



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO PROFESIONAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**



**ENSAYO DE BANDAS PROTEICAS NO GLICOSILADAS DE ESTADIOS
DE *Trypanosoma cruzi* PARA DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE
CHAGAS.**

Autor: Br. María F. Rodríguez D.

C.I.: V-20.513.980

Tutor: Dr. Víctor T. Contreras A.

Co-Tutor: Lcda. Diana I. Graterol R.

Asesor Metodológico: Dra. Emilia E. Barrios

Valencia, Diciembre de 2.013

CONSTANCIA DE CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Por medio de la presente certificamos que hemos tenido conocimiento y asesoramos el Trabajo de Investigación titulado “**Ensayo de bandas proteicas no glicosiladas de estadios de *Trypanosoma cruzi* para diagnóstico de la enfermedad de Chagas**”, desde su inicio hasta su culminación. El mismo fue realizado por la Bachiller: **Rodríguez Dib María Fernanda C.I.: 20.513.980**. Consideramos que el presente estudio reúne todos los requisitos suficientes para ser sometido a evaluación.



Dr. Víctor T. Contreras A.

C.I.: V-4.323.708



Lcda. Diana I. Graterol R.

C.I.: V-14.999.305



ACTA DE EVALUACIÓN

Quienes suscriben, miembros del Jurado designado por la Coordinación de la Asignatura Trabajo de Investigación, para evaluar el trabajo titulado: **“ENSAYO DE BANDAS PROTEICAS NO GLICOSILADAS DE ESTADIOS DE *Trypanosoma cruzi* PARA DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS”**, presentado por la estudiante: **Rodríguez María Fernanda**, titular de la Cédula de Identidad No. V-20.513.980; y tutorado por el **Prof. Víctor Contreras** y la **Licda. Diana Graterol**, titulares de las Cédulas de Identidad No. V-4.323.708 y V-14.999305, respectivamente. Hacemos de su conocimiento que hemos actuado como jurado evaluador del informe escrito, presentación y defensa del citado trabajo. Consideramos que reúne los requisitos de mérito para su **APROBACIÓN**.

En fe de lo cual se levanta esta Acta, en Valencia a los 10 días del mes de diciembre del año dos trece.

Prof. Emilia E. Barrios
C.I: 9.636.868
Jurado Principal

Prof. Ana Rita De Lima
C.I: 7.093.018
Jurado Principal

Prof. Elisa Martínez
C.I: 11.526.026
Jurado Principal



DEDICATORIA

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Dios

Papá y Mamá

María Fernanda Rodríguez Dib

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios por haberme permitido vivir hasta este día, haberme guiado a lo largo de mi vida, por ser mi apoyo, mi luz y mi camino. Por haberme dado la fortaleza para seguir adelante en los momentos más fuertes de mi vida, donde mi compañera decidió retirarse de la tesis y dejarme, momentos de debilidad.

Le doy gracias a mis Padres Marisol y Rubén por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por haberme dado educación en el transcurso de mi vida.

A mi hermana Rosa por ser un ejemplo de desarrollo profesional a seguir.

A Nelson un gran amigo por su apoyo incondicional y su ayuda financiera, por ser mi paño de lágrimas cada vez que algo no me salía como esperaba y por soportarme.

A mi Tío Abraham por brindarme ayuda económica y palabras de fortaleza.

Le agradezco de todo corazón la confianza, tiempo y dedicación de mi cotutora Diana Graterol, además de ser mi cotutora es una amiga y un apoyo en todo lo largo de la tesis, también fue como una hermana, que en momentos me regañó pero todo para mi bien y no hay palabras para describir que en momentos más tensos estuvo allí y lo que significa para mí, dejó huellas imborrables en mi corazón y la voy a extrañar.

Le agradezco a mi tutor Víctor Contreras por creer en mí y haberme dado la oportunidad de desarrollar la tesis profesional en BioMolP, porque

me abrió las puertas, me facilitó todo el material y el lugar para realizar la tesis y fue un apoyo incondicional porque su tiempo también me lo dedicó.

Agradezco a mi asesora por su apoyo, por su amistad, porque pude tomarle mucho aprecio y siempre estaba dispuesta a ayudarme en todo lo que necesité.

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; Investigaciones Menores 021-2013; 011-2011; 180-2011; 0394-2010, 0461-2010; Equipamiento Institucional 2005-012.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
Objetivo General	5
Objetivos Específicos	5
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Tipo y Diseño de Investigación	7
Parásitos y Estadios	7
Análisis de los datos	16
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁG.
1	Análisis mediante SDS-PAGE (7-15%) de las proteínas de diferentes estadios del clon EPM ₆ de <i>Trypanosoma cruzi</i> teñidas con una técnica combinada Coomassie Blue-Plata.	29
2	Análisis mediante SDS-PAGE (7-15%) de las glicoproteínas de diferentes estadios del clon EPM ₆ de <i>Trypanosoma cruzi</i> teñidas con una técnica combinada de Ácido Periódico, Alcian Blue, Glutaraldehido, Plata (APABGP).	30
3	Análisis mediante Inmunobloting en SDS-PAGE (7-15%) de los perfiles antigénicos de diferentes estadios del clon EPM ₆ de <i>Trypanosoma cruzi</i> antes y después del tratamiento con metaperiodato, revelados con pool de sueros de pacientes chagásicos crónicos.	31
4	Análisis mediante Inmunobloting en SDS-PAGE (7-15%) de los perfiles antigénicos de diferentes estadios del clon EPM ₆ de <i>Trypanosoma cruzi</i> antes y después del tratamiento con metaperiodato, revelados con suero de paciente chagásico crónico.	32
5	Análisis mediante SDS-PAGE (10%) de las bandas glicoproteicas de diferentes estadios del clon EPM ₆ de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtenidas por lisis en presencia de urea y separadas por electroelución teñidas con una técnica combinada de Ácido Periódico, Alcian Blue, Glutaraldehido, Plata (APABGP).	33

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁG.
6	Análisis mediante Inmunoblotting en SDS-PAGE (10%) de las bandas antigénicas separadas por electroelución de diferentes estadios del clon EPM ₆ de <i>Trypanosoma cruzi</i> antes y después del tratamiento con metaperiodato, revelados con suero de paciente chagásico crónico.	34
7	Análisis mediante Inmunoblotting en SDS-PAGE (10%) de las bandas antigénicas separadas por electroelución de diferentes estadios del clon EPM ₆ de <i>Trypanosoma cruzi</i> antes y después del tratamiento con metaperiodato, revelados con suero pool de pacientes chagásicos crónicos.	35
8	Análisis mediante Inmunoblotting en SDS-PAGE (10%) de las bandas antigénicas separadas por electroelución de diferentes estadios del clon EPM ₆ de <i>Trypanosoma cruzi</i> antes y después del tratamiento con metaperiodato, revelados con suero anti-TEMA de conejo.	36

RESUMEN

ENSAYO DE BANDAS PROTEICAS NO GLICOSILADAS DE ESTADIOS DE *Trypanosoma cruzi* PARA DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

(*Assay unglycosylated protein bands of stages of Trypanosoma cruzi for diagnosis of disease Chagas*).

Autor: Rodríguez Dib María Fernanda.

Tutores: Dr. Víctor Contreras A. y Lcda. Diana Graterol R.

Asesora: Dra. Emilia E. Barrios.

Institución: Laboratorio de Protozoología. Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo.

Los estadios epimastigotas, metacíclicos, tripomastigotas y amastigotas de *T. cruzi* obtenidos axénicamente presentan perfiles proteicos y glicoproteicos diferentes. Se evaluó el uso de bandas proteicas no glicosiladas procedentes de los cuatro estadios de *T. cruzi* cepa EPM₆ mediante Inmunoblotting usando sueros de pacientes chagásicos. Se demostró que cada estadio representa una oferta antigénica distinta y es reconocido diferencialmente tanto por el suero pool como el individual. La oxidación de los epitopes glicosilados de los estadios modifica la oferta antigénica. No obstante, se evidenció la existencia de un antígeno de 60 kDa, que fue revelado en los cuatro estadios por ambos sueros antes y después del tratamiento con periodato y cuya masa molecular coincide con una proteína no glicosilada de 60 kDa. Además, el suero individual reveló cinco bandas (85, 67, 65, 62 y 30 kDa) sugestivas de análisis por presentar cambios después del tratamiento. La intensidad de esas bandas varió al revelarlas con el suero pool y el individual antes y después de oxidación; pero, usando un suero anti-TEMA solo confirmó la presencia de las bandas de 67/65 kDa en los cuatro estadios, la de 62/60 kDa en los amastigotas y tripomastigotas y la de 30 kDa en los metacíclicos. No se puede excluir factores metodológicos que expliquen la dificultad en el análisis. Es evidente que la búsqueda de un antígeno no glicosilado que pueda ser usado en otras técnicas diagnósticas implica todavía solventar limitaciones tecnológicas que surgen al estudiar los anticuerpos elicitados en las infecciones crónicas de pacientes chagásicos.

Palabras Clave: *Trypanosoma cruzi*, Bandas proteicas no Glicosiladas, enfermedad de Chagas.

Financiamiento: FONACIT S1-2001000683; CDCH-UC FCS: Proyectos 2003-005; 2006-006; 00212-07; 2010-001; Investigaciones Menores 021-2013; 011-2011; 180-2011; 0394-2010, 0461-2010; Equipamiento Institucional 2005-012.

INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis Americana, también conocida como enfermedad de Chagas, es una condición patológica causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y es transmitida vía vectorial por insectos hemípteros hematófagos de la subfamilia *Triatominae* conocidos como triatmino o chipo (1). La enfermedad es proveniente del Continente Americano, donde existe un aproximado de 18 a 20 millones de personas infectadas, y cerca de 100 millones en riesgo de infección, ocupando el cuarto lugar de importancia como causa de discapacidad, especialmente en la población rural de América latina (2). Es una de las parasitosis más importantes en el hombre, tanto por su prevalencia como por la gravedad de su cuadro clínico.

En la actualidad, el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) reporta una incidencia y prevalencia de esta infección en la población venezolana del 4% y 13% respectivamente (3). Datos epidemiológicos y parasitológicos han demostrado que en Venezuela se encuentran focos endémicos de la enfermedad sobretodo en el Sector Las Cuevas del Estado Carabobo (4) y más recientemente los casos detectados en el Municipio Chacao para el año 2010 (5).

El *T. cruzi* es un protozoo flagelado, perteneciente al orden *Kinetoplastida*, caracterizado por presentar núcleo, flagelo y kinetoplasto único, de modo que prácticamente presenta un tipo morfológico distinto en cada una de las fases de su ciclo biológico. Sin embargo, además de esta variación morfológica y funcional del propio microorganismo, presenta unas variaciones de comportamiento a nivel poblacional que afectan de una manera directa al efecto que, como parásito, puede ejercer sobre sus hospedadores, incluyéndose entre éstos el hombre (6). A lo largo del ciclo vital *T. cruzi* muestra cuatro estadios dominantes los cuales difieren

morfológica, biológica e inmunológicamente. Esos estadios se identifican como formas amastigota (A) y tripomastigota (T) en el hospedador vertebrado; y formas epimastigota (E) y metacíclico (M) en los triatomíneos vectores (7). Cada estadio está constituido por proteínas y glicoproteínas comunes y específicas, funcionales o estructurales, muchas de ellas con actividad antigénica específica que tienen interés diagnóstico en la enfermedad de Chagas (8).

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas puede ser realizado a través de diferentes estrategias, de acuerdo con la fase en la que la enfermedad se encuentra. En la fase aguda de la infección, un gran número de parásitos circula en la corriente sanguínea y el diagnóstico puede ser obtenido a través de examen microscópico directo en la sangre periférica. Al contrario, en la fase crónica, los niveles de parasitemia se encuentran por debajo de los límites de detección por microscopía y, de esta forma, el diagnóstico se basa, especialmente, en la detección de la respuesta serológica del hospedador o en la amplificación *in vitro* de la población de parásitos, a través de los métodos indirectos de demostración del parásito como el xenodiagnóstico o hemocultivo (9).

Para el diagnóstico, se utilizan rutinariamente lisados totales de parásitos de cultivo, de forma tal que a los sueros a analizar se le ofertan antígenos proteicos y glicoproteicos. Sin embargo, la mayoría de las proteínas de superficie son de naturaleza glicoproteica y varios trabajos han reportado glicoproteínas con actividad antigénica y algunas de ellas se han usado con fines diagnósticos para la enfermedad de Chagas (10, 11). Aun más, se ha empleado residuos glicosilados de antígenos de epimastigotas de *T. cruzi* para ensayos diagnóstico evidenciando su utilidad. Contreras *et al* en 1999 (12) optimizaron el uso de los residuos glicosilados de epimastigotas de *T. cruzi* para discriminar fases de la enfermedad de Chagas encontrando en el análisis inmunológico realizado, perfiles antigénicos similares en

Inmunoblotting correlacionados a la fase de la enfermedad mientras que los títulos de ELISA fueron variables y sin relación con la fase de la enfermedad.

De Lima *et al* en 2001 (13) obtuvieron fracciones glicosiladas de *T. cruzi* y evaluaron su utilidad en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Se estudió mediante ELISA, la capacidad discriminativa de las fracciones glicosídicas de los diferentes estadios para sueros de pacientes chagásicos y no chagásicos, encontrando que, existen polipéptidos, glicopéptidos y fracciones glicosídicas comunes y específicos de estadio y que las fracciones glicosídicas sirven como antígenos para discriminar mediante ELISA pacientes Chagásicos.

A pesar de que se han reportado glicoproteínas con actividad antigénica y algunas de ellas se han usado con fines diagnósticos existen evidencias de que el diagnóstico empleando fracciones glicoproteicas está influenciado, en primer lugar, pues la oferta antigénica puede variar en los diferentes estadios del ciclo evolutivo del parásito como demostró De Lima *et al* en 1996 (14) que los tripomastigotas sobrenadantes de células y amastigotas tienen mayor proporción de glicoproteínas que los epimastigotas y tripomastigotas metacíclicos. En segundo lugar, por lo demostrado por Araque *et al* en 1996 (15) que el mantenimiento en cultivo por largo tiempo altera las capacidades biológicas de cada uno de los estadios lo cual modifica los perfiles glicoproteicos intra-estadio. Y finalmente, en algunas glicoproteínas de superficie útiles como antígenos para el diagnóstico de la enfermedad, hay evidencias indicando que esos epítopes glicosilados están implicados en los anticuerpos de reacción cruzada como demostrado por Xu *et al* en 1991 (16).

Existen más de 30 técnicas para diagnosticar la enfermedad de Chagas de fundamento antigénico, bioquímico y genética molecular (17), lo que indica que se dispone de un arsenal tecnológico para abordar el problema diagnóstico. Sin

embargo, la especificidad de cualquier técnica diagnóstica, depende de la calidad del antígeno empleado, de allí que la optimización de una técnica que utilice antígenos fraccionados debe seleccionar aquellos que garanticen ser reconocidos por el mayor número de anticuerpos presentes en el paciente infectado.

Sería de gran utilidad disponer de un antígeno de bajo costo de producción y que permita diagnosticar con alta eficiencia. Una nueva aproximación al problema podría ser fundamentar la realización del diagnóstico de la enfermedad revelando aquellos anticuerpos del suero del paciente Chagásico que estén dirigidos contra la región peptídica de los antígenos. Esto en teoría, reduciría la variabilidad implícita en la fracción glicosilada lo que justifica buscar entre las fracciones electro-eluidas de los cuatro estadios algún péptido o proteína común sin región glicosilada y con alta antigenicidad para explorar su utilidad diagnóstica. Integrando con esta búsqueda, tres hechos demostrados que son: (a) reducción de la variabilidad implícita en la fracción glicosilada, (b) antígenos conservados evolutivamente son de utilidad diagnóstica y (c) la respuesta inmune varía según fase de la enfermedad (18).

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la intensidad de reconocimiento de bandas proteicas no glicosiladas purificadas por electroelución, procedentes de los cuatro estadios dominantes de *Trypanosoma cruzi* (Epimastigotas, Metacíclicos, Tripomastigotas y Amastigotas) mediante Inmunoblot usando sueros de pacientes chagásicos crónicos.

Objetivos Específicos

- 1.- Caracterizar mediante electroforesis desnaturante los perfiles proteicos y glicoproteicos totales de los estadios epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, tripomastigotas tipo hemáticos y amastigotas extracelulares primarios cepa EPM₆ de *T. cruzi* producidos en condiciones axénicas y suministrados por el laboratorio, usando coloraciones específicas.
- 2.- Identificar en los perfiles antigénicos de los cuatro estadios tratados y no tratados con Meta-periodato, bandas reactivas no glicosiladas reveladas mediante Inmunoblot con pool de sueros chagásicos crónicos.
- 3.- Seleccionar al menos 2 bandas reactivas no glicosiladas identificadas por el pool de sueros chagásicos en los antígenos tratados y no tratados con Meta-periodato, a partir de un banco de bandas proteicas de los cuatro estadios fraccionadas por electroelución múltiple.

- 4.- Confirmar mediante electroforesis desnaturalante los perfiles proteicos no glicosilados de las bandas antigénicas seleccionadas de los cuatro estadios usando coloraciones específicas.
- 5.- Evidenciar intensidad de reconocimiento de las bandas antigénicas seleccionadas de los cuatro estadios tratados y no tratados con Meta-periodato mediante Inmunoblot con pool de sueros chagásicos crónicos.
- 6.- Discutir el uso potencial de esas bandas no glicosiladas como antígenos en otras técnicas útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo y Diseño de Investigación

La investigación fue de tipo experimental descriptiva y aplicada.

Parásitos y Estadios

Los parásitos usados en este estudio fueron obtenidos de la cepa Elpidio Padrón (EP) de *Trypanosoma cruzi*, aislada de un caso humano agudo de la enfermedad de Chagas por el Dr. Witremundo Torrealba el 26/08/1967 mediante hemocultivo y la cual fue clonada en 1976 por plaqueo en agar blando (17) según la técnica de Tanuri *et al* (19) mediante micro-manipulación en ratones albinos, obteniéndose el clon EPm₆. Este ha sido mantenido desde entonces y hasta la actualidad (2013) en el laboratorio mediante pases trimestrales alternos entre triatomino (*Rhodnius prolixus*) y ratón. En los experimentos se emplearon parásitos recientemente aislados de ratón con no más de tres meses en cultivo axénico.

Los estadios a utilizar fueron: epimastigotas de final de la fase de crecimiento exponencial en medio LIT-B (Liver Infusion Triptose) (20), tripomastigotas metacíclicos por inducción en medio TAU3AAG (orina artificial de triatomino suplementado con aminoácidos y glucosa) (21), tripomastigotas sobrenadantes de cultivo celulares (equivalentes a tripomastigotas tipo hemático) en medio MEM (medio esencial mínimo) (22, 23) y amastigotas extracelulares primarios por inducción en medio MEMTAU (24, 25). Todos los estadios fueron producidos en condiciones axénicas y concentrados en masa húmeda de parásitos.

Antígenos

Los antígenos que se emplearon en esta investigación corresponden a proteínas totales solubles de los diferentes estadios del clon EPM₆ obtenidas mediante lisis por sonicación en presencia de agentes caotrópicos (Urea) y detergentes (3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato, CHAPS), y por fracciones proteicas solubles separadas por electroelución múltiple, ambos purificados en el Laboratorio de Protozoología del Instituto BioMolP siguiendo protocolos estandarizados (26) y suministradas previamente.

Sueros

Se empleó un suero individual y un “pool” de 10 sueros de pacientes chagásicos crónicos clasificados clínicamente de la seroteca (Banco de Sueros) del Laboratorio de Protozoología del Instituto BioMolP. Los sueros proceden de pacientes clínicamente identificados, de títulos serológicos conocidos y clasificados como de fase crónica de la enfermedad de Chagas y criopreservados a -20 °C por diferentes tiempos. Para la preparación del suero “pool” de 1 mL de pacientes chagásicos se usó 100 µL de cada paciente individual.

Obtención de los antígenos totales de los diferentes estadios del clon EPM₆ de *Trypanosoma cruzi*

Los antígenos totales fueron obtenidos siguiendo protocolos estandarizados (26) mediante lisis por sonicación de los estadios epimastigota (E), metacíclico (M), amastigota (A) y tripomastigota (T) en presencia de Urea y CHAPS, usado para isoelectrofocalización (IEF) y suministrados por el Laboratorio de Protozoología. El protocolo consistió en resuspensión de cada una de las masas húmedas de parásitos en agua ultrapura en una relación de 55-300 mg masa/220-1000 µL de agua, en presencia de inhibidores de proteasas (10 µM trans-epoxi-succinil-L-leucilamido-(4-

guanidino)-butano (E-64) [Sigma, E-3132], 0,5 mM N α -p-tosil-L-cloro-lisina metil cetona (TLCK) [Sigma, T-7254], 0,5 mM N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) [Sigma, T-4376] y 25 mM Fenantrolina [Sigma, 131377]). Para la homogenización por sonicación, las suspensiones se mezclaron con tampón de IEF (5 M Urea, 2 M Thiourea, 2% CHAPS, 2% ASB14, 30 mM Tris/HCl pH 8,0) en una relación de 1 g masa/6000 μ L de tampón de lisis y se homogenizaron en baño de hielo con el disruptor de ultrasonido (Branson Sonifier, modelo 150) aplicando 4 pulsos (7 Watts de potencia) de 15 segundos con intervalos de 2 minutos y se observó en microscopio de contraste de fases 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 isotonzado a 150 mM NaCl, seguido de determinación de concentración de proteínas a 595 nm por reacción colorimétrica basada en el empleo del estuche comercial Coomassie® Plus-200 (Pierce 23238. Rockford, IL, U.S.A), siguiendo instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes se guardaron a -20 °C para uso posterior.

Separación electroforética de las fracciones proteicas y glicoproteicas en geles de poliacrilamida

El extracto proteico y glicoproteico obtenido de la lisis de los parásitos se analizó mediante la técnica de SDS-PAGE (27). Se realizaron geles en gradiente lineal de poliacrilamida (7-15%) en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS), con apilamiento de 4,5% y peine de 12 dientes. Las muestras fueron colocadas en tampón de muestra desnaturante (Tris/HCl 60 mM pH 6,8; 10% Glicerol, 0,1% Azul de Bromofenol, 3% SDS y 5% β -Mercaptoetanol) y se llevaron a ebullición por 3 min. Se colocó igual concentración de proteínas en cada uno de los canales (16 μ g para proteínas, 20 μ g para glicoproteínas y 4 μ g para los inmunobloting), incluyendo un canal con proteínas marcadoras de peso molecular conocido (225, 150, 100, 75, 50,

35, 25 y 15 kDa) (Promega V-8491. Madison, WI, USA). En el gel para el análisis de glicoproteínas se incluyó un canal adicional con marcadores de referencia para carbohidratos (dilución ¼ de 0,5 µg de Fetuína de suero fetal bovino [Sigma, F-2379], 1,5 µg de α1-ácida-glicoproteína [Sigma, G-9014] y 1,5 µg de Mucina de glándula sub-maxilar de buey [Sigma, M-3895]). La electroforesis se desarrolló a corriente constante (20 mAmp, 90 min para cada gel) y a 4 °C.

Luego de terminada la corrida electroforética, se desmontaron los geles, se fijaron y se realizaron las tinciones según la naturaleza de las muestras cargadas. El gel para el análisis de proteínas fue teñido según la técnica combinada de Coomassie-Plata (28) y el correspondiente a la identificación de glicoproteínas según la técnica combinada de Ácido Periódico-Alcian Blue-Glutaraldehído-Plata (APABGP) (29, 14). Terminada la coloración se procedió a secar el gel con el equipo Gel Drying Kit de Promega (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

Obtención de las bandas antigénicas individuales de los diferentes antígenos totales del clon EPM₆ de *Trypanosoma cruzi* por electroelución múltiple

Las bandas proteicas individuales purificadas de los diferentes antígenos totales fueron suministradas por el Laboratorio de Protozoología y se obtuvieron utilizando un equipo de electroelución múltiple (Whole Gel Eluter) de BioRAD, siguiendo el protocolo del fabricante, que brevemente consistió en: (a) separación de las proteínas (27) en gel preparativo por electroforesis en presencia de 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 por gel; (b) electroelución múltiple en 30 canales de la unidad de electroelución con tampón de electroelución (50 mM Tris, 25 mM Ácido Bórico),

aplicando una corriente constante (250 mAmp, 15 Watt y 300 Volts) por 30 min; (c) recolección de las bandas por aplicación de vacío 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 isotonzaron con NaCl 4M; (d) congelamiento de las fracciones proteicas a -20 °C para reducir el volumen (20 veces, 150 µL) usando un equipo de liofilización (Edwards Modulyo 4K) y determinación de concentración de proteínas de las fracciones por la técnica de Bradford (30) modificada siguiendo instrucciones del fabricante (e) eliminación de las sales del tampón de electroelución por precipitación de las fracciones proteicas con TCA/DOC/Acetona.

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 Tricloro Acético (TCA)/Deoxicolato de Sodio (DOC)/Acetona para concentrar proteínas muy diluidas (31). Para la técnica se usaron tubos Eppendorf de 500 µL adicionando 99,0 µL de muestra proteica (de 3 a 5 µg de proteína) y 1,0 µL 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 33,3 µL de TCA al 24% para una concentración final de 6%, se agitó con vórtex y se incubó en baño de hielo por 1 hora. Seguidamente se sedimentó a 14.000 xg, 10 min, 4 °C (Microcentrifuga Eppendorf) se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 200 µL de Acetona fría (-20 °C) y se incubó en hielo 15 min. Seguidamente se centrifugó en Eppendorf (14.000 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 la electroforesis.

Coloración de proteínas de los diferentes estadios del clon EPM₆ mediante la técnica combinada de Coomassie-Plata

Los polipéptidos separados fueron teñidos mediante la técnica de Coomassie-Plata como referido por De Moreno *et al* (28) en el que: (a) los polipéptidos se fijaron dentro del gel por incubación por al menos 1 hora a temperatura ambiente en solución acuosa de 50% Metanol y 10% de Ácido Acético, (b) la tinción se realizó durante 2 horas con 0,25% de Coomassie Blue G-250 (Serva Blue G-250, CI. 42655), 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 gel para embeberlo en plata por incubación en 5% Metanol - 10% Ácido Acético (15 min), Etanol al 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% durante 45 min y un lavado rápido con agua destilada durante 15 segundos, 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 coloración por incubación en solución acuosa de Ácido Acético al 1%. Durante todo el proceso de coloración cada gel se mantuvo en constante agitación suave con un agitador orbital.

Coloración de Glicoproteínas de los diferentes estadios del clon EPM₆ mediante la técnica combinada de Ácido Periódico, Alcian Blue, Glutaraldehído, Plata (APABGP)

La tinción de los geles para evidenciar la constitución de glicoproteínas o proteoglicanos de los polipéptidos separados de cada antígeno se realizó mediante la técnica combinada del Ácido Periódico, Alcian Blue, Glutaraldehído, Plata siguiendo el protocolo modificado de Moller y Poulsen y De Lima *et al* (29, 14). Brevemente consiste en teñir el gel en tres fases, la fase 1 a 30°C, la fase 2 a 50°C, ambas se realizaron en estufa (Precision Incubator Mod. 3EG) y la fase 3 a temperatura ambiente. En la Fase 1 se procedió a: (a) fijación del gel 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 gel 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 gel para la coloración 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 45 min 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 (2,5% Carbonato de Sodio, 0,013% Formaldehído) por tiempos variables hasta que se evidenciaron las bandas azucaradas oxidadas junto a la aparición de los marcadores, (d) detención de la coloración por incubación en solución acuosa de Ácido Acético al 10%. Durante todo el proceso de coloración cada gel se mantuvo en constante agitación suave con un agitador orbital.

Análisis de los perfiles antigénicos de los diferentes estadios del clon EPM₆ mediante electroinmunotransferencia (Immunobloting)

Los perfiles antigénicos de los diferentes estadios del clon EPM₆ se evidenciaron mediante la técnica de Towbin *et al* (32). Las proteínas totales de los antígenos o las bandas proteicas fraccionadas por electroelución múltiple de los diferentes estadios del clon EPM₆ fueron separadas por SDS-PAGE (27) como ya se ha descrito. Se colocó 4 µg/canal de cada antígeno total ó 1 µg/canal de cada banda proteica fraccionada. Después de la corrida electroforética, se desmontó el gel y se realizó la electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (MNC, Pierce Poro 0,45 µm) en tampón de electrotransferencia (25 mM tris, 192 mM glicina y 20% metanol), en un aparato Trans-Blot (BioRAD, USA) durante 1 hora a voltaje constante (100 voltios). Concluido ese tiempo, se verificó la transferencia de proteínas y glicoproteínas por tinción del canal del marcador de peso molecular en solución de coloración de Coomassie Blue (0,025% Coomassie Blue R-250 en 12,5% Ácido Tricloroacético). Seguidamente, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas en solución bloqueadora (7,5% de Leche Descremada y 0,1% Tween 20 en buffer salino fosfato (PBS) 0,15M pH 7,2 (57 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, 76,9 mM NaCl) durante 90 minutos a temperatura ambiente.

Luego la MNC, fue incubada toda la noche a 4 °C en agitación con suero chagásico individual y pool de suero de paciente chagásicos 1/50000, diluidos en solución de reacción (solución bloqueadora suplementada con 10 mM Tris/HCl pH 7,4 y NaCl 0,9%). Posteriormente, se realizó cuatro lavados, para proceder a incubar con el conjugado o anticuerpo secundario anti-IgG humano conjugada con peroxidasa en solución de reacción durante 90 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se hicieron ocho lavados con PBS + 0,1% Tween 20 de 5 minutos cada uno, dejándose reposar luego la membrana hasta realizar el revelado.

Los inmunocomplejos formados se revelaron por quimioluminiscencia, empleando luminol, en presencia de peróxido de hidrógeno (SuperSignal West Pico, Pierce Cod. 34080) como indicado por el fabricante (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL, USA). Los luminogramas se registraron sobre películas de Rayos X (Medical Film Konica Minolta, 23357) por exposiciones de tiempos variables y los filmes fueron fijados y revelados según la técnica de fotografía convencional, lavados y secados para su procesamiento y análisis posterior.

Oxidación de antígenos glicídicos de las membranas de nitrocelulosa con Periodato

Una vez finalizada la transferencia de dos geles diferentes conteniendo idéntica cantidad de antígeno, las membranas de nitrocelulosa obtenidas fueron procesadas de manera diferente con fines comparativos. Una siguiendo el protocolo definido para Inmunoblotting como control y la otra membrana fue tratada para oxidar los azúcares y alterar epítopes glicosilados según protocolo de Fukuda *et al* (33). El protocolo a seguir consistió en: (a) incubación de la membrana en tampón de Acetato de Sodio 50 mM pH 4,5 durante 5 min a temperatura ambiente, (b) incubación en solución de Metaperiodato de Sodio 20 mM en tampón de Acetato de Sodio, una hora a

temperatura ambiente en oscuridad, (c) eliminación del exceso de Metaperiodato mediante 3 lavados en PBS durante 5 min, (d) incubación en Borohidruro de Sodio 50 mM en PBS durante 30 min a temperatura ambiente, (e) retirar el Borohidruro por 2 lavados en PBS de 5 min a temperatura ambiente.

A partir de esta etapa los pasos siguientes fueron similares a los descritos en la técnica de Inmunobloting empleando membranas de nitrocelulosa.

Análisis de los datos

La comparación y determinación de los pesos moleculares de los diferentes perfiles polipeptídicos, residuos glicosilados y luminogramas fueron estimadas usando el densitómetro (Scanner Bio-Rad Imaging Densitometer, Modelo GPS-690. USA) 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 corridos en cada gel.

Para los perfiles proteicos y glicoproteicos, se utilizaron marcadores de peso molecular conocidos para calcular la movilidad relativa de las diferentes bandas. Los resultados se presentaron mediante la visualización de los diferentes geles (proteínas y glicoproteínas) indicando la presencia o ausencia de bandas y cambios de su intensidad.

Por otro lado, se evaluó la capacidad antigénica por visualización de los diferentes luminogramas tratados y no tratados con Metaperiodato, para oxidar los azúcares y alterar epítopes glicosilados y comparando los antígenos fraccionados (proteínas y glicoproteínas) capaces de reaccionar contra diluciones de los sueros de

paciente chagásicos, mediante la visualización de las bandas formadas en el luminograma sobre películas de Rayos X (Medical Film Konica Minolta).

El arte gráfico y procesamiento de imágenes se realizó en un PC Compaq Presario, con los programas Photoshop versión 7.0 y Power Point versión 2007.

RESULTADOS

Caracterización de proteínas y glicoproteínas totales de los cuatro estadios de *Trypanosoma cruzi*.

Para confirmar que los cuatro estadios presentan perfiles proteicos diferentes se analizaron las proteínas totales de cada uno de los estadios en un gel teñido con la técnica de Coomassie-Plata. En la Figura 1 se aprecian cuatro perfiles proteicos diferentes, seis bandas proteicas (65, 62, 37, 30, 27 y 20 kDa, punta de flecha a la izquierda del canal E) son compartidas por los 4 estadios y una banda (67 kDa) es compartida solo por los estadios del invertebrado (epimastigota y metacíclico). El estadio epimastigota está caracterizado por al menos veintidós bandas proteicas (100, 85, 67, 65, 62, 50, 47, 45, 43, 40, 37, 34, 33, 30, 29, 27, 24, 23, 21, 20, 18 y 16 kDa, trazos a la izquierda del canal E), el metacíclico por trece bandas (90, 67, 65, 62, 53, 50, 37, 30, 27, 24, 22, 20 y 16 kDa, trazos a la izquierda del canal M), el amastigota por trece bandas (70, 65, 62, 50, 45, 40, 37, 30, 27, 24, 22, 20 y 16 kDa, trazos a la izquierda del canal A) y el tripomastigota por trece bandas (85, 72, 65, 62, 49, 43, 40, 37, 30, 27, 22, 20 y 16 kDa, trazos a la izquierda del canal T). Algunas de esas bandas parecen ser estadio-específicas por cuanto solo se observan en un estadio en particular. Hay siete bandas proteicas en los epimastigotas (100, 47, 34, 33, 23, 21 y 18 kDa, canal E), dos en los metacíclicos (90 y 53 kDa, canal M), una en los amastigotas (70 kDa, canal A) y dos en los tripomastigotas (72 y 49 kDa, canal T).

Para identificar los perfiles glicoproteicos de los cuatro estadios, otro gel equivalente en composición al gel de la Figura 1, fue visualizado por tinción con la técnica de APABGP. En la Figura 2 se aprecia que cada estadio está caracterizado por un perfil glicoproteico particular. Seis bandas glicoproteicas de diferente intensidad

(82, 66, 29, 27, 25 y 21 kDa, punta de flecha a la izquierda del canal E) parecen ser comunes a los cuatro estadios y dos bandas (55 y 31 kDa) son compartidas por los estadios del vertebrado (amastigota y tripomastigota). En los epimastigotas se aprecian al menos catorce bandas glicoproteicas (95, 82, 66, 57, 52, 47, 44, 39, 37, 33, 29, 27, 25 y 21 kDa, trazos a la izquierda del canal E), el metacíclico por doce bandas (90, 82, 75, 66, 53, 52, 50, 45, 29, 27, 25 y 21 kDa, trazos a la izquierda del canal M), el amastigota por dieciocho bandas (90, 82, 75, 66, 61, 57, 55, 52, 47, 44, 39, 37, 35, 31, 29, 27, 25 y 21 kDa, trazos a la izquierda del canal A) y el tripomastigota por dieciocho bandas (115, 95, 82, 80, 66, 57, 55, 49, 43, 41, 38, 37, 33, 31, 29, 27, 25 y 21 kDa, trazos a la izquierda del canal T). Algunas bandas glicoproteicas parecen ser compartidas por más de dos estadios, mientras que otras parecen ser específicas de cada estadio. En los metacíclicos se aprecian tres bandas (53, 50 y 45 kDa) ausente en los otros estadios, dos en los amastigotas (61 y 35 kDa) y cinco en los tripomastigotas (115, 49, 43, 41 y 38 kDa). Dos bandas proteicas no glicosiladas que se visualizan decoloradas (coloración de plata reversa) son comunes en los cuatro estadios (dupleta 62/60 y 30 kDa, triángulos blancos a la derecha de los canales E, M, A y T) y otras son compartidas por dos o tres estadios.

Identificación de bandas antigénicas en los cuatro estadios de *Trypanosoma cruzi* reveladas con un suero pool de pacientes chagásicos crónicos.

Para caracterizar los perfiles antigénicos que revela el suero pool de pacientes chagásicos crónicos en cada estadio de *T. cruzi*, se separaron electroforéticamente las proteínas totales y se analizaron mediante Inmunoblotting. La Figura 3A muestra que el suero pool revela un perfil antigénico diferente para cada estadio. El perfil antigénico del estadio epimastigota está caracterizado por al menos quince bandas antigénicas (160, 150, 130, 100, 90, 85, 72, 60, 55, 45, 36, 31, 27, 25 y 21 kDa, trazos a la izquierda del canal E), los metacíclicos por al menos dieciocho bandas (180, 170,

160, 150, 130, 120, 100, 90, 85, 72, 60, 55, 47, 45, 36, 25, 23 y 20 kDa, trazos a la izquierda del canal M), los amastigotas por al menos quince bandas (160, 150, 120, 90, 85, 80, 72, 60, 55, 45, 38, 36, 27, 25 y 20 kDa, trazos a la izquierda del canal A) y los tripomastigotas por al menos veintiún bandas (225, 180, 160, 145, 120, 90, 85, 80, 72, 60, 49, 47, 45, 40, 36, 33, 31, 30, 27, 25 y 20 kDa, trazos a la izquierda canal T). El suero pool revela ocho bandas antigénicas comunes a los cuatro estadios (160, 90, 85, 72, 60, 45, 36 y 25 kDa, punta de flecha izquierda del canal E). En los cuatro estadios se reveló una banda ancha, difusa e intensa por debajo de marcador de 10 kDa.

La Figura 3B muestra un gel equivalente al 3A después de tratar con periodato, la comparación de estos perfiles con los revelados antes del tratamiento, muestra un pequeño decremento en la intensidad de los metacíclicos, amastigotas y tripomastigotas (canales M, A y T; Figura 3B vs Figura 3A) y un ligero incremento en la intensidad de los epimastigotas (canal E; Figura 3B vs Figura 3A) y cambios en la complejidad de algunos estadios en términos del número de bandas antigénicas para cada perfil. La comparación muestra también que la banda ancha difusa e intensa presente en los canales E, M, A y T por debajo del marcador de 10 kDa (Figura 3A) desaparece después del tratamiento (Figura 3B) sugiriendo que son residuos glicosídicos que después de oxidados dejaron de ser reconocidos por el suero pool, apoyando la efectividad del tratamiento con periodato.

La comparación del perfil de epimastigotas después del tratamiento con el observado antes (canal E; Figura 3B vs Figura 3A) muestra un incremento en la complejidad del perfil de quince a veinticinco bandas (180, 175, 170, 155, 150, 130, 125, 100, 95, 85, 80, 70, 62, 60, 55, 50, 45, 40, 38, 36, 35, 33, 29, 25 y 20 kDa, canal E Figura 3B), una muy ligera disminución en la complejidad de los metacíclicos de dieciocho a diecisiete bandas (180, 175, 170, 165, 150, 130, 100, 90, 80, 65, 60, 50,

38, 33, 30, 25 y 20 kDa, canal M Figura 3B), un discreto incremento en los amastigotas de quince a diecinueve bandas (175, 155, 130, 110, 90, 80, 70, 65, 60, 50, 48, 45, 38, 35, 33, 29, 27, 25 y 20 kDa, canal A Figura 3B) y se mantiene la complejidad en los tripomastigotas en veintidós bandas (175, 170, 165, 150, 130, 110, 90, 80, 65, 60, 50, 48, 43, 38, 36, 35, 33, 29, 27, 25 y 20 kDa, canal T Figura 3B). Se observan ocho bandas comunes a los cuatro estadios (175, 130, 80, 60, 50, 38, 33 y 20 kDa, punta de flecha a la izquierda del canal E Figura 3B).

Al analizar el grado de similitud de los perfiles antigénicos revelados por el suero pool, en los estadios antes y después del tratamiento se aprecia que en los epimastigotas se mantienen nueve bandas antigénicas de igual peso molecular (150, 130, 100, 85, 60, 55, 45, 36 y 25 kDa), nueve bandas en los metacíclicos (180, 170, 150, 130, 100, 90, 60, 25 y 20 kDa), ocho bandas en los amastigotas (90, 80, 60, 45, 38, 27, 25 y 20 kDa) y ocho bandas antigénicas en los tripomastigotas (90, 80, 60, 36, 33, 27, 25 y 20 kDa). Es de hacer notar que la banda de 60 kDa es revelada como una banda antigénica común a los cuatro estadios antes y después del tratamiento.

Identificación de bandas antigénicas en los cuatro estadios de *Trypanosoma cruzi* reveladas con un suero único de paciente chagásico crónico.

Con el propósito de reducir la alta complejidad antigénica revelada por el suero pool, membranas equivalentes a las usadas en las Figuras 3A y 3B fueron analizadas por Inmunoblotting usando uno de los sueros con mayor título del pool (Figura 4). La Figura 4A muestra que el suero individual también revela un perfil antigénico diferente para cada estadio y que solo una banda de diferente intensidad y espesor es revelada como un antígeno común a los cuatro estadios (60 kDa, punta de flecha a la izquierda del canal E). Se aprecia que el suero chagásico individual reveló en los epimastigotas al menos catorce bandas antigénicas (140, 120, 110, 90, 82, 77, 72, 70,

62, 60, 52, 40, 36 y 34 kDa, trazos a la izquierda del canal E), en los metacíclicos identificó al menos trece bandas (150, 140, 135, 130, 115, 100, 85, 80, 75, 65, 60, 57 y 45 kDa, trazos a la izquierda del canal M), en los amastigotas al menos dieciocho bandas (145, 135, 130, 100, 85, 80, 75, 70, 62, 60, 55, 50, 45, 40, 38, 37, 36 y 34 kDa, trazos a la izquierda del canal A) y en los tripomastigotas diecisiete bandas (150, 140, 130, 115, 100, 85, 76, 72, 65, 60, 57, 52, 50, 45, 41, 36 y 34 kDa, trazos a la izquierda del canal T). Vale destacar la mayor complejidad (18 bandas) e intensidad del perfil antigénico revelado por el suero individual en el estadio amastigota (canal A Figura 4A).

La Figura 4B muestra un gel equivalente al 4A después de tratar con periodato, la comparación de estos perfiles con los revelados antes del tratamiento, muestra que en los epimastigotas, metacíclicos y tripomastigotas pasan de menor a mayor intensidad (canales E, M y T; Figura 4B vs Figura 4A) mientras que los amastigotas pasaron de muy intensos a muy baja intensidad (canal A; Figura 4B vs Figura 4A) y cambios significativos en la complejidad de bandas antigénicas de algunos estadios.

La comparación del perfil de epimastigotas después del tratamiento con el observado antes (canal E; Figura 4B vs Figura 4A) muestra un incremento en la complejidad del perfil de catorce a veintidós bandas (140, 120, 110, 95, 85, 75, 72, 70, 65, 62, 60, 55, 53, 52, 49, 45, 40, 35, 30, 27, 25 y 16 kDa, canal E Figura 4B); similarmente se incrementó la complejidad en los metacíclicos de trece a veinticuatro bandas (150, 140, 135, 130, 115, 100, 85, 75, 65, 62, 60, 55, 52, 50, 45, 35, 30, 27, 25, 23, 20, 19, 18 y 16 kDa, canal M Figura 4B) y también en los tripomastigotas de diecisiete a veintiocho bandas (150, 140, 130, 115, 100, 85, 80, 67, 62, 60, 57, 52, 50, 47, 43, 40, 37, 36, 35, 33, 30, 29, 28, 25, 23, 20, 19 y 17 kDa, canal T Figura 4B), mientras que los amastigotas disminuyó ligeramente la complejidad de dieciocho a dieciséis bandas antigénicas (145, 135, 130, 100, 85, 80, 67, 62, 60, 57, 52, 50, 38,

30, 19 y 18 kDa, canal A Figura 4B). Como en la condición sin tratar con metaperiodato (Figura 4A), se observó la existencia de bandas antigénicas comunes a los cuatro estadios, una de igual peso molecular que antes de la oxidación (60 kDa, punta de flecha a la izquierda del canal E, Figura 4B) y cuatro nuevas bandas de diferente peso molecular (85, 62, 52 y 30 kDa, triángulos vacíos a la izquierda del canal E, Figura 4B). Vale destacar que la oferta antigénica de los amastigotas después de oxidados muestra una muy acentuada disminución en la intensidad (canal A; Figura 4B vs Figura 4A), lo que funciona como un estándar interno de la efectividad del tratamiento con periodato para oxidar la fracción glicosídica de las glicoproteínas.

Al analizar el grado de similitud de los perfiles antigénicos revelados por el suero individual, en los estadios antes y después del tratamiento se aprecia que en los epimastigotas se mantienen nueve bandas antigénicas de igual peso molecular (140, 120, 110, 72, 70, 62, 60, 52 y 40 kDa), once bandas en los metacíclicos, (150, 140, 135, 130, 115, 100, 85, 75, 65, 60 y 45 kDa), diez bandas en los amastigotas (145, 135, 130, 100, 85, 80, 62, 60, 50 y 38 kDa) y once bandas antigénicas en los tripomastigotas (150, 140, 130, 115, 100, 85, 60, 57, 52, 50 y 36 kDa). Sin embargo, nuevamente solo la banda antigénica de 60 kDa es común a los cuatro estadios. Adicionalmente, al analizar el grado de similitud entre los antígenos revelados por el suero individual y el suero pool en los cuatro estadios antes de tratar con periodato se encuentra que en los epimastigotas identificaron un mayor número de bandas (15) que el individual (14) de las cuales once son diferentes y cuatro coinciden en peso molecular (90, 72, 60 y 36 kDa, canal E; Figura 3A vs Figura 4A); en los metacíclicos el suero pool reveló un mayor número de bandas (18) que el individual (13), seis con igual peso molecular (150, 130, 100, 85, 60 y 45 kDa, canal M; Figura 3A vs Figura 4A); en los amastigotas el suero pool reveló un menor número de bandas (15) que el individual (18) de las cuales siete coinciden en masa molecular (85, 80, 60, 55, 45, 38 y 36 kDa, canal A; Figura 3A vs Figura 4A) y en los

tripomastigotas el suero pool reveló un mayor número de bandas (21) que el individual (17) de las cuales cinco coinciden en peso molecular (85, 72, 60, 45 y 36 kDa, canal T; Figura 3A vs Figura 4A). Sin embargo, solo el antígeno de 60 kDa fue reconocido por ambos sueros en los cuatro estadios.

Sobre la base de los cambios en la oferta antigénica revelada por el suero individual del paciente chagásico después de la oxidación con periodato se decidió seleccionar algunas de esas bandas antigénicas fraccionadas por electroelución para continuar el estudio. Se eligieron las bandas de 85, 67, 65, 62, 60 y 30 kDa. Como las bandas de 67 y 65 kDa y las bandas de 62 y 60 kDa tienen masas moleculares muy próximas y estaban fraccionadas juntas se identificaron como bandas antigénicas individuales quedando para el análisis; cuatro bandas, una de mayor peso molecular (85 kDa) dos de mediano peso molecular (dupleta 67/65 kDa y dupleta 62/60 kDa) una de menor masa molecular (30 kDa). Para confirmar su carácter no glico-proteico se analizaron usando la técnica de APABGP.

La Figura 5 muestra las fracciones obtenidas de la electroelución de los epimastigotas (canales E), de los metacíclicos (canales M), amastigotas (canales A) y tripomastigotas (canal T), agrupando las fracciones electroeluídas de 85 y 62/60 kDa en los canales identificados con N° 1 y las fracciones electroeluídas de 67/65 y 30 kDa con el N° 2. En los canales correspondientes a los epimastigotas se aprecia cuatro bandas glicoproteicas de baja intensidad en el canal E1 (110, 50, 43 y 33 kDa) y una banda tenue en canal E2 (67/65 kDa); en los correspondientes a los metacíclicos dos bandas intensas y bien definidas en el canal M1 (85 y 50 kDa) y una banda gruesa e intensa en el canal M2 (67/65 kDa); en los amastigotas una banda poco intensa en el canal A1 (62/60 kDa) y una banda gruesa en el canal A2 (67/65 kDa) y en el canal T1 de los tripomastigotas dos grupos de bandas muy intensas, una de mayor peso molecular conformada por una tripleta de 100/85/80 kDa y otra de

mediano peso molecular 62/60 kDa y en el canal T2 tres bandas de poca intensidad (dupleta 67/65, 63 y 30 kDa). Era de esperar que las bandas con los pesos moleculares seleccionados no fuesen reveladas con esta técnica de tinción específica para glicoproteínas. La aparición de glicoproteínas con pesos moleculares diferente a las seleccionadas abre la posibilidad de un error humano al preparar las mezclas de tubos de diferentes electroeluciones para alcanzar los 1,5 µg colocados en cada canal. El hecho que la técnica de APABGP haya revelado las bandas con el peso molecular seleccionado debe ser discutido.

Cambios en la capacidad de revelar las bandas antigénicas seleccionadas usando un suero individual de paciente chagásico.

Para evidenciar que las bandas antigénicas seleccionadas de los cuatro estadios detectan poblaciones de anticuerpos diferentes se prepararon membranas equivalentes a la mostrada en la Figura 5 y se analizaron mediante Inmunoblotting con el suero individual del paciente chagásico antes y después de oxidar la región glicosídica de los antígenos. En el canal E1 el suero antes del tratamiento identificó intensamente un antígeno de 110 kDa (Figura 6A), y después del tratamiento (Figura 6B) se mantiene su intensidad. En el canal E2 antes del tratamiento (Figura 6A), identificó una banda ancha de 75/65 kDa y después del tratamiento (Figura 6B), se revela con muy baja intensidad. En el canal M1 antes del tratamiento (Figura 6A), identificó bandas antigénicas cuyos pesos promedios son 85, 75 y 50 kDa y después del tratamiento reveló los mismos 3 antígenos solo que el antígeno de 50 kDa con mayor intensidad (Figura 6B). En el canal M2 antes del tratamiento, identificó tres antígenos uno de 110 kDa, otro más intenso de 67/65 kDa y uno de menor intensidad de 30 kDa (Figura 6A), después del tratamiento reveló solo dos antígenos el de 67/65 y 30 kDa con igual intensidad (Figura 6B).

En el canal A1 antes del tratamiento (Figura 6A), identificó 4 grupos de bandas antigénicas cuyos pesos promedios son 110, 85, 62/60 y 50 kDa, en particular el antígeno de 62/60 con mayor intensidad y después del tratamiento (Figura 6B) reveló los mismos 4 antígenos donde los antígenos de 110, 85 y 50 mantienen su intensidad y el antígeno de 62/60 se revela tenuemente. En el canal A2 se aprecia que antes del tratamiento el suero identifica con alta intensidad a la fracción 67/65 y después de oxidar la revela con muy baja intensidad. En el canal T1 antes del tratamiento (Figura 6A), identificó muy intensamente 5 grupos de bandas antigénicas cuyos pesos promedios son 110, 85, 75, 62/60 y 50 kDa y después del tratamiento (Figura 6B) reveló los mismos cinco antígenos con igual intensidad. En el canal T2 antes del tratamiento, identificó cinco bandas antigénicas con peso promedios de 72, 67/65, 55, 35 y 30 kDa (Figura 6A), después del tratamiento (Figura 6B), reveló las cinco bandas antigénicas mostrando que los antígenos de 72, 67/65 y 55 se identifican con igual intensidad y que los antígenos de 35 y 30 kDa se revelan con menor intensidad.

Cambios en la capacidad de revelar las bandas antigénicas seleccionadas usando el suero pool de pacientes chagásicos.

Teniendo en cuenta la alta complejidad en los perfiles antigénicos revelados por el suero pool chagásico (Figura 3) y para demostrar que las bandas antigénicas seleccionadas de los cuatro estadios detectan poblaciones de anticuerpos diferentes indistintamente de la complejidad de anticuerpos, las membranas de la Figura 6 fueron tratadas para desprender los anticuerpos del suero individual y re-incubadas con el suero pool de pacientes chagásicos. En la Figura 7 el suero pool revela perfiles antigénicos casi idénticos a los mostrados en la Figura 6. Las diferencias más relevantes fueron que antes del tratamiento el pool en E2 reveló una banda de 72 kDa en vez de la dupleta 75/65 (Figura 7A vs Figura 6A); en A1 no reconoce la banda de 85 kDa (Figura 7A vs Figura 6A) y en T2 revela el antígeno de 50 kDa. Cuando se

comparan los perfiles después del tratamiento de ambos sueros también se encuentran diferencias menores tales como que en el canal A1 revela solo un antígeno de 60 kDa (Figura 7B) en vez de la dupleta 62/60 (Figura 6B), en A2 un antígeno de 65 (Figura 7B) en vez de la dupleta 67/65 (Figura 6B) y en T2 no reconoció el antígeno de 35 kDa que reveló el suero individual (Figura 6B). Es de resaltar que suero pool reveló los cambios de intensidad antes y después de tratar con periodato de forma idéntica a la mostrada por el suero individual.

Cambios en la capacidad de revelar las bandas antigénicas seleccionadas usando el suero anti-TEMA.

Para confirmar que las bandas antigénicas seleccionadas de los cuatro estadios detectan poblaciones de anticuerpos diferentes indistintamente de la procedencia del suero, las membranas de la Figura 7 fueron tratadas nuevamente para desprender los anticuerpos del suero pool y re-incubadas con un anti-suero preparado en conejos contra los cuatro estadios. La Figura 8, muestra que en el canal E1 anti-TEMA no detecta ningún antígeno ni antes ni después del tratamiento (Figura 8A vs Figura 8B); en E2 antes de oxidar revela una banda de 67 kDa y después reconoce una banda de 85 kDa y no detecta la de 67 kDa, en M1 pre-tratamiento revela una de 85 kDa y después revela la misma banda de 85 kDa pero con mayor intensidad y una nueva tenue de 55 kDa, en M2 reveló una de 72 kDa y 67 kDa bien definidas y una tenue de 30 kDa y después reconoce la de 72 kDa muy intensa, no reconoce la de 67 kDa, revela una tenue de 50 kDa y la de 30 kDa pero con mayor intensidad, en el canal A1 revela una de 90 kDa e intensamente la dupleta 62/60 kDa, después del tratamiento no reconoce ninguna banda, en el canal A2 anti-TEMA revela los antígenos de 75, 72, 67 y 65 kDa como bandas definidas e intensas y después del tratamiento identifica sólo la banda de 72 kDa con igual intensidad, en T1 reveló tenuemente las bandas de 85 y 62 kDa y después no revela ninguna banda, en el canal T2 reconoce

tenuamente las bandas de 72 y 65 kDa y después continua revelando esas mismas bandas pero más tenues.

La comparación de los perfiles revelados por anti-TEMA (Figura 8) con los revelados por el suero individual (Figura 6) muestra diferencias significativas. En E1 anti-TEMA (Figura 8) no reconoce ningún antígeno ni antes ni después del tratamiento, mientras el suero revela una banda de 110 kDa; en E2 revela una banda de 67 kDa y el suero una banda de 75/65 kDa; en el canal M1 anti-TEMA revela solo una banda de 85 kDa, mientras el suero revela tres bandas (85, 75 y 50 kDa), en M2 reveló 3 bandas (72, 67 y 30 kDa) y el suero tres bandas (110, 67/65 y 30 kDa), en A1 dos bandas (90 y 62/60 kDa) y el suero cuatro bandas (110, 85, 62/60 y 50 kDa), en A2 cuatro antígenos (75, 72, 67 y 65 kDa) y el suero solo una banda (67/65 kDa), en T1 reveló dos bandas (85 y 62 kDa) y el suero cinco bandas (110, 85, 75, 62/60 y 50 kDa) y en el canal T2 reveló dos bandas (72 y 65 kDa) y el suero cinco bandas (72, 67/65, 55, 35 y 30 kDa).

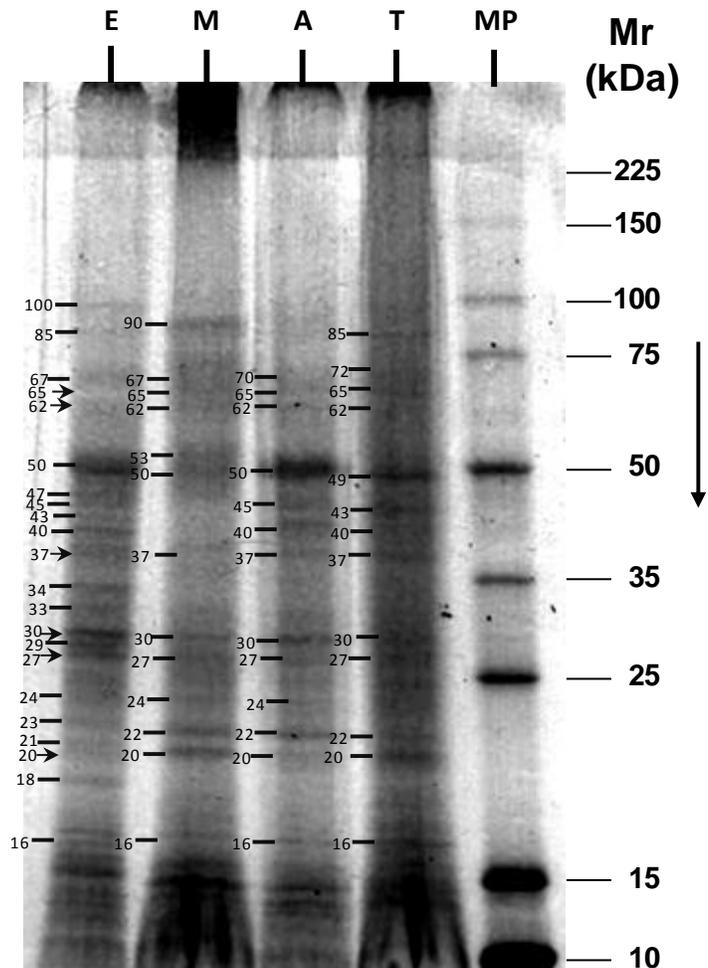


Figura 1. Análisis mediante SDS-PAGE (7-15%) de las proteínas de diferentes estadios del clon EPM₆ de *Trypanosoma cruzi*. Cada canal tiene 16 µg de proteína. E = Epimastigotas de 6 días en medio LITB, M = Metacíclicos inducidos en medio TAU3AAG y purificados en DEAE-celulosa, A = Amastigotas Extracelulares Primarios inducidos en medio MEMTAU a partir de metacíclicos, T = Tripomastigotas sobrenadantes de cultivo de células Vero. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores (MP) de peso molecular en kilodaltons (kDa). El gel fue teñido con una técnica combinada Coomassie Blue-Plata, como descrito en Materiales y Métodos.

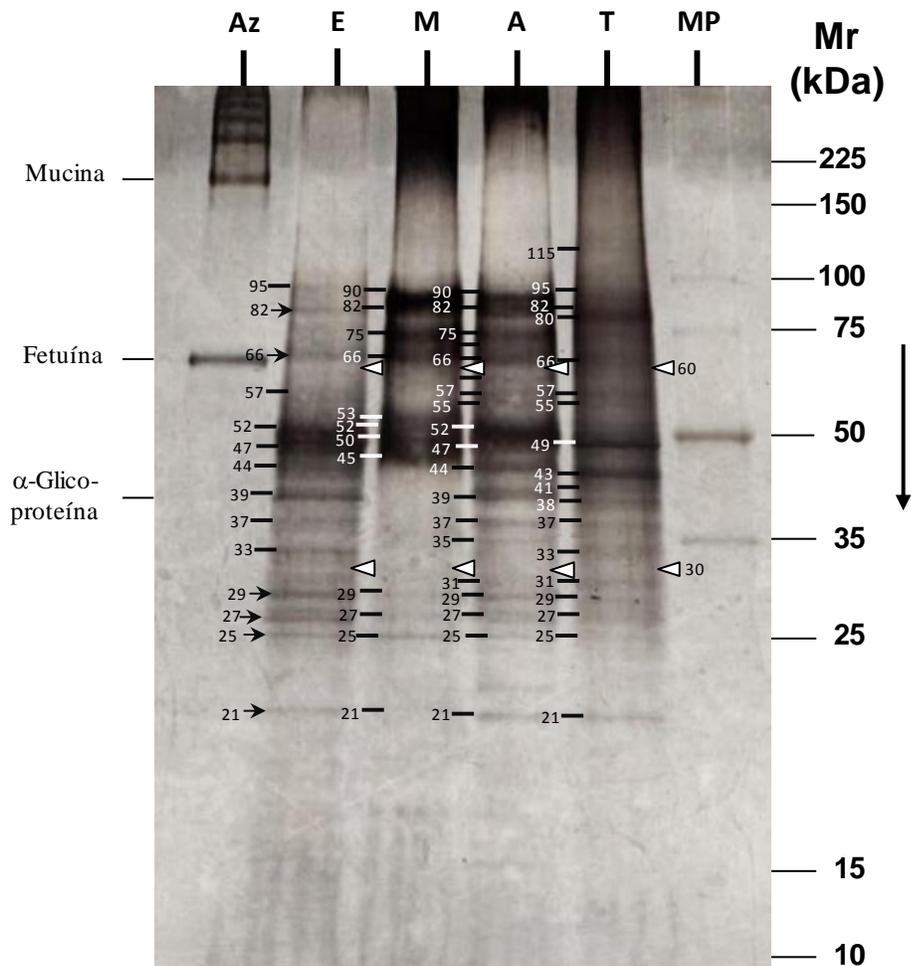


Figura 2. Análisis mediante SDS-PAGE (7-15%) de las glicoproteínas de diferentes estadios del clon EPM₆ de *Trypanosoma cruzi*. Cada canal tiene 20 µg de proteína. E = Epimastigotas de 6 días en medio LITB, M = Metacíclicos inducidos en medio TAU3AAG y purificados en DEAE-celulosa, A = Amastigotas Extracelulares Primarios inducidos en medio MEMTAU a partir de metacíclicos, T = Tripomastigotas sobrenadantes de cultivo de células Vero. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores (MP) de peso molecular en kDa. El gel fue teñido con una técnica combinada de Acido Periódico, Alcian Blue, Glutaraldehído, Plata (APABGP modificado) para glicoproteínas, como descrito en Materiales y Métodos. Az= 1,5 µg de mezcla de glicoconjugados, como control de tinción y su posición se muestra al lado izquierdo de la figura.

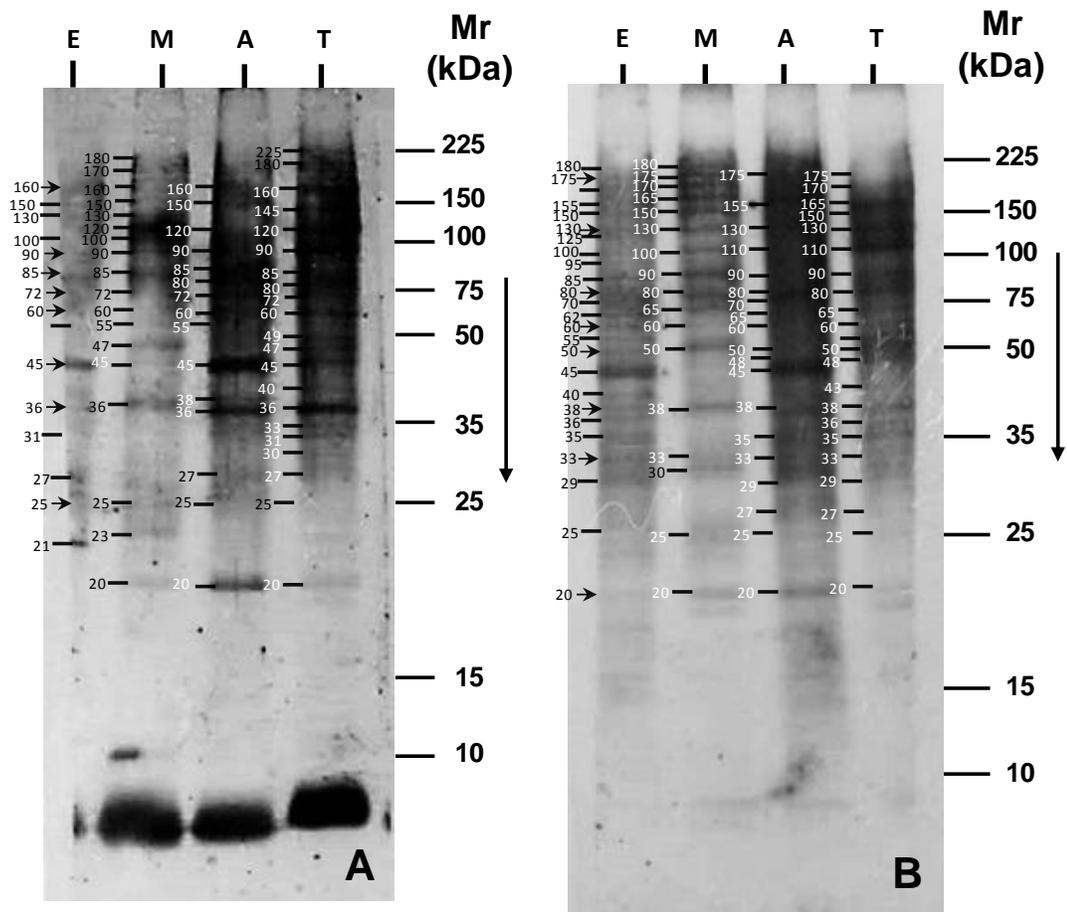


Figura 3. Análisis mediante Inmunoblotting en SDS-PAGE (7-15%) de los perfiles antigénicos de diferentes estadios del clon EPM₆ de *Trypanosoma cruzi* antes (Panel A) y después (Panel B) del tratamiento con metaperiodato colocando 4 µg de proteína/canal, revelados con **pool de sueros de pacientes chagásicos crónicos** (1/10.000) y conjugado anti-IgG humano peroxidasa (1/20.000) y revelado por luminografía. Canales E, M, A y T corresponden a los estadios epimastigotas, metacíclicos, amastigotas y tripomastigotas respectivamente. Mr indica la movilidad relativa en kDa de los marcadores de peso molecular colocados en el mismo gel.

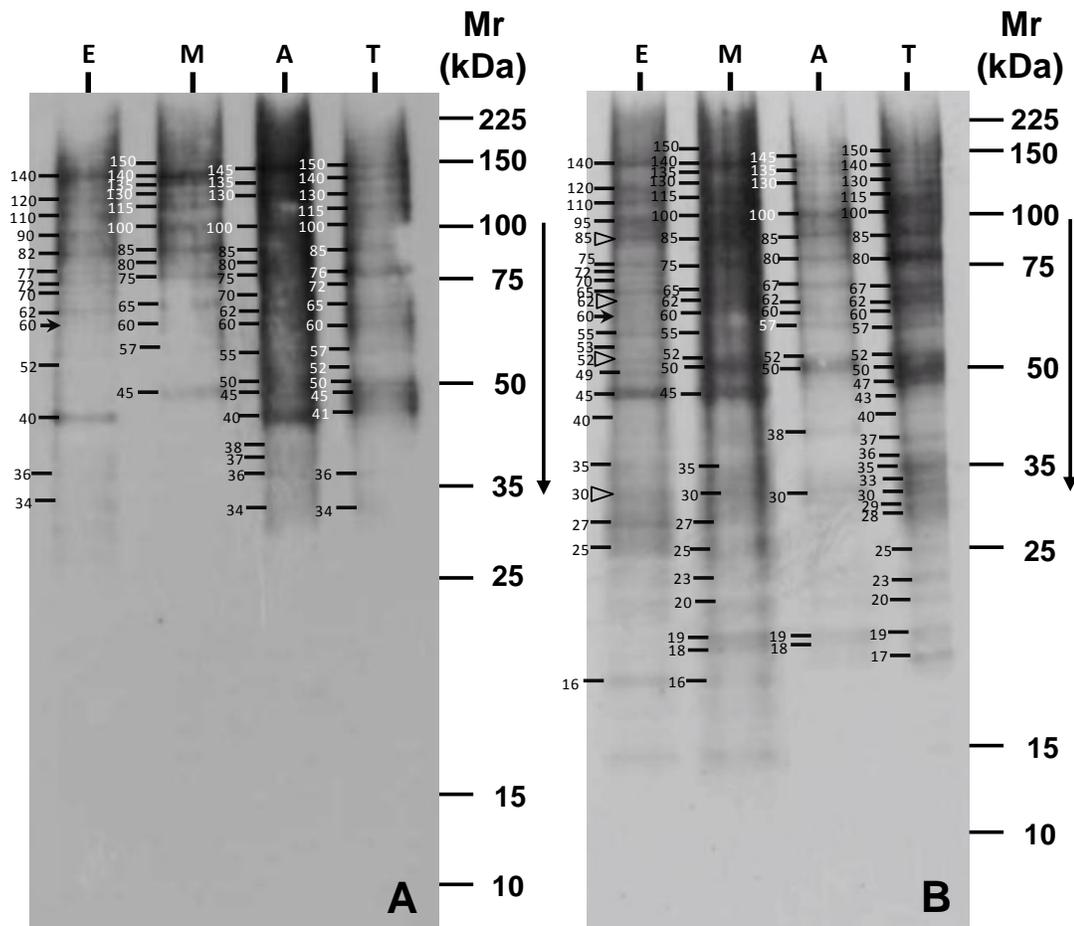


Figura 4. Análisis mediante Inmunoblotting en SDS-PAGE (7-15%) de los perfiles antigénicos de diferentes estadios del clon EPm₆ de *Trypanosoma cruzi* antes (Panel A) y después (Panel B) del tratamiento con metaperiodato colocando 4 µg de proteína/canal, revelados **con suero de paciente chagásico crónico** (1/50.000) y conjugado anti-IgG humano peroxidasa (1/20.000) y revelado por luminografía. Canales E, M, A y T corresponden a los estadios epimastigotas, metacíclicos, amastigotas y tripomastigotas respectivamente. Mr indica la movilidad relativa en kDa de los marcadores de peso molecular colocados en el mismo gel.

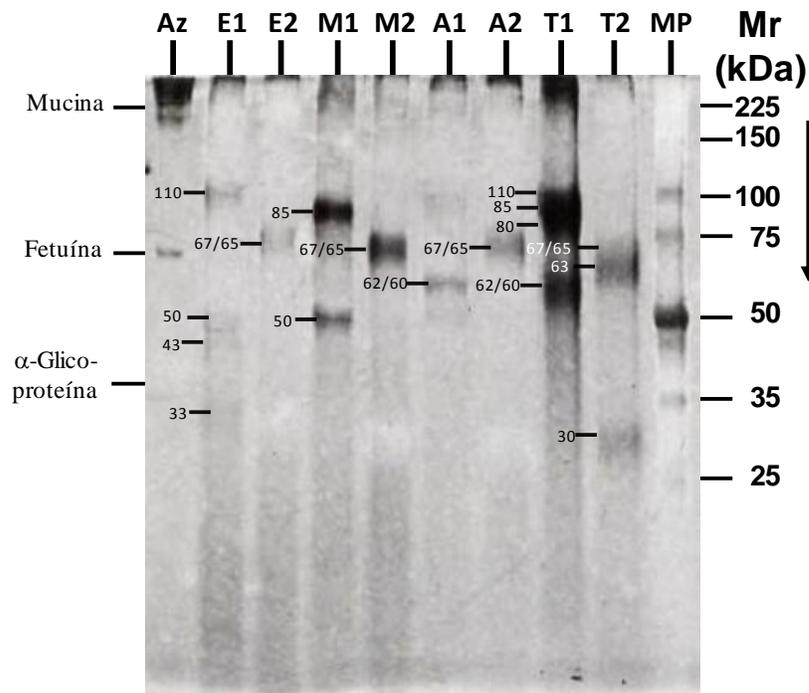


Figura 5. Análisis mediante SDS-PAGE (10%) de las bandas glicoproteicas de diferentes estadios del clon EPM₆ de *Trypanosoma cruzi* obtenidas por lisis en presencia de urea y separadas por electroelución. Cada canal tiene 1,5 µg de cada banda de proteína. Canales E, M, A y T corresponden a los estadios epimastigotas, metacíclicos, amastigotas y tripomastigotas respectivamente, donde (1) las fracciones electroeluidas de **85** y **62/60** kDa y (2) las fracciones electroeluidas de **67/65** y **30** kDa. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores (MP) de peso molecular en kDa. El gel fue teñido con una técnica combinada de APABGP modificado para glicoproteínas, como descrito en Materiales y Métodos. Az= 1,5 µg de mezcla de glicoconjugados, como control de tinción y su posición se muestra al lado izquierdo de la figura.

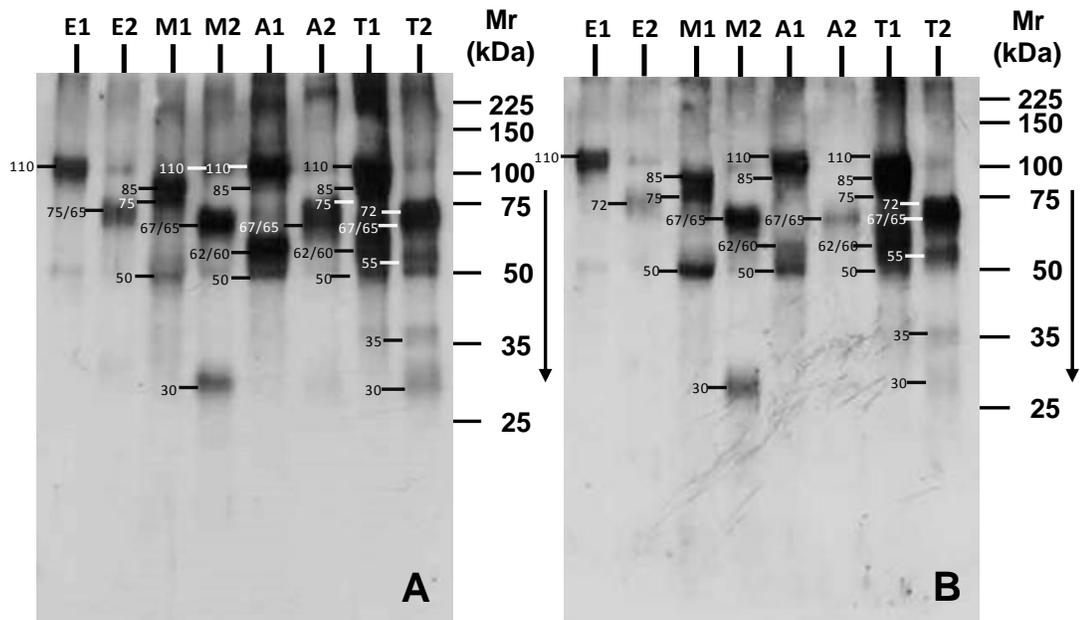


Figura 6. Análisis mediante Immunoblotting en SDS-PAGE (10%) de las bandas antigénicas separadas por electroelución de diferentes estadios del clon E_{Pm6} de *Trypanosoma cruzi* antes (Panel A) y después (Panel B) del tratamiento con metaperiodato colocando 1 µg de cada banda/canal, revelados con **suero de paciente chagásico crónico** (1/50.000) y conjugado anti-IgG humano peroxidasa (1/20.000) y revelado por luminografía. Canales E, M, A y T corresponden a los estadios epimastigotas, metacíclicos, amastigotas y tripomastigotas respectivamente, donde (1) las fracciones electroeluidas de 85 y 62/60 kDa y (2) las fracciones electroeluidas de 67/65 y 30 kDa. Mr indica la movilidad relativa en kDa de los marcadores de peso molecular colocados en el mismo gel.

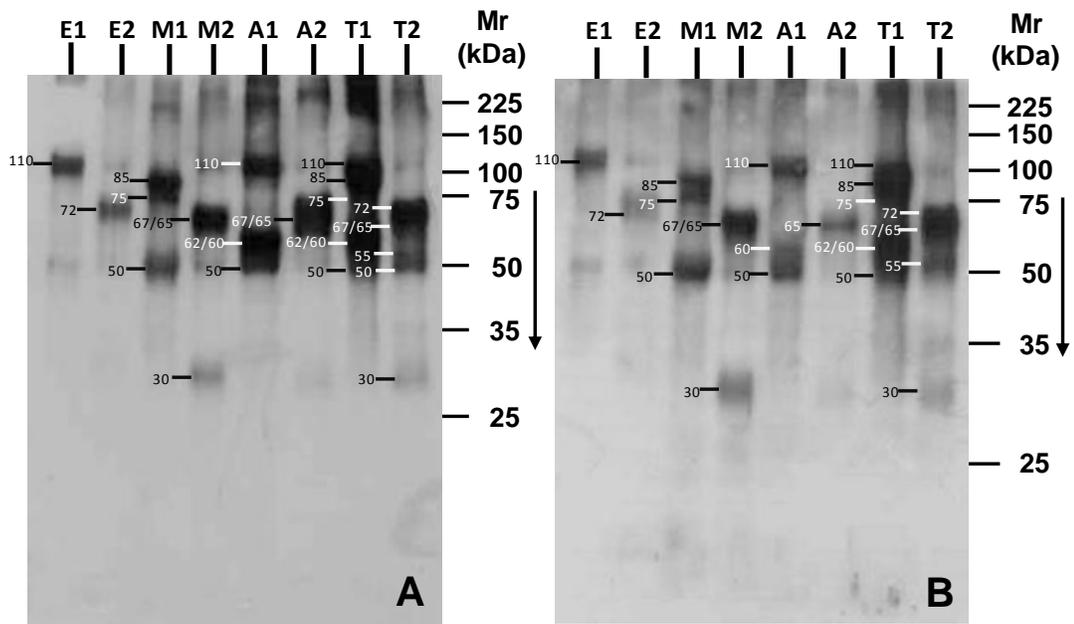


Figura 7. Análisis mediante Inmunoblotting en SDS-PAGE (10%) de las bandas antigénicas separadas por electroelución de diferentes estadios del clon EPM₆ de *Trypanosoma cruzi* antes (Panel A) y después (Panel B) del tratamiento con metaperiodato colocando 1 µg de cada banda/canal, revelados con un **suero pool de pacientes chagásicos crónicos** (1/50.000) y conjugado anti-IgG humano peroxidasa (1/20.000) y revelado por luminografía. Canales E, M, A y T corresponden a los estadios epimastigotas, metacíclicos, amastigotas y tripomastigotas respectivamente, donde (1) las fracciones electroeluidas de 85 y 62/60 kDa y (2) las fracciones electroeluidas de 67/65 y 30 kDa. Mr indica la movilidad relativa en kDa de los marcadores de peso molecular colocados en el mismo gel.

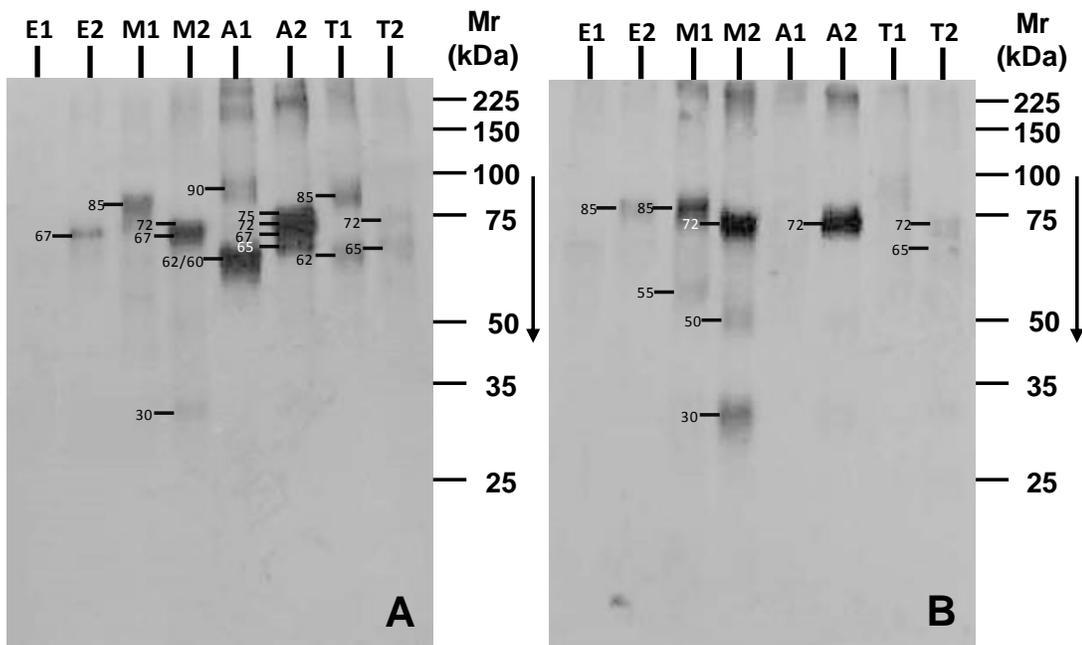


Figura 8. Análisis mediante Inmunoblotting en SDS-PAGE (10%) de las bandas antigénicas separadas por electroelución de diferentes estadios del clon EPM₆ de *Trypanosoma cruzi* antes (Panel A) y después (Panel B) del tratamiento con metaperiodato colocando 1 µg de cada banda/canal, revelados con **suero anti-TEMA** (1/3.500) y conjugado anti-IgG peroxidasa de conejo (1/10.000) y revelado por luminografía. Canales E, M, A y T corresponden a los estadios epimastigotas, metacíclicos, amastigotas y tripomastigotas respectivamente, donde (1) las fracciones electroeluidas de 85 y 62/60 kDa y (2) las fracciones electroeluidas de 67/65 y 30 kDa. Mr indica la movilidad relativa en kDa de los marcadores de peso molecular colocados en el mismo gel.

DISCUSIÓN

Como el propósito de este trabajo fue la evaluación de bandas proteicas no glicosiladas de los cuatro estadios de *Trypanosoma cruzi* mediante Inmunobloting que pudiesen ser útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, las evidencias encontradas muestran la necesidad de solventar algunas limitaciones metodológicas y orientan el abordaje con un racional diferente. Se caracterizaron los perfiles proteicos y glicoproteicos de los cuatro estadios del parásito, se inmunodetectaron bandas antigénicas usando un suero individual y un suero pool evidenciando que cada estadio representa una oferta antigénica diferente y que los anticuerpos presentes en el suero del paciente chagásico son heterogéneos y capaces de reconocer diferencialmente cada estadio del parásito. El análisis del grado de similitud entre las bandas detectadas por ambos sueros mostró que el suero individual y el pool se comportan diferentes frente a la misma oferta antigénica; sin embargo, quedo comprobado que el antígeno de 60 kDa es revelado en los cuatro estadios por ambos sueros antes y después del tratamiento con periodato. Este hecho resulta interesante, debido a que abre la posibilidad de la dupleta de 62/60 kDa sea un antígeno único con potencial en el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas y que ese antígeno coincide en masa molecular con la proteína no glicosilada de 60 kDa (Figura 2) visualizada por coloración de plata reversa (decolorada).

Se seleccionaron cuatro bandas, dos de ellas comunes a los cuatro estadios no glicosiladas (dupleta 62/60 y 30 kDa) y de comportamiento diferente frente a ambos sueros antes y después del tratamiento con periodato. Los resultados fueron de difícil interpretación y las posibles explicaciones podrían ser: (a) que la diferencia en pesos molecular entre los colocados y los revelados pudo ser debido a error humano al manipular los tubos ya que cada una de las fracciones de los diferentes estadios de las

diferentes electroeluciones fueron identificados por SDS-PAGE y tinción de Coomassie-Plata (resultados no mostrados), por lo que no se consideró necesario identificar las fracciones mezcladas y concentradas para no repetir la tinción de Coomassie-Plata y ahorrar los antígenos necesarios para los ensayos subsiguientes; (b) que haya habido problemas en la tinción con algún reactivo por cuanto no debió revelarse los marcadores de peso molecular con tinción oscura sino como bandas transparentes (tinción de plata reversa) como se aprecia en el gel de la Figura 2, y en este caso aunque se ven algunas bandas más claras cerca de los marcadores de peso molecular la tinción dominante resaltan las proteínas marcadores de peso molecular y (c) que en la fracción seleccionada estén contenidas alguna glicoproteína, por cuanto la resolución del equipo de electroelución separa 30 bandas y podría estar en el tubo con la dupleta 67/65 kDa, la glicoproteína de 66 kDa reveladas en el gel de los perfiles totales (Figura 2) y que en otras fracciones estén contenidas otras glicoproteínas. Indicando que es necesario resolver aún más estas fracciones antes de usarlas como bandas individuales.

Los resultados obtenidos con la fracción de 110 kDa en los epimastigotas (E1, Figuras 6A y 6B) indican que ese antígeno es revelado por anticuerpos dirigidos unos contra la epitopes glucídicos y otros contra epitopes peptídicos de forma tal que antes y después del tratamiento se revelan con igual intensidad, mientras que con el antígeno de 75/69 kDa (canales E2, Figuras 6A y 6B) indican que los anticuerpos que identifican ese antígeno están dirigidos principalmente contra epitopes glicídicos del antígeno. Similarmente, en el estadio amastigota (canales A2, Figura 6A y 6B) se aprecia que antes del tratamiento el suero identifica con alta intensidad a la fracción 67/65 kDa y después de oxidar la revela con muy baja intensidad indicando que los anticuerpos están dirigidos predominantemente contra la región glicosídica del antígeno. El incremento en intensidad en los antígenos de metacíclicos (canales M1, Figuras 6A y 6B) donde se aprecia incremento en la intensidad después del

tratamiento podría ser explicado debido a que al oxidar la región glicídica se facilita el acceso a anticuerpos dirigidos contra epitopes peptídicos y en el caso de las fracciones reveladas en los canales T1 (Figuras 6A y 6B), además de indicar que esos antígenos son revelados por anticuerpos dirigidos contra epitopes glicosilados y no-glicosilados sugiere la posibilidad de haberse colocado exceso de antígeno de manera que el tratamiento con periodato no consiguió una oxidación completa de los residuos glicosilados.

Nuestra hipótesis de trabajo proponía que al ofertar como antígeno una proteína no glicosilada altamente inmunógena a un suero pool chagásico, este antígeno tenía que ser revelado antes y después del tratamiento con periodato y que no debía incrementar su intensidad y que al ser común a los cuatro estadios debería tener utilidad para detectar fases de la enfermedad. Como en los canales de epimastigotas no se colocaron las bandas de 85, 67/65, 62/60 y 30 kDa la premisa de ofertar un antígeno común a los cuatro estadios no se cumplió y se excluye la posibilidad de estudios posteriores para detectar fases de la enfermedad. El carácter altamente antigénico se cumplió para las fracciones 67/65 kDa de metacíclicos, amastigotas y tripomastigotas y se mantiene después del tratamiento con periodato en metacíclicos y tripomastigotas (estadios infectivos del parásito), pero se atenúa dramáticamente en los amastigotas después del tratamiento (canales M2, A2 y T2, Figuras 6 y 7). Similarmente ocurrió con la fracción de 30 kDa en los metacíclicos y tripomastigotas que no fueron revelados en los amastigotas. El carácter de fracción no glicoproteica y altamente antigénica se cumplió para la dupla 62/60 kDa de los amastigotas y tripomastigotas (canales A1 y T1, Figuras 6A y 7A) pero se mantiene con igual intensidad en los tripomastigotas y se atenúa en los amastigotas (canales A1 y T1, Figuras 6B y 7B). El hecho que no se noten diferencias acentuadas en los luminogramas revelados antes y después del tratamiento con ambos sueros (Figuras 6 y 7) indican que aun cuando el suero pool chagásicos es una mezcla de 10 sueros de

pacientes, los anticuerpos que conforman esos sueros revelan los mismos antígenos que un suero individual.

Se ha reportado que la migración de glicoproteínas en SDS-PAGE es afectada por el grado de glicosilación mostrando diferentes pesos moleculares para una misma glicoproteína. La mucina (principal aceptor de ácido siálico) tiene una migración poli dispersa de 60-200 kDa en tripomastigotas derivados de cultivo de tejidos (34), la cual migra como dupleta o tripleta (entre 35 y 50 kDa) en metacíclicos (35). Trabajos previos de nuestro laboratorio permitieron obtener un antisuero preparado en conejos contra una mezcla proporcional de los estadios tripomastigotas, epimastigotas, metacíclicos y amastigotas de *T. cruzi*, de ahí que se identifique como anti-TEMA y que revela diferencialmente glicoproteínas específicas de cada uno de los estadios (14, 36).

Ante la eventualidad que las fracciones electroeluídas contuviesen un alto contenido de glicoproteínas que modifican su migración en el SDS-PAGE, se consideró de interés confirmar la presencia de glicoproteínas en las fracciones utilizadas incubando las mismas membranas de las Figuras 6 y 7 en el suero anti-TEMA. Fue evidente de estos resultados que en los epimastigotas no se colocaron las fracciones ofertadas y en E2 se ofertó solo una de las fracciones (67 kDa), igualmente en M1 solo una de las bandas (85 kDa), en M2 las dos bandas adecuadas (67 y 30 kDa) y probablemente con migración modificada la de 72 kDa. En A1 también se colocaron las fracciones ofertadas, la de 85 kDa con migración modificada (90 kDa) y la de 62/60 kDa, en A2 se ofertó solo una de las fracciones de 67/65 kDa que pudieron migrar como bandas separadas; en T1 coinciden con las fracciones seleccionadas (85 y 62 kDa) y en T2 hubo coincidencia con una de las fracciones ofertadas (65 kDa) y tal vez hubo migración modificada al revelar una banda de 72 kDa.

El análisis del comportamiento de anti-TEMA en su capacidad de revelar fracciones glicosiladas indicó que en E2 la fracción de 67 kDa es una glicoproteína y que la de 85 kDa parece ser detectada por anticuerpos dirigidos contra epitopes no glicosilados que tienen acceso al epitope después de la oxidación de la región glicídica. En M1 anti-TEMA reveló la banda de 85 kDa y en M2 las de 72, 67 y 30 kDa con mayor intensidad después del tratamiento indicando que son reconocidas por anticuerpos dirigidos contra epitopes glicosilados y no glicosilados y confirma el carácter glicoproteico de la banda de 67 kDa (M2) al no ser revelada después de la oxidación con periodato. Las fracciones seleccionadas procedentes de amastigotas en A1 (90 y 62/60 kDa) y en A2 (67 y 65 kDa) reveladas muy intensamente antes y no reveladas o reveladas con muy baja intensidad después, indica que son glicoproteínas detectadas por anticuerpos principalmente dirigidos contra antígenos glicosilados. Similar situación ocurrió con las fracciones derivadas de tripomastigotas. El hecho que la fracción de 62/60 kDa no haya sido detectada por anti-TEMA después de tratar con periodato pudiera ser debido a que se trabajó con una dilución de 1/3500 y que está sobre el límite de detección de ese anticuerpo. En el curso de la experimentación se evidenció la necesidad de obtener purificado por lo menos la fracción de 60 kDa por ser el antígeno más conveniente para hacer los estudios serológicos subsiguientes (ELISA, serología convencional) y solucionar la paradoja de buscar una proteína antigénica no glicosilada que incremente su intensidad después de eliminar el impedimento estérico de las regiones glicídicas.

En la búsqueda de un abordaje novedoso para diagnosticar la enfermedad de Chagas mediante la detección de anticuerpos dirigidos contra epitopes no glicosilados el primer obstáculo a sobrepasar es la obtención de antígenos que oferten epitopes no glicosilados de utilidad diagnóstica. Estos resultados representan una primera aproximación a este reto evidenciando los problemas que deben ser solucionados

usando esta metodología. A pesar que estos resultados no constituyen evidencias concluyentes de cual fracción antigénica podría ser la mejor para ampliar los estudios a otras técnicas serológicas convencionales, no obstante, arroja una visión interesante de los anticuerpos elicitados en las infecciones crónicas de pacientes chagásicos.

CONCLUSIONES

Del estudio realizado las conclusiones más relevantes fueron:

- 1.- Son escasas las investigaciones orientadas a diagnosticar la enfermedad de Chagas mediante la detección de anticuerpos dirigidos contra epitopes no glicosilados.
- 2.- Las cuatro morfologías principales de *Trypanosoma cruzi* presentan perfiles proteicos y glicoproteicos diferentes y estadio-específicos.
- 3.- Cada estadio representa una oferta antigénica diferente tanto para un suero pool como para un suero individual.
- 4.- Cada estadio es diferencialmente reconocido por un suero pool de pacientes chagásicos y por un suero individual, a pesar que se inmuno-detectan antígenos comunes a cuatro, tres y dos estadios.
- 5.- La oxidación de los epitopes glicosilados de los estadios modifica la oferta antigénica de manera diferente en cada estadio para el suero pool y para el suero individual.
- 6.- Los anticuerpos en los sueros de los pacientes chagásicos no están preferencialmente dirigidos contra una fracción (glicosilada o no) o un estadio en particular, como se deriva de las conclusiones anteriores (4ta y 5ta).

- 7.- Se evidencia que hay al menos un antígeno de 60 kDa no glicosilado que debe ser más intensamente investigado antes de descartar su utilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

- 8.- Se cumplieron los objetivos de este trabajo al poner en contacto el estudiante con la experiencia de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hómez J, Soto R, De Soto ST, Méndez H, Mármol P. Parasitología. 10^a ed. Editorial de la Universidad del Zulia (EDILUZ). Zulia, Venezuela. 2004; p.202-223.
2. Herrera L, Águila CM, Brito A, Morocoima A. Conocimiento y riesgo de infección para la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas en áreas rurales en Venezuela. *Salus* 2007; 11(1): 27-31.
3. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Programa de control de la enfermedad de Chagas. Caracas: Ministerio de Salud y Desarrollo Social; 2000.
4. Cannova DC, Arvelo L, Simons MI. Seroepidemiología de Tripanosomiasis Americana sector Las Cuevas Estado Carabobo. *Salus* 2003; 7(1): 28-33.
5. Alarcón de NB, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, *et al.* Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis* 2010; 201: 1308-1315.
6. Martínez Díaz RA. Variabilidad intraespecífica en *Trypanosoma cruzi* y ensayo de nuevos métodos para el cribado farmacológico (tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid (España): 1997. [acceso 21 de marzo del 2012] Disponible en: <http://eprints.ucm.es/tesis/19911996/X/3/X3035501.pdf>
7. De Souza W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Design* 2002; 8: 269-285.

8. Rey L. Parasitología. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editores; 2001. p. 151-160.
9. Gomes YM, Lorena VM, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104: 115-121.
10. Guhl, F. *Trypanosoma cruzi* specific glycoproteins for discriminative serological diagnosis of South American Trypanosomiasis (Chagas's disease). Mem Inst Oswaldo Cruz 1990; 85(4): 531-532.
11. Schechter M, Flint JE, Voller A, Guhl F, Marinkelle CJ, Miles MA. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas' disease). Lancet 1983; 2(8356): 939-941.
12. Contreras VT, Palmegiani J, Genovese G, Henríquez M, Navarro MC, De Lima AR. Discriminación de fases de la enfermedad de Chagas empleando fracciones glicosiladas de *Trypanosoma cruzi*. Acta Cient Venez 1999; 50(2): 263. XLIX Convención anual de AsoVAC. 1996; Nov 14-19; Maracay, Venezuela.
13. De Lima AR, Farías MN, Tortolero E, Navarro MC, Contreras VT. Purificación parcial y empleo de fracciones glicosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Acta Cient Venez 2001; 52(11): 235-247.

14. De Lima AR, Arteaga R, Zorrilla G, Garboza R, Flores G, Araque W, *et al.* Glicoproteínas estadio específicas de *Trypanosoma cruzi*. Acta Cient Venez 1996; 47(1): 211. XLVI Convención anual de AsoVAC. 1996; Nov 17-22; Barquisimeto, Venezuela.
15. Araque W, De Lima AR, Flores G, Garboza R, Arteaga R, Delgado V, *et al.* Efecto del cultivo axénico sobre las glicoproteínas de *Trypanosoma cruzi*. Acta Cient Venez 1996; 47(1): 212. XLVI Convención anual de AsoVAC. 1996; Nov 17-22; Barquisimeto, Venezuela.
16. Xu BX, Powell MR. Carbohydrate epitopes are responsible for antibody cross-reactivity in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. J Parasitol 1991; 77: 808-810.
17. Contreras V. Elementos de apoyo para trabajar en enfermedad de Chagas. Clemente Editores, C.A. Valencia, Venezuela. 1994. p.35-47.
18. Mendes RP, Hoshino-Shimizu S, Moura da Silva AM, Mota I, Heredia RAG, Luquetti AO, *et al.* Serological diagnosis of Chagas' disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. J Clin Microbiol 1997; 35: 1829-1834.
19. Tanuri A, Andrade PP, Almeida DF. A simple, highly efficient plating method for tripanosomatids. J Protozool 1981; 28: 360-362.
20. Goitia-Aular M, Boiso JF. Cultivo de *Trypanosoma cruzi* (cepa Elpidio Padrón) en un medio semidefinido. Efecto de algunas variaciones en la composición y condiciones del mismo. Acta Cient Venez 1982; 33: 488-496.

21. Contreras VT, Morel CM & Goldenberg S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biol Parasitol* 1985; 14: 83-98.
22. Andrews NW, Hong K, Robbins ES & Nussenzweig V. Stage-Specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 1987; 64: 474-484.
23. Contreras VT, Salles JM, Thomaz N, Morel CM & Goldenberg S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biol Parasitol* 1985; 16: 123-133.
24. Contreras VT, Navarro MC, De Lima AR, Arteaga R, Duran F, Askue J, *et al.* Production of Amastigotes from Metacyclic Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(8): 1213-1220.
25. Navarro MC, De Lima AR, Askue J & Contreras VT. Morphological Comparison of Axenic Amastigogenesis of Trypomastigotas and Metacyclic of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98(1): 83-91.
26. Herbert B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 1999; 20(4-5): 660-663.
27. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

28. De Moreno MR, Smith JF y Smith RV. Silver staining of proteins in polyacrilamide gels: increased sensitivy through a combined blue-silver stain procedure. *Anal Biochem* 1985; 151: 466-470.
29. Moller HJ, Poulsen JH. Staining Glycoproteins/Proteoglycans on SDS PAGE. In: *The Protein Protocols Hanbook*. 2nd Edition. Edited by: J.M. Walker. Humana Press Inc, Totowa, NJ. 1996; 99: 627-631.
30. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
31. Lebediker, M. Protein Precipitation Protocols. In *The Protein Purification Facility*. The Wolfson Centre for Applied Structural Biology. The Hebrew University of Jerusalem. Copyright ©, 2002, Tomado de: <http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/ProteinPrecipitation.html>
32. Towbin H, Staehelin T y Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76(2): 4350-4354.
33. Fukuda M. Cell surface carbohydrates: cell-type specific expression. *Molecular Glycobiology*. Ed. Minoru Fukuda and Ole Hindsgaule. Series Editors: B.D. Hames and D.M. Glover. IRL PRESS. Published in the United States by Oxford University Press Inc., Oxford, New York, Tokyo. 1994.

34. Almeida de Faria M, Freymuller E, Colli W, Alves MJ. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp Parasitol* 1999; 92(4): 263-274.
35. Yoshida N, Mortara RA, Araguth MF, Gonzalez JC and Russo M. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35 and 50 kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 1989; 57(6): 1663–1667.
36. Zorrilla G, De Lima AR, Arteaga R, Garboza R, Flores G, Araque, *et al.* Obtención de antisueros contra estadios de *Trypanosoma cruzi*. *Acta Cient Venez* 1996; 47(1): 216. XLVI Convención anual de AsoVAC. 1996; Nov. 17-22; Barquisimeto, Venezuela.