizar el fenol (MERCK) calentando la botella a 65°C; agregar Tris 500 mM, pH 8 a saturación, agitar 15 minutos y dejar decantar. Cuando se forman dos fases y se retira el sobrenadante y se satura nuevamente el fenol con Tris 100mM pH 8, hasta que el pH de la fase fenólica sea igual a 7.6. Se agrega 0.1 volumen de amortiguador TE pH 8 en 1 volumen de fenol y 8-hidroxiquinoleína al 0.1% del volumen final, mezclar y añadir β-mercaptoetanol al 0.2% del volumen final. Dejar reposar una noche a 4°C. Conservar en refrigeración y oscuridad.

*Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamilico

Fenol C ₆ H ₅ OH	25mL
Cloroformo CHCl ₃	24mL
Alcohol Isoamilico C ₅ H ₁₂ O	1mL

*Cloroformo-alcohol isoamilico

Cloroformo CHCl ₃	24mL
Alcohol isoamilico C ₅ H ₁₂ O	1mL

*Acetato de Sodio 3M

Acetato de sodio C ₂ H ₃ NaO ₂ .H ₂ O	40.82g
H ₂ O milliQ	100mL

*Solución reguladora TE

Tris-HCl 10mM, pH 7.5	1.57g
EDTA 1mM	0.33g
H ₂ O milliQ	1 lT

***Solución de RNAsa 1mg/mL**

Tris-HCl 10 mM, pH 7.5	100 μ L
NaCl 15mM	30 μ L
Ribonucleasa tipo 1-A	20mg
H ₂ O inyectable	10mL

Hervir la mezcla de reacción 15 minutos para inactivar DNAsas. Alicuotar a -20°C

***Solución reguladora 10X Tris-HCl 10mM, pH 8.3, KCl 50mM**

Tris-HCl 10mM	0.157g
KCl 50mM	0.037g
H ₂ O milliQ	10mL

***Taq DNA polimerasa 2.5U/100 μ L**

Taq DNA polimerasa	0.5 μ L
--------------------	-------------

***Deoxinucleotidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)**

De cada uno de los deoxinucleotidos	1 μ g/ μ L
-------------------------------------	--------------------

***Cloruro de Magnesio 25 mM**

MgCl ₂	0.023g
H ₂ O destilada	10mL

***Jugo azul 6X**

Xilencianol	25mg
Azul de bromofenol	25mg
Glicerol	3mL
H ₂ O milliQ	10mL

***Bromuro de etidio**

Bromuro de etidio	1mg
H ₂ O milliQ	1mL

***Solución reguladora Tris-Acetato TAE 50X**

Tris-base	242g
Acido acético glacial	57.1mL
EDTA 0.5 M pH 8	100mL
Llevar a pH 8. Aforar a 1Lt.	