



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA

---

---

UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

AISLAMIENTO DE UN PÉPTIDO DE *Trypanosoma cruzi*  
(*Sarcomastigophora: Kinetoplastida*) OBTENIDO POR  
cDNA Y SU USO EN EL DIAGNÓSTICO DE LA  
ENFERMEDAD DE CHAGAS

TESIS QUE PRESENTE LA

**Q.F.B. GUILLERMINA CAMPOS VALDÉZ**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Tutora:

Dra. Enedina Jiménez Cardoso

Asesor:

Dr. Humberto González Márquez

Asesor:

Dr. Edmundo Bonilla González

Asesor:

Dr. Miguel Macías Vega

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, formó parte del padrón de programas de postgrado de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 309-0; y actualmente se encuentra dentro del padrón de programas del PIFORP-CONACYT clave C/PFPN-2002-35-32.

AISLAMIENTO DE UN PÉPTIDO DE *Trypanosoma cruzi*  
(*Sarcomastigophora: Kinetoplastida*) OBTENIDO POR cDNA  
Y SU USO EN EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE  
CHAGAS

TESIS QUE PRESENTA LA

Q.F.B. GUILLERMINA CAMPOS VALDÉZ

Para optar por el grado de

Maestra en Biología Experimental

Tutora

Dra. ENEDINA JIMÉNEZ CARDOSO

Asesor

Dr. HUMBERTO GONZÁLEZ MARQUEZ

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA

# COMITÉ TUTORAL

Tutora de Tesis

Dra. Enedina Jiménez Cardoso

Laboratorio de Investigación en Parasitología

Hospital Infantil de México Federico Gómez

[enedina@servidor.unam.mx](mailto:enedina@servidor.unam.mx)

Asesor

Dr. Humberto González Márquez

Departamento de Ciencias de la Salud

UAM-I

[hgm@xanum.uam.mx](mailto:hgm@xanum.uam.mx)

Asesor

Dr. Edmundo Bonilla González

Departamento de Ciencias de la Salud

UAM-I

[mundo@xanum.uam.mx](mailto:mundo@xanum.uam.mx)

Asesor

Dr. Miguel Macías Vega

Departamento de Genética Humana

INP

[prometeom@yahoo.com.mx](mailto:prometeom@yahoo.com.mx)

Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 16 de diciembre, 2003.

---

Dra. Enedina Jiménez Cardoso

---

Dr. Humberto González Márquez

---

Dr. Edmundo Bonilla González

---

Dr. Miguel Macías Vega

---

Dr. Victor Manuel Monteón Padilla



**CASA ABIERTA AL TIEMPO**

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Investigación en Parasitología del Hospital Infantil de México Federico Gómez bajo la dirección de la Dra. Enedina Jiménez Cardoso y en el laboratorio de Expresión Génica del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa bajo la dirección del Dr. Humberto González Márquez y del Dr. Edmundo Bonilla González.

## *Agradecimientos*

*Dedico este trabajo a la memoria de una gran mujer que vivió una vida ejemplar: Natalia Lamegos Carranza, en donde quiera que estés.*

*A Dios por la fuerza para seguir adelante.*

*A mis Padres por no dejarme sola.*

*A Iván y Esteban por darme su tiempo.*

*A tí, mi querido G... aunque no quieras reconocimientos.*

*A la Dra. Jiménez por su apoyo.*

*Al Dr. Humberto González por los conocimientos adquiridos y por guiar mis estudios de Maestría hasta el final.*

*Al Dr. Edmundo Bonilla por su valioso apoyo en la elaboración del trabajo, por su material y por su amistad.*

*Al Dr. Miguel Macías por su tiempo.*

*A mis compañeros del laboratorio de Investigación en Parasitología.*

*A mis amigas y amigos del laboratorio de Expresión Génica.*

*A mis queridas amigas de la Maestría: Silvia, Adriana, Ethel, Claudia y a Pilar Crisóstomo y Vicenta Cazares.*

*A la Dra. Laura Pérez .*

*Y a todos aquellos que alguna vez tuvieron a bien ayudarme a realizar mi trabajo.*

# 1. ABREVIATURAS.

---

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNAk: Ácido desoxirribonucleico de kinetoplasto

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

RNAs: Ácido ribonucleico

pb: pares de bases

µg: microgramos

ml: mililitros

ELISA: Prueba de inmunoadsorción

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

HAI: Hemaglutinación indirecta

FC: Fijación de complemento

AD: Aglutinación indirecta

Kb: Kilo bases

KDa: Kilo Daltons

mM: mili molar

mm: mili metros

µm: micrómetros

mg: miligramos

ng: nano gramos

pmol: pico mol

LIT: Liver Infusion Triptone

µl: microlitros

U: Unidades enzimáticas

ATP: Trifosfato de adenosina

dNTPs: desoxinucleotido trifosfato

ddNTPs: dideoxinucleotidos trifosfato

UV: Ultra violeta

DO: Densidad Óptica

x g: gravedades

p/v: peso volumen

v/v: volumen-volumen

d.d.e.: Destilada desionizada y estéril

c.b.p: cuanto baste para

PCR: Polimerase Chain Reaction



## 2. ÍNDICE

---

1.	ABREVIATURAS.....	1
2.	ÍNDICE .....	2
3.	ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS.....	6
4.	ÍNDICE DE TABLAS.....	9
5.	RESUMEN.....	10
6.	INTRODUCCIÓN.....	12
6.1.	DEFINICIÓN.....	12
6.2.	SINÓNIMOS.....	12
6.3.	HISTORIA .....	12
6.4.	BIOLOGÍA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	13
6.4.1.	Taxonomía del parásito.....	13
6.4.2.	Morfología .....	15
6.4.3.	Ciclo vital.....	20
6.5.	TRANSMISIÓN DE <i>T.cruzi</i> .....	22
6.5.1.	Ciclos de transmisión .....	22
6.5.2.	Principales mecanismos de transmisión .....	22
6.6.	VECTORES.....	24
6.7.	EPIDEMIOLOGÍA.....	26
6.8.	MORBILIDAD Y MORTALIDAD .....	28
6.9.	FASES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS .....	28
6.9.1.	Fase aguda .....	28
6.9.2.	Fase indeterminada.....	29
6.9.3.	Fase crónica.....	30
6.10.	DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS .....	33
6.10.1.	Diagnóstico directo .....	33
6.10.2.	Diagnóstico indirecto .....	34
6.10.3.	Diagnóstico molecular .....	35
6.10.4.	Diagnóstico por Tecnología del DNA recombinante .....	35

7.	JUSTIFICACIÓN .....	37
8.	HIPÓTESIS .....	37
9.	OBJETIVO GENERAL.....	38
9.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
9.1.1.	Mantener en cultivo un aislado mexicano de <i>T.cruzi</i> obtenido de vector. 38	
9.1.2.	Construir una genoteca de cDNA de epimastigotes de un aislado mexicano de <i>T.cruzi</i> .....	38
9.1.3.	Identificar los péptidos que reaccionen con anticuerpos anti- <i>T.cruzi</i> presentes en el suero de pacientes chagásicos.....	38
9.1.4.	Determinar la secuencia del los péptidos.....	38
10.	MATERIAL .....	39
10.1.	SOLUCIONES .....	39
10.2.	VECTORES .....	39
10.3.	BACTERIAS.....	39
10.4.	BACTERIOFAGOS .....	40
10.5.	ANIMALES.....	40
10.6.	MEMBRANAS.....	40
10.7.	ENZIMAS .....	40
10.8.	OLIGONUCLEÓTIDOS.....	40
10.9.	NUCLEÓTIDOS .....	41
10.10.	KITS COMERCIALES.....	41
10.11.	PROGRAMAS INFORMÁTICOS .....	41
11.	MÉTODOS.....	42
11.1.	PARÁSITO.....	42
11.2.	CULTIVO DE PARÁSITOS.....	42
11.3.	CLONACIÓN DE LA GENOTECA DE <i>T.cruzi</i> MEDIANTE EL SISTEMA ZAP Express II .....	43
11.3.1.	Síntesis de cDNA.....	43
11.3.2.	Digestión con EcoRI .....	44

11.3.3.	Cuantificación de cDNA en placas de agar con Bromuro de Etidio 44	
11.3.4.	Ligación al vector ZAP Express y Empaquetamiento. ....	45
11.3.5.	Titulación, Porcentaje de Recombinantes y Amplificación de la Genoteca 45	
11.3.6.	Confirmación de moléculas recombinantes por PCR de los insertos de cDNA de la genoteca.....	46
11.4.	INMUNODETECCIÓN .....	47
11.5.	ESCISIÓN IN VIVO DEL VECTOR ZAP Express II.....	48
11.6.	CLONACIÓN DE LA GENOTECA DE <i>T.cruzi</i> MEDIANTE EL SISTEMA TOPO TA. ....	49
11.6.1.	Cuantificación del cDNA por espectrofotometría .....	49
11.6.2.	Ligación al vector pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO.....	50
11.6.3.	Transformación de <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ -T1 <sup>□</sup> .....	50
11.6.4.	Análisis de la Genoteca clonada en pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO .....	50
11.6.5.	Western blot.....	50
11.7.	AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO .....	51
11.8.	SECUENCIACIÓN.....	51
12.	RESULTADOS.....	53
12.1.	CULTIVO DE PARÁSITOS.....	53
12.2.	CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS DE cDNA.....	55
12.3.	INMUNODETECCIÓN .....	58
12.4.	GENOTECA CLONADA EN EL SISTEMA TOPO TA.....	62
13.	DISCUSIÓN .....	67
14.	CONCLUSIONES .....	71
15.	BIBLIOGRAFÍA.....	72
16.	ANEXO 1 .....	77
16.1.	Preparación de soluciones.....	77
16.1.1.	Fosfato bufferado salino, PBS pH = 7.4.....	77
16.1.2.	Solución de Lisis-RT.....	77
16.1.3.	H <sub>2</sub> O DEPC .....	77

16.1.4.	Amortiguador de carga de electroforesis de DNA.....	77
16.1.5.	Solución de Bromuro de Etidio 10 mg/ml.....	78
16.1.6.	Amortiguador SM.....	78
16.1.7.	Amortiguador TAE .....	78
16.1.8.	Amortiguador TBE .....	78
16.1.9.	Amortiguador TE.....	78
16.1.10.	Amortiguador TBS .....	78
16.1.11.	Amortiguador TBS-A.....	79
16.1.12.	Amortiguador TBS-T.....	79
16.1.13.	Solución de 4-Cloro-1-naftol .....	79
16.1.14.	Solución de IPTG 10 mM.....	79
17.	ANEXO 2 .....	80
17.1.	Medios de Cultivo .....	80
17.1.1.	Medio LIT (Liver-Infusion-Triptona).....	80
17.1.2.	Medio LB (Luria-Bertani).....	81
17.1.3.	Placas de LB-Agar.....	82
17.1.4.	Medio NZY Top-agar .....	82
17.1.5.	Membranas de nitrocelulosa impregnadas con IPTG 10 mM.....	82
17.1.6.	Placas de agar con Bromuro de Etidio .....	83
18.	ANEXO 3 .....	84
18.1.	Esquemas de Inmunización de Animales .....	84
18.1.1.	Esquema para inmunizar conejo. ....	84
18.1.2.	Esquema de inmunización de ratón.....	84
19.	ANEXO 4 .....	85
19.1.	Técnicas complementarias. ....	85
19.1.1.	Dot-blot .....	85
19.1.2.	Preparación de lisados de <i>E.coli</i> para absorción de anticuerpos anti- <i>E.coli</i>	85
20.	ANEXO 5. Mapa de restricción de los vectores utilizados. ....	86

### 3. ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS.

---

<b>Figura 1.</b> Clasificación Taxonómica de la familia <i>Trypanosomatidae</i> . Fuente: Cruz RA, 2001.....	14
<b>Figura 2.</b> Esquema de la ultraestructura de un amastigote visto con microscopio electrónico (izquierda) y microscopio de luz (derecha). F=Flagelo; K=Kinetoplasto y N=Núcleo. Fuente: Cruz RA. 2001.....	15
<b>Figura 3.</b> Esquema de la ultraestructura de un promastigote visto con microscopio electrónico (izquierda) y microscopio de luz (derecha). F= Flagelo; M= Membrana Plasmática; N= Núcleo y CB= Cuerpo Basal. Fuente: Cruz RA. 2001. ....	16
<b>Figura 4.</b> Esquema de la ultraestructura de un epimastigote visto con microscopio electrónico (izquierda) y con microscopio de luz (derecha). F= Flagelo; K= Kinetoplasto; MO= Membrana Ondulante y N= Núcleo. Fuente: Cruz RA, 2001..	17
<b>Figura 5.</b> Esquema del tripomastigote de <i>T.cruzi</i> visto en microscopio electrónico. F= Flagelo; MO= Membrana Ondulante; K= Kinetoplasto y N= Núcleo. Fuente: Cruz RA, 2001.....	18
<b>Figura 6.</b> A) Forma típica en “C”: 1, Núcleo; 2, Cuerpo basal; 3, Cinetoplasto; 4, Axonema; 5, Membrana ondulante; 6, Flagelo y 7, Probóscide. B) Huésped invertebrado: Chinche hematófago. C-H) Algunos huéspedes vertebrados comunes: C, humano; D, murciélago; E, Tlacuache; F, Armadillo; G, Perro; H, Gato. Ciclo de vida de <i>T.cruzi</i> : a) Tripanosoma metacíclico que entró a la sangre a través de la infección con heces de una chinche infectada cuando se alimenta; b) El tripanosoma penetra al macrófago; c) El tripanosoma cambia al estado de amastigote; d) Se multiplican los amastigotes; e) Se transforma el amastigote en epimastigote y se multiplica; f) El epimastigote se transforma a tripomastigote, el cual rompe las células y escapa al torrente sanguíneo; g) tripomastigotes libres en sangre; h-n) Se repite el ciclo lo que ocasiona que aparezcan parásitos en sangre periódicamente; o) Los tripomastigotes penetran músculo esquelético, cardiaco, células del retículo endotelial, hígado, bazo y medula ósea. Fuente: Cheng. 1996. ....	21

<b>Figura 7.</b> Distribución geográfica del <i>Trypanosoma cruzi</i> . Fuente: OPS, 1994.....	24
<b>Figura 8.</b> Estadios de <i>Rhodnius prolixus</i> , vector transmisor de <i>T.cruzi</i> .....	25
<b>Figura 9.</b> Signo de Romaña en una niña, característico en fase aguda de la enfermedad de Chagas. El edema de los dos párpados del ojo derecho y la mejilla es acompañado de linfadenopatía preauricular y conjuntivitis. Fuente: Chester, 1994.....	29
<b>Figura 10.</b> Fases de desarrollo de un corazón con Cardiopatía Chagásica Crónica con dilatación de las cavidades, aneurisma apical en ventrículo izquierdo y adelgazamiento de las paredes ventriculares. Fuente: Botero, 2001 .....	31
<b>Figura 11.</b> Megaesófago en adulto con enfermedad de Chagas crónica. Fuente: Botero, 2001 .....	32
<b>Figura 12.</b> Megacolon en adulto con enfermedad de Chagas crónica. Fuente: Botero, 2001 .....	32
<b>Figura 13.</b> Cámara de Neubauer. Se observan los cuadrantes contados y las X indican la forma de conteo. Fuente: Deane, 1984. ....	43
<b>Figura 14.</b> Aislado Campeche de <i>T.cruzi</i> obtenido de un vector y cultivado en medio LIT, vista al microscopio óptico con el objetivo 40X.....	53
<b>Grafica 1.</b> Curva de crecimiento del aislado Campeche de <i>T.cruzi</i> en medio LIT cultivado a 28°C.....	54
<b>Figura 15.</b> Gel de agarosa al 1% del cDNA obtenido de <i>T.cruzi</i> . Carril 1: Low DNA Mass Ladder. Carril 2: High DNA Mass Ladder. Carril 3: Genoteca 1. Carril 4: Genoteca 2. ....	55
<b>Figura 16.</b> Placa de agar con Bromuro de Etidio para cuantificar la concentración del cDNA. Se observa que la [cDNA] = >50 µg.....	56
<b>Figura 17.</b> Tamaño de los insertos presentes en la genoteca de cDNA de <i>T.cruzi</i> en ZAP Express II. Los insertos de algunos clones seleccionados al azar que fueron amplificados por PCR y separados en geles de agarosa al 1%. Carril 1 y 2: Clonas sin inserto. Carril 3-6: Clonas con inserto.....	57
<b>Figura 18.</b> Placa de NZY-agar-Tetra-IPTG-Xgal en la cual se reconocen colonias con inserto (blancas) y sin el (azules).....	58

<b>Figura 19.</b> Placa de Rx en donde se observan dos clonas identificadas con el suero de personas chagásicas crónicas.....	59
<b>Figura 20.</b> Inmunodetección revelada con 4-CN. Se identificaron 15 clonas con suero adsorbido con proteínas de <i>E.coli</i> .....	61
<b>Figura 21.</b> Gel de agarosa al 1% con las digestiones con EcoRI de las 15 clonas identificadas por Inmunodetección. Carril 1: marcador de pesos moleculares. Carril: 2-10: digestiones.....	61
<b>Figura 22.</b> Placa de LB-Kanamicina/IPTG/X-Gal con genoteca TOPO TA. Las colonias blancas tienen inserto y las colonias azules no.....	63
<b>Figura 23.</b> Gel de agarosa al 1% con las digestiones con EcoR1 de las 15 clonas identificadas por Inmunodetección. Carril 1: marcador de pesos moleculares. Carril2-12: digestiones.....	63
<b>Figura 24.</b> Western blot en membrana de nitrocelulosa de las clonas de <i>T.cruzi</i> del aislado mexicano, identificadas con suero humano positivo adsorbido con proteínas de , dilución 1:20 Carriles del 1-6: clonas 1, 3, 5, 6, 7 y 8 con inserto. Carril 7: clona sin inserto. ....	64
<b>Figura 25.</b> Homología entre la secuencia de la clona M13Tc1 obtenida con la genoteca de <i>T.cruzi</i> clonada en el sistema TOPO TA y la secuencia del gen del RNA ribosomal 18S de <i>Tripanosoma cruzi</i> .....	65

## 4. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución geográfica de Triatominos en América. ....	25
<b>Tabla 2.</b> Análisis de secuencias seleccionadas por Inmunodetección con 4-CN en la genoteca de <i>T.cruzi</i> aislado Campeche.....	60
<b>Tabla 3.</b> Análisis de la secuencia M13Tc1 de <i>T.cruzi</i> aislado Campeche. ....	65
<b>Tabla 4.</b> Análisis de la secuencia M13Tc2 de <i>T.cruzi</i> aislado Campeche. ....	66



## 5. RESUMEN

---

*Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es transmitido a través del contacto con la materia fecal de un triatomino infectado. El diagnóstico de esta parasitosis se realiza mediante la detección de anticuerpos específicos en suero, sin embargo, existen reacciones falsas positivas o reacciones cruzadas con *Leishmania* y *T. rangeli*. El uso de la tecnología de DNA recombinante para la síntesis de péptidos a provocado que la sensibilidad y la especificidad de las pruebas diagnósticas se vea beneficiada. Por tal razón, el objetivo del trabajo fue identificar péptidos de *T. cruzi* de un aislado mexicano, por medio de la construcción de una genoteca de expresión de cDNA, que puedan ser usados para la identificación de anticuerpos presentes en el suero de pacientes chagásicos mexicanos. Se sintetizó cDNA con un método que permite trabajar con pocas células a partir de 300 epimastigotes de *T. cruzi* aislados de un vector proveniente del estado de Campeche y cultivados in vivo en medio LIT. Se utilizaron dos sistemas de clonación: ZAP Express II y TOPO TA. La presencia de clonas recombinantes que expresan un péptido con características antigénicas se determinó por Inmunotransferencia y Western blot, utilizando como anticuerpo primario sueros humanos positivos a la enfermedad de Chagas. Las clonas identificadas fueron secuenciadas por métodos automatizados y su análisis se realizó por la comparación con el banco de secuencias del Centro Nacional de Información Bioquímica (NIH, EUA). De los resultados de secuenciación se obtuvieron las clonas Tc1C y Tc2C con el sistema ZAP Express II y las clonas M13Tc1 y M13Tc2 con el sistema TOPO TA. La secuencia Tc1C no presentó similitud con las secuencias presentes en la base de datos, lo que sugiere que se trata de una secuencia nueva. La clona Tc2 presentó homología con una secuencia de RNA ribosomal 5S de *Homo sapiens*, con un valor de identidad del 99% (509/513), probabilidad de error de 0% y Gaps 0% (2/513). La secuencia de M13Tc1 mostró homología con la secuencia completa de un gen del RNA ribosomal 18S de *T. cruzi*, con un valor de identidad del 99% (387/389),

probabilidad de error de 0% y Gaps 0% (2/389). La clona M13Tc2 presentó homología con pequeñas zonas del cromosoma 17 de humano, sin encontrar similitud estadísticamente significativa. La importancia de haber identificado una proteína nueva radica en la aportación de un nuevo antígeno capaz de identificar anticuerpos presentes en el suero de individuos infectados con *T.cruzi* en etapas tempranas y tardías, con mayor sensibilidad y especificidad, evitando las reacciones cruzadas. Este péptido puede tener aplicación diagnóstica implementando un método mas certero y confiable; así como identificar la importancia que tiene este péptido en las funciones vitales del parásito para utilizarlo como medida de control de *T.cruzi*.

La identificación de RNA ribosomal mediante el uso de antisueros se ha reportado en clonas que expresan secuencias de RNA ribosomal de *Leishmania* que son reconocidas por sueros de *Leishmaniosos*. No hay una explicación definitiva, pero existen antecedentes de enfermedades auto-inmunes en las que se ha descrito la existencia de anticuerpos frente a ciertos motivos de RNA ribosomal.

## 6. INTRODUCCIÓN

---

### 6.1. DEFINICIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por *Trypanosoma cruzi*, parásito intracelular del Sistema Retículo Endotelial, que afecta particularmente al miocardio, esófago y colon. El principal mecanismo de transmisión, es a través del contacto con la materia fecal del artrópodo triatomino hematófago infectado (49).

### 6.2. SINÓNIMOS

Enfermedad de Chagas, enfermedad de Chagas-Mazza, enfermedad de Chagas-Mazza-Romaña o Tripanosomiasis Americana.

### 6.3. HISTORIA

La Enfermedad de Chagas, fue reportada por primera vez en 1909 por el Dr. Carlos Chagas al noroeste del Estado de Minas Gerais en Brasil. Él encontró una gran cantidad de insectos hematófagos de ubicación domiciliaria y hábitos nocturnos, conocidos como “barbeiros” (por picar en el rostro). Estos artrópodos se encontraban infectados con parásitos del género *Trypanosoma*, el Dr. Chagas les llamo *Trypanosoma cruzi* en homenaje al Dr. Oswaldo Cruz (32). En sus investigaciones, Chagas encontró que numerosos animales domésticos estaban parasitados, así mismo observó tripanosomas circulantes en la sangre de una niña de dos años, describiendo los aspectos clínicos, la patogenia, la patología y la epidemiología de esta nueva enfermedad. Algunos investigadores que participaron en el estudio de la enfermedad de Chagas fueron Cesar Guerreiro, Astrongildo Machado, Ezequiel Díaz y Salvador Mazza, entre otros (36).

En México, el Dr. Mazzotti describió la enfermedad en 1940 en una persona proveniente del estado de Oaxaca y, en 1943 al lado del Dr. Chacón describió la infección natural de diversos animales domésticos. El conocimiento de los triatominos inició desde 1528 en los estados de Aguascalientes, Jalisco, parte de Zacatecas, Durango, San Luis Potosí y Nayarit. Actualmente, los casos humanos

se han incrementado sin control y han servido para documentar el estudio de la enfermedad de Chagas en México. En los últimos años, los avances en el conocimiento de la enfermedad se deben al nacimiento de nuevos grupos de trabajo, como el grupo del INDRE, la Facultad de Medicina de la Universidad de Guadalajara, el Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, la Universidad Nacional Autónoma de México, la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, el Instituto de Medicina Tropical Hideyo Noguchi, la Universidad de Yucatán, Laboratorios Estatales de Salud Pública, SS, el Hospital Infantil de México Federico Gómez, entre otros (49).

## **6.4. BIOLOGÍA DE *Trypanosoma cruzi*.**

### **6.4.1. Taxonomía del parásito.**

Reino:	<i>Protista</i>
Subreino:	<i>Protozoa</i>
Phyllum:	<i>Sarcomastigophora</i>
Subphyllum:	<i>Mastigophora</i>
Clase:	<i>Zoomastigophora</i>
Orden:	<i>Kinetoplastida</i>
Familia:	<i>Trypanosomatidae</i>
Género:	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero:	<i>Schizotrypanum</i>
Especie:	<i>cruzi</i>

El subphyllum *Mastigophora* incluye a todos los protozoarios que presentan flagelos en su forma trofozoide. La familia *Trypanosomatidae* pertenece a un grupo biológico peculiar del súper reino *Eukaryota*, clase *Euglenozoa* orden *Cinetoplástida* (Figura 1). Todos los miembros del orden *Cinetoplástida* se caracterizan por la presencia de un organelo peculiar que los define, llamado kinetoplasto, el cual, es una malla de DNA extranuclear localizada en la mitocondria. Entre los kinetoplástidos, se reconocen varios géneros que incluyen

tripanosomas de vida libre (*Proleptomonas*), parásitos de invertebrados solamente (*Crithidia* y *Leptomonas*), parásitos de plantas e invertebrados (*Phytomonas*) y parásitos de vertebrados e invertebrados (*Tripanosomas* y *Leishmania*). El subgénero *Schizotrypanum* se adoptó para designar a los parásitos que se multiplican intracelularmente en los vertebrados, en base a esto el nombre taxonómico completo es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (11, 46).

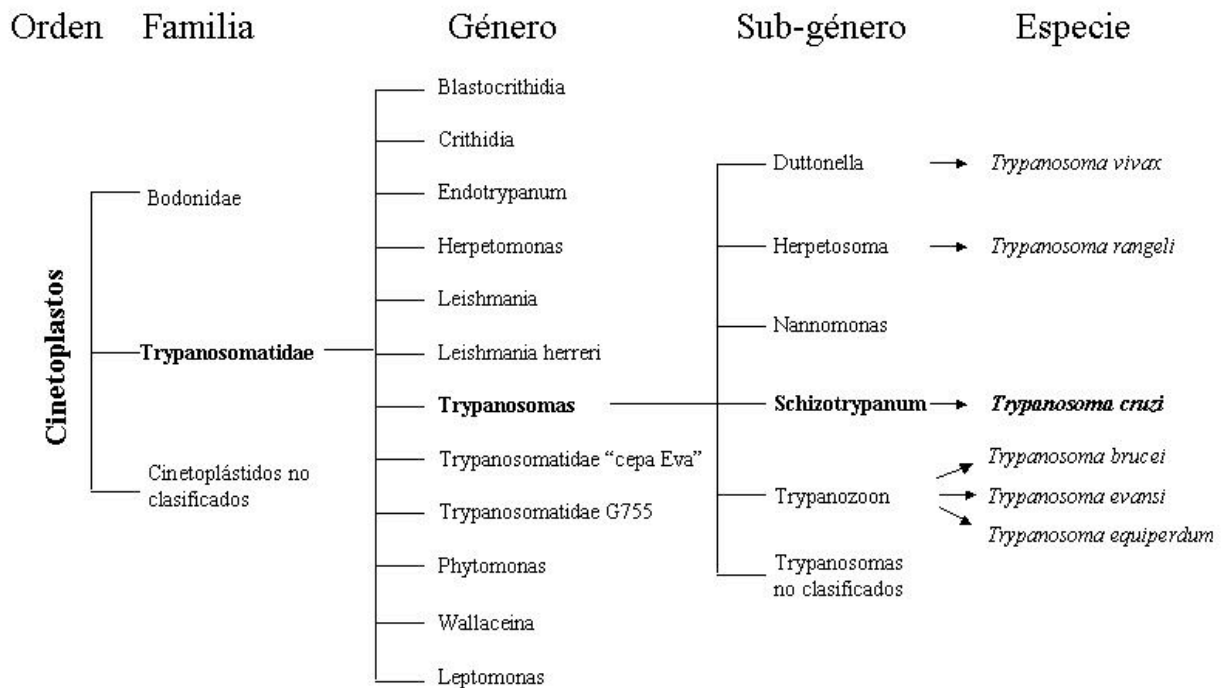
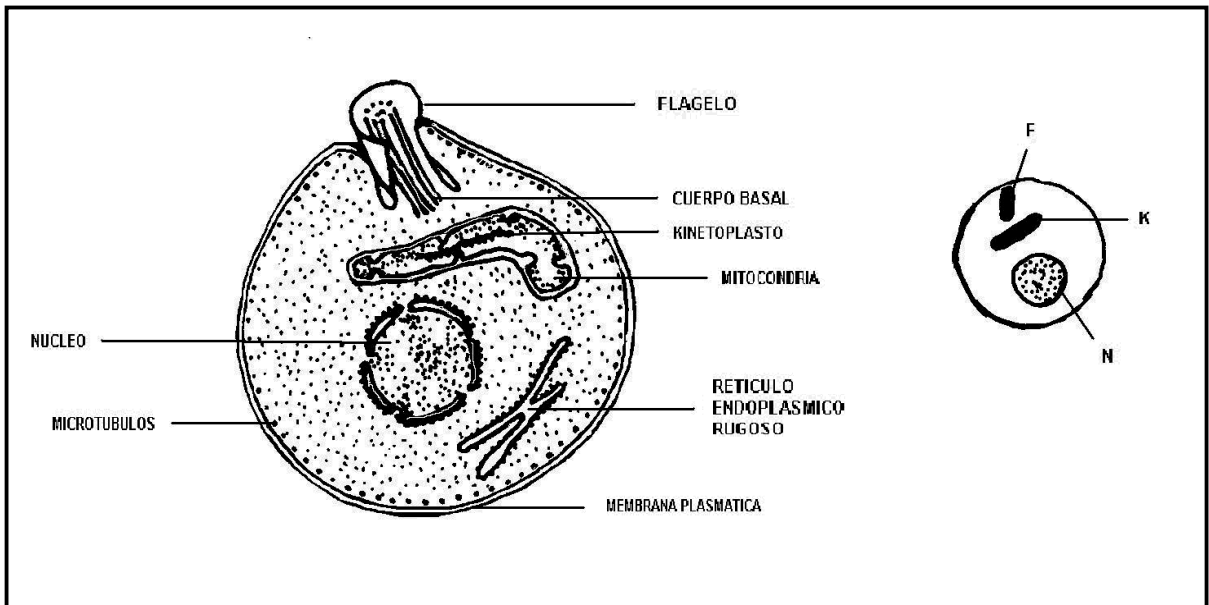


Figura 1. Clasificación Taxonómica de la familia *Trypanosomatidae*. Fuente: Cruz RA., 2001.

### 6.4.2. Morfología

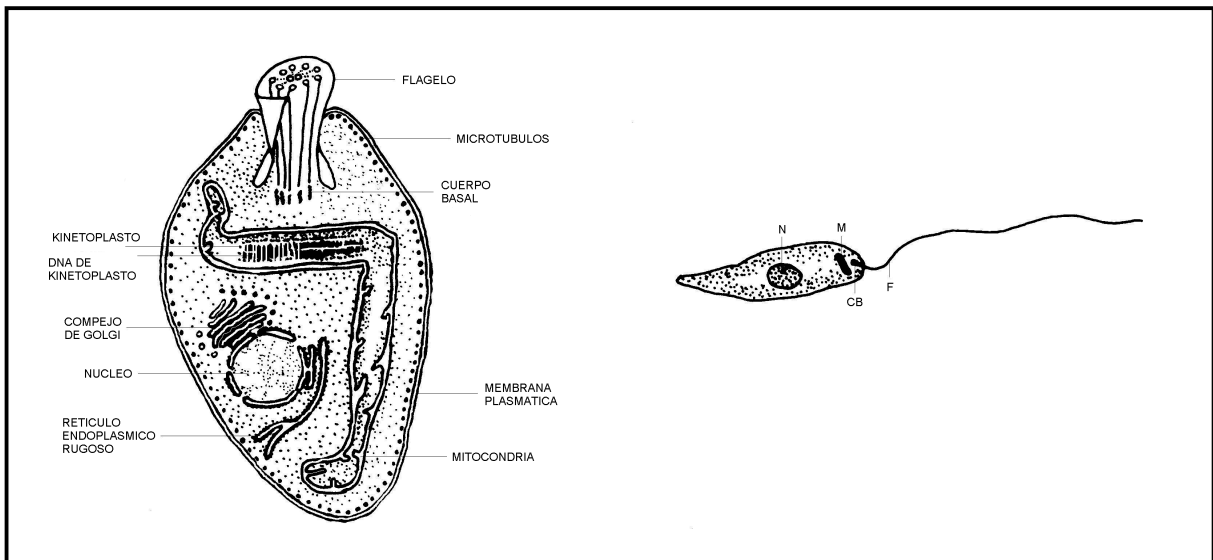
El ciclo de vida de *T. cruzi* comprende cuatro etapas: amastigote, promastigote, epimastigote y tripomastigote (15). Se distinguen entre sí por la posición del kinetoplasto en relación al núcleo y por la presencia o ausencia de una membrana ondulante:

**Amastigote:** Es el estadio de desarrollo intracelular del ciclo de vida de *T. cruzi* en hospedadores vertebrados e invertebrados. Es redondo u ovoide, mide de 1.5 a 5.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, presenta núcleo, kinetoplasto y kinetoplasto, el flagelo esta reducido y envuelto por el citoplasma (Figura 2).



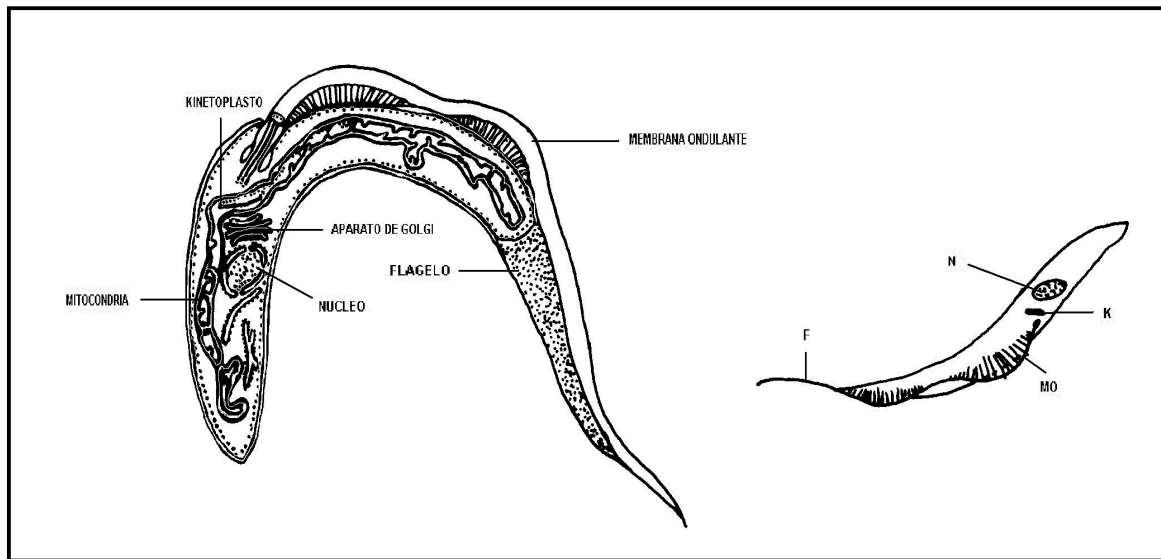
**Figura 2.** Esquema de la ultra estructura de un amastigote visto con microscopio electrónico (izquierda) y microscopio de luz (derecha). F=Flagelo; K=Kinetoplasto y N=Núcleo. Fuente: Cruz RA. 2001

**Promastigote:** Fase extracelular de *T. cruzi* entre amastigote y epimastigote. Su cuerpo es alargado, el kinetoplasto anterior al núcleo, el flagelo libre que emerge del kinetosoma localizado cerca de la región anterior y terminal del cuerpo, carecen de membrana ondulante (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la ultra estructura de un promastigote visto con microscopio electrónico (izquierda) y microscopio de luz (derecha). F= Flagelo; M= Membrana Plasmática; N= Núcleo y CB= Cuerpo Basal. Fuente: Cruz RA. 2001.

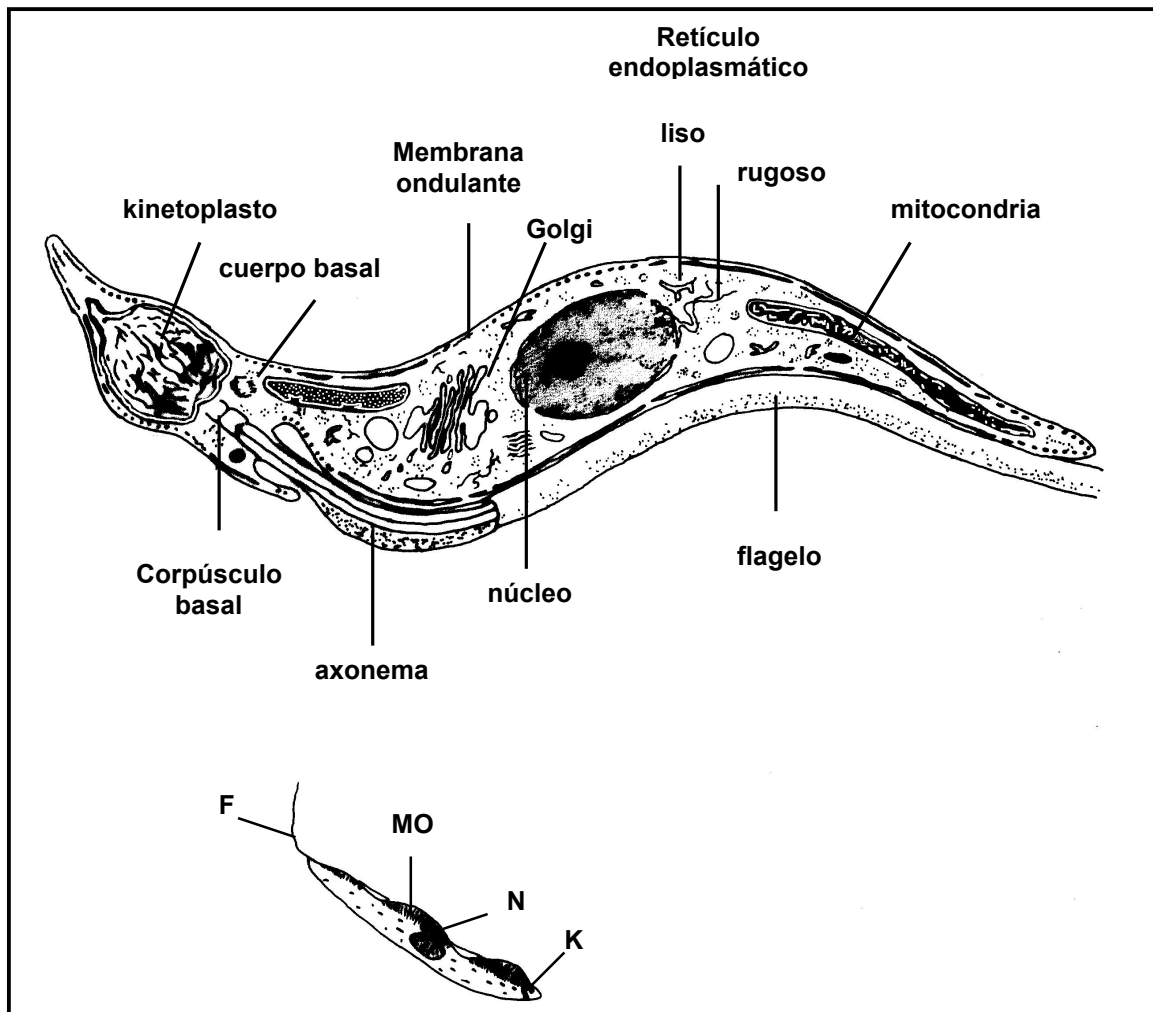
**Epimastigote:** Etapa que presenta un cuerpo alargado, el kinetosoma y kinetoplasto están en la parte media del organismo justo por delante del núcleo, usualmente en la región anterior del cuerpo; el flagelo está dispuesto a lo largo de la membrana ondulante, emerge en la porción anterior distal y se continúa como flagelo libre más pequeño que en los tripomastigotes. Se puede encontrar en el intestino medio del vector y en medios de cultivo (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de la ultra estructura de un epimastigote visto con microscopio electrónico (izquierda) y con microscopio de luz (derecha). F= Flagelo; K= Kinetoplasto; MO= Membrana Ondulante y N= Núcleo. Fuente: Cruz RA, 2001.



**Tripomastigote:** Estadio que presenta cuerpo delgado, se caracteriza por un kinetosoma y kinetoplasto posterior al núcleo, en la porción posterior del parásito. El flagelo libre es moderadamente largo, emerge por un lado del cuerpo y se extiende hacia la región anterior junto con la membrana ondulante y es libre anteriormente. El cuerpo presenta plasticidad, la reproducción ocurre por fisión binaria y durante su ciclo de vida asumen más de una forma, a dicho fenómeno se le conoce como polimorfismo o pleomorfismo. La forma de tripomastigote es la fase infectiva del huésped vertebrado e invertebrado observándose en sangre (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema del tripomastigote de *T. cruzi* visto en microscopio electrónico. F= Flagelo; MO= Membrana Ondulante; K= Kinetoplasto y N= Núcleo. Fuente: Cruz RA, 2001.

Los tripanosomátidos tienen estructuras celulares únicas entre los protozoarios, una de estas son los microtúbulos (polímeros lineales de alfa y beta tubulina), los cuales se encuentran adosados a la membrana citoplásmica, conformando un citoesqueleto periférico de gran rigidez. Los microtúbulos se distribuyen en toda la membrana citoplásmica, excepto en el área donde emerge el flagelo. Esta región carente de microtúbulos es de gran importancia para la célula ya que es el único sitio donde se realiza endocitosis o exocitosis de moléculas. Otra estructura especializada es el kinetoplasto, el cual es una malla o red de DNA extranuclear localizada en un punto específico de la mitocondria. Esta red de DNA representa una proporción importante del DNA total del parásito, ya que dependiendo de la especie puede contener del 10 al 20% del DNA total en la célula, se estima en un rango de 125-280 fentogramos/célula (28). El DNA del kinetoplasto está estructurado por la concatenación de dos tipos de moléculas circulares de DNA: los minicírculos y los maxicírculos. Los primeros forman la mayor parte de la estructura (5000 – 10 000 moléculas por célula), son moléculas circulares de DNA con una longitud perimetral de 100 a 2,500 pb, no contienen información genética evidente pero se sabe que codifican para RNAs pequeños que participan en el procesamiento de RNAs mensajeros mitocondriales. Los maxicírculos son moléculas mayores de DNA, que contienen una longitud perimetral de 30,000 – 50,000 pb. Se encuentran en mucho menor número que los minicírculos (50 copias por célula) y representan el equivalente al DNA mitocondrial de otros eucariontes, pues codifican para RNAs codificadores de proteínas, RNAs ribosomales y de transferencia mitocondriales. En 100 ml de un cultivo saturado ( $5 \times 10^6$  parásito/ml) de epimastigotes se obtienen de 50-150  $\mu$ g de DNA o 250-500  $\mu$ g de RNA total, del cual 3-5% es RNA poliadenilado (Poly A<sup>+</sup> RNA) (40, 48).

### 6.4.3. Ciclo vital

La vida de *T. cruzi* comprende dos ciclos de desarrollo: uno en el hombre o huésped mamífero y otro en el interior del vector (Figura 6). El ciclo inicia cuando el vector se infecta al picar y succionar la sangre de un humano o mamífero con tripomastigotes sanguíneos circulantes. Dentro del vector, estas formas sufren transformaciones a lo largo del tubo digestivo en tres fases: en el estomago se observan formas redondeadas denominadas esferomastigotes; en el intestino medio se ven epimastigotes que se multiplican por división binaria y en el recto se encuentran los tripomastigotes metacíclicos que son las fases infectantes para el humano. Por lo general, se torna infectante 20 días post-infección y permanece así toda su vida (1 año) (7).

El ciclo termina cuando el triatomino infectado pica a un hombre o mamífero sin infectar, estos realizan una ingesta abundante de sangre defecando al mismo tiempo sobre la superficie de picadura. Cuando estas deyecciones se frotan sobre la piel, contaminan el sitio de picadura y los parásitos penetran al tejido. Los tripomastigotes metacíclicos infectantes que entran al organismo son fagocitados por los macrófagos de la región y englobados en el fagosoma, de donde escapan y se dirigen al citoplasma, aquí se transforman en amastigotes y se multiplican activamente por división binaria (13). Los tripomastigotes que se han formado rompen las células, llegan a la circulación sanguínea y linfática, para luego invadir diversos órganos, en cuyas células penetran y se transforman de nuevo en amastigotes (Figura 6). El ciclo se cierra cuando un triatomino no infectado pica y succiona sangre de un individuo infectado (12).

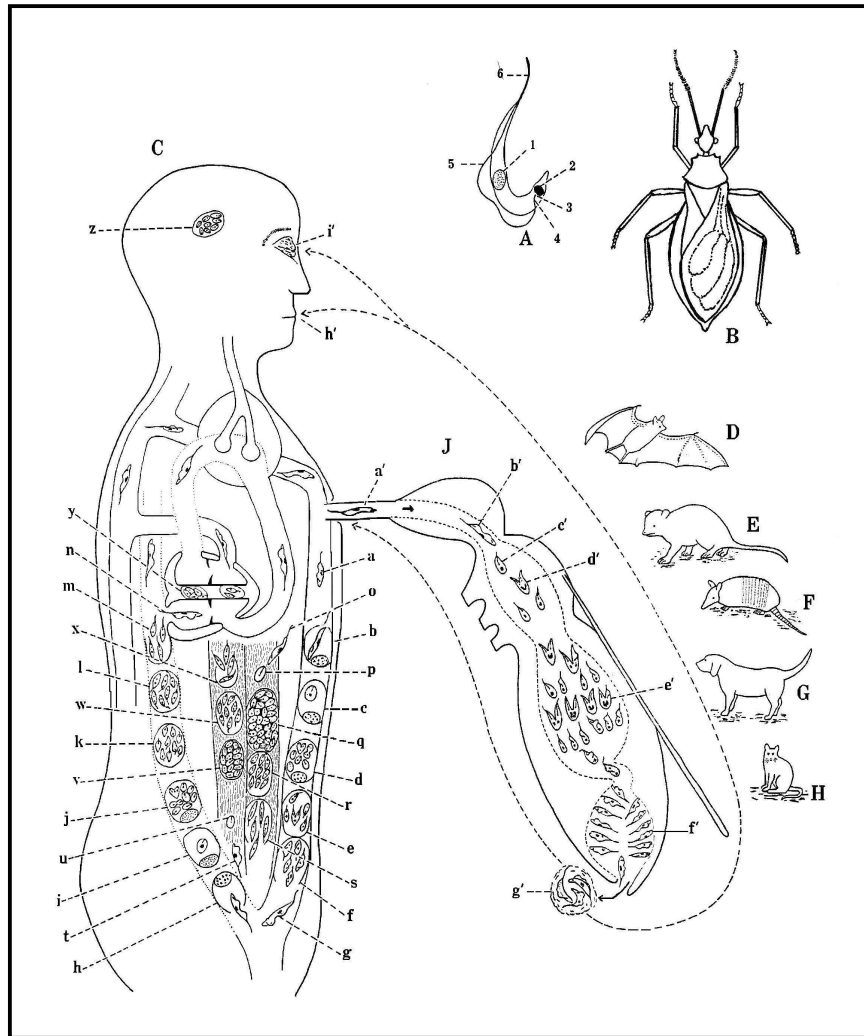


Figura 6. A) Forma típica en "C": 1, Núcleo; 2, Cuerpo basal; 3, Kinetoplasto; 4, Axonema; 5, Membrana ondulante; 6, Flagelo y 7, Probóscide. B) Huésped invertebrado: Chinche hematófago. C-H) Algunos huéspedes vertebrados comunes: C, humano; D, murciélago; E, Tlacuache; F, Armadillo; G, Perro; H, Gato. Ciclo de vida de *T. cruzi*: a) Tripanosoma metacíclico que entró a la sangre a través de la infección con heces de una chinche infectada cuando se alimenta; b) El tripanosoma penetra al macrófago; c) El tripanosoma cambia al estado de amastigote; d) Se multiplican los amastigotes; e) Se transforma el amastigote en epimastigote y se multiplica; f) El epimastigote se transforma a tripomastigote, el cual rompe las células y escapa al torrente sanguíneo; g) tripomastigotes libres en sangre; h-n) Se repite el ciclo lo que ocasiona que aparezcan parásitos en sangre periódicamente; o) Los tripomastigotes penetran músculo esquelético, cardíaco, células del retículo endotelial, hígado, bazo y médula ósea. Fuente: Cheng. 1996.

## **6.5. TRANSMISIÓN DE *T.cruzi***

### **6.5.1. Ciclos de transmisión**

Existen tres ciclos de transmisión de *T.cruzi* en los que interviene el vector:

- 1) El ciclo doméstico, mantiene la infección en seres humanos que viven en zonas rurales o periurbanas con paredes de adobe y techos de paja. Los principales reservorios son los seres humanos, perros, gatos y en algunos países, los cobayos. El vector vive y se multiplica en las grietas de las paredes, agujeros del techo, debajo y detrás de los muebles, de los cuadros y otros puntos.
- 2) El ciclo selvático se mantiene por la infección entre triatomas selváticos y, a su vez, la infección de roedores, marsupiales y otros animales salvajes.
- 3) En el ciclo peridoméstico, intervienen mamíferos que entran y salen libremente de las viviendas (roedores, perros y gatos) y triatomas selváticos atraídos a las casas por la luz y el alimento. Este ciclo sirve de nexo entre los ciclos domésticos y selvático (34).

### **6.5.2. Principales mecanismos de transmisión**

La transmisión a los seres humanos se da por el contacto de las heces u orina del triatomino infectado con la piel, mucosas ó sobre el sitio de picadura (2). Las personas que no reciben tratamiento después del contagio con el parásito permanecerán infectadas toda su vida. La frecuencia de infección por la transmisión a través del vector, está relacionada con el nivel económico de la población y la naturaleza doméstica del vector. La enfermedad seguirá transmitiéndose siempre que la pobreza de la población permita un contacto íntimo entre los triatomas y el huésped humano. Existen países en donde la infección con el vector es sumamente rara, como los países del norte, debido a las condiciones de vida de la población y las características geográficas. Por tanto, en estos lugares la transmisión se da principalmente por la transfusión sanguínea

considerándose la segunda vía de transmisión más frecuente, siendo responsable de aproximadamente el 10% de los casos. En México, la transfusión sanguínea (sangre total o derivados de la sangre, excepto productos liofilizados) ha provocado una prevalencia de infección del 1.6%, cifra reportada en la Encuesta Nacional Seroepidemiológica realizada entre 1987 y 1989 (25). En los países pobres de América Latina, los problemas económicos y los desordenes políticos han provocado la emigración de personas desde países endémicos a otros países latinoamericanos donde no se encuentre el vector, Estados Unidos y Europa (Fig. 7), aumentando la probabilidad de infección por *T. cruzi* a través de la transfusión sanguínea lo que ocasiona un problema en las zonas urbanas de los países no endémicos. Una tercera vía de transmisión natural es la congénita a través de la placenta de madres chagásicas embarazadas hacia sus bebés, con un riesgo de infección de 0.5 al 6% para los hijos (27), cifra reportada en México, pero en los países endémicos la frecuencia va desde 6-20% en Argentina, 51% en Bolivia, 10.9% en Brasil y 9% en Uruguay. Existen otros mecanismos de transmisión menos frecuentes pero no menos importantes como el trasplante de órganos (riñón, corazón, médula ósea, entre otros) (41) la ingesta de leche materna, accidentes en el laboratorio, la ingesta de carne parasitada o bebidas contaminadas con materia fecal de triatominos (9, 45).

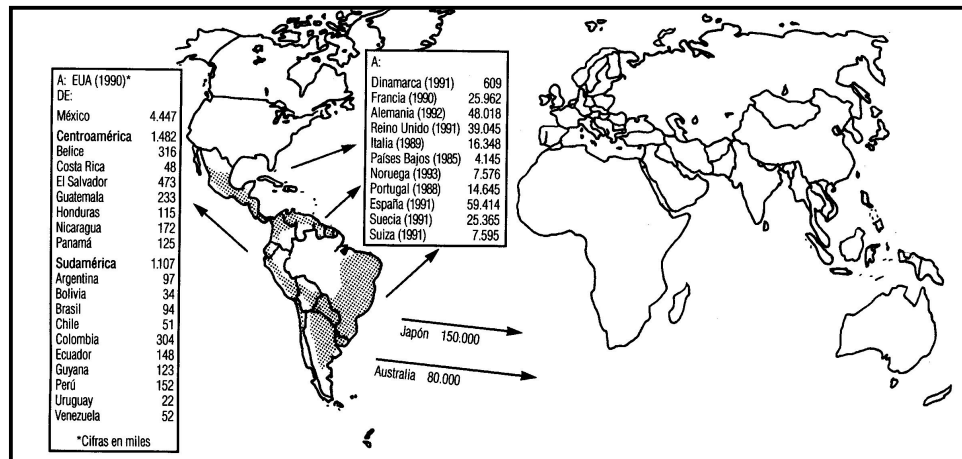


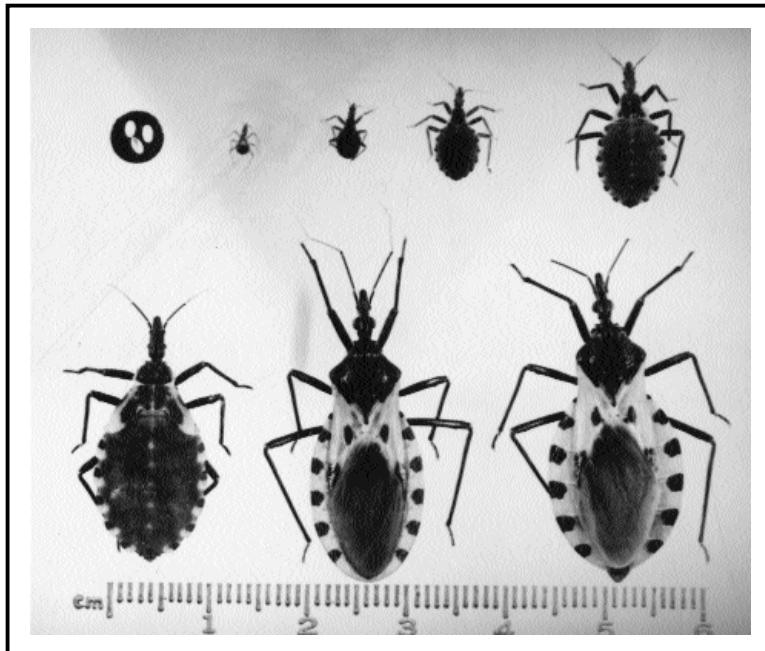
Figura 7. Distribución geográfica del *Trypanosoma cruzi*. Fuente: OPS, 1994.

## 6.6. VECTORES

Se han reconocido más de 123 especies de triatomos silvestres, pero sólo 10 están dispersos en colonias donde habitan los humanos. Algunos se han adaptado completamente a las casas y son altamente antropofílicos, tal como *T. infestans* en países del Cono Sur y *R. prolixus* en muchos países de América central. En México existen 32 especies silvestres de triatomos infectados por *T. cruzi*; sin embargo, hay siete especies bien adaptadas a las condiciones de vida de los seres humanos y animales domésticos como el perro y el gato, que tienen mayor importancia epidemiológica debido a su alta capacidad infectiva y a su localización (51) (35) (Fig. 8). En la Tabla I se agrupan las especies de triatomos mas importantes y su distribución geográfica.

**Tabla I.** Distribución geográfica de *Triatominos* en América.

Especie	Distribución
<i>Triatoma infestans</i>	Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Perú, Uruguay (23)
<i>Triatoma sordida</i>	Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay (17)
<i>Pastrongylus megistus</i>	Brasil
<i>Triatoma dimidiata</i>	Ecuador, México, América central (19)
<i>Triatoma barberi</i>	México (50)
<i>Rhodnius pallescens</i>	Panamá (44)
<i>Rhodnius prolixus</i>	Colombia, México, Venezuela, América central (33)



**Figura 8.** Estadios de *Rhodnius prolixus*, vector transmisor de *T.cruzi*.



## 6.7. EPIDEMIOLOGÍA

La OMS calcula que en los 80's, antes de poner en marcha los programas de control de la transmisión, existían en América Latina entre 16 y 18 millones de personas infectadas, la mayoría vivían en zonas rurales o periurbanas. Las personas infectadas pueden sufrir daños neurológicos, gastrointestinales o cardiacos y las manifestaciones varían ampliamente de un área endémica a otra. A partir de 1990, los programas de control en algunos países del Cono Sur interrumpieron la transmisión de la enfermedad y en otros se redujo sustancialmente la incidencia, es por ello que no existen actualmente cifras reportadas que indiquen el estado de la enfermedad. En México y en países de centro América y los Andes, existen de 8 a 9 millones de personas infectadas y 25 millones están en constante riesgo de infección, enfatizando la necesidad de implementar programas nacionales de control para combatir la transmisión del parásito por eliminación del vector y por búsqueda de donadores de sangre infectados. Por lo anterior, se han iniciado programas a gran escala contra la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en los países de América central y los Andes, así como los que se han realizado en el Cono Sur. México es uno de los países que están tratando de implementar estos programas, sin embargo, no se han establecido totalmente debido al poco interés de las autoridades de salud (26). En base a estas medidas, los países endémicos se pueden dividir en cuatro grupos tomando en cuenta la magnitud de la transmisión, cantidad y calidad de la información Epidemiológica disponible y programas de control de infección (34).

- a) *Grupo I.* Países con elevada prevalencia de infección a *T.cruzi* en humanos y tasas variables en la infección intradomiciliar, tienen en uso programas de control de vectores y programas para la prevención de la transmisión transfusional. Estos son: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Ecuador, Honduras, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela (39).

- b) *Grupo II.* En los países de este grupo existen evidencias de la transmisión intradomiciliar y hay una clara relación entre la infección por *T.cruzi* y las alteraciones electrocardiográficas, así como de otras alteraciones. En estos países no se han establecido programas de control de vectores ni en Bancos de Sangre. Los países de este grupo son Colombia, Costa Rica y México.
- c) *Grupo III.* Estos países tienen pruebas de la transmisión intradomiciliar; sin embargo, no se tienen datos epidemiológicos precisos que demuestren una clara correlación entre las infecciones por *T.cruzi* y el cuadro clínico. Se diagnostica la fase aguda de la enfermedad de Chagas y a menudo se detectan individuos con serología positiva. Dentro de estos países se encuentra el Salvador, Guatemala, Nicaragua y Panamá.
- d) *Grupo IV.* En estos países la enfermedad de Chagas es zoonosis, en algunos la única prueba epidemiológica es la presencia de triatomos infectados y en otros se han declarado algunas infecciones de seres humanos. La transmisión es por otros mecanismos diferentes al natural. Los países que comprenden este grupo son La Antigua, Aruba, Bahamas, Belice, Canadá, Cuba, Curazao, Estados Unidos, Granada, Guadalupe, Guayanas, Islas Vírgenes, Jamaica, Martinica, Republica Dominicana, San Vicente, Trinidad y Tobago.

## **6.8. MORBILIDAD Y MORTALIDAD**

Basándose en el número de personas infectadas por *T.cruzi* y en la prevalencia conocida de la enfermedad de Chagas, es posible creer que la sintomatología chagásica crónica puede afectar de 2 a 3 millones de personas, lo que aumenta la morbilidad en la población infectada. También se sabe que el riesgo de muerte de un persona chagásica es del doble que el de una persona no infectada. Dentro de los individuos infectados, el 30% son asintomáticos y el 31% fallece. Además, la tasa de mortalidad anual de personas que padecen la enfermedad de Chagas aumenta con la edad, 5.5 por cada 100,000 en la población de 15 a 24 años, 308.0 por cada 100,000 en personas de 65 a más (14, 34).

## **6.9. FASES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

El transcurso de la enfermedad de Chagas puede estar clasificado en tres fases o estadios: Agudo, Indeterminado y Crónico.

### **6.9.1. Fase aguda**

Se da posterior a la infección con el parásito, sea cual sea el mecanismo de transmisión. Las principales manifestaciones clínicas consisten en signos en el punto de entrada del parásito, fiebre, edema, adenopatías y miocarditis. Los signos sistémicos aparecen de 2 a 3 semanas después de la infección y dependen del sitio de infección, desarrollando una reacción inflamatoria localizada. Si la picadura del vector fue en alguna extremidad, se desarrolla un nódulo subcutáneo conocido como “chagoma de inoculación” y esto se debe a la respuesta inmune del huésped al parásito, produciendo infiltración de fluidos y un gran número de células sanguíneas blancas (macrófagos). Esto dura de 2 a 3 meses y los tripanosomas pueden ser aspirados del nódulo. Si la infección es en el ojo, se produce un edema unilateral y conjuntivitis conocida como “Signo de Romaña”(Fig. 9). Además, el individuo infectado presenta aumento del bazo e

hígado, dolor muscular, salpullido, miocarditis aguda, dilatación de glándulas linfáticas, edema de cara, piernas o pies y malestar general (síntomas muy parecidos a los de la infección con el virus de la influenza). En algunas ocasiones se puede ver involucrado el Sistema Nervioso Central. En el 10% de los casos la infección aguda puede ser letal en pocas semanas o meses.



**Figura 9.** Signo de Romãña en una niña, característico en fase aguda de la enfermedad de Chagas. El edema de los dos párpados del ojo derecho y la mejilla es acompañado de linfadenopatía preauricular y conjuntivitis. Fuente: Chester, 1994

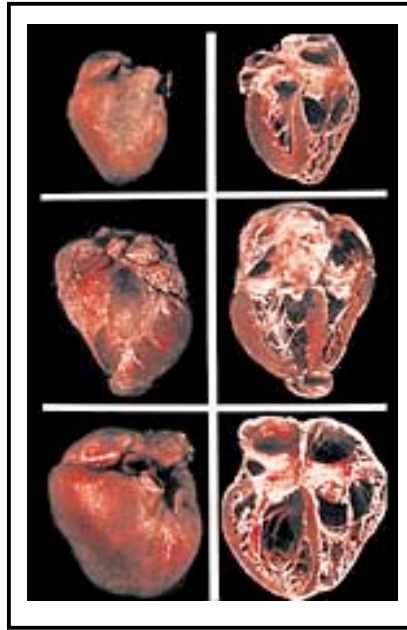
### **6.9.2. Fase indeterminada**

La mayoría de los pacientes que se recuperan de la fase aguda, permanecen aparentemente asintomáticos durante periodos prolongados e incluso durante toda su vida. Sin embargo, se considera que padecen de la forma clínica indeterminada de la enfermedad de Chagas por presentar las siguientes características: las pruebas serológicas y parasitológicas para detectar *T. cruzi* son positivas; no se observan signos clínicos ni síntomas de la enfermedad, el electrocardiograma y las radiografías de corazón, esófago y colon son normales, aunque, cada año aparecerá una forma cardiaca en el 2 a 5% de estos pacientes y un porcentaje menor presentará una forma digestiva con dilataciones patológicas del colon y

esófago (megas). En estudios longitudinales se ha demostrado que las lesiones cardiacas se producen entre 10 y 20 años después de la infección. En estudios epidemiológicos transversales en zonas endémicas se ha encontrado que de 50 a 60% de los pacientes crónicos tienen la forma indeterminada, de 20 a 30% presentan grados variables de cardiopatía (desde alteraciones electrocardiográficas leves, hasta la muerte súbita o insuficiencia cardiaca) y de 8 a 10% tienen una forma digestiva.

### **6.9.3. Fase crónica**

Aproximadamente del 10 al 30% de individuos infectados progresan del estado indeterminado al crónico, en el cual, los niveles de parásitos en sangre son muy bajos y el título de anticuerpos es muy alto. Los efectos adversos de la enfermedad de Chagas crónica incluyen el aumento y disfunción del corazón, esófago, intestino grueso y colon. La miocardiopatía chagásica crónica es consecuencia de una miocarditis fibrosa progresiva que evoluciona durante la fase de infestación. El corazón puede aumentar cerca de tres veces su tamaño normal en ambos ventrículos y aurícula derecha. El electrocardiograma muestra anomalías típicas como arritmias y bloqueo de la rama derecha. Las arritmias ventriculares son usualmente las responsables de la muerte repentina. La pared del corazón puede hacerse muy delgada y producir un aneurisma apical y finalmente embolia trombotica (Fig. 10).



**Figura 10.** Fases de desarrollo de un corazón con Cardiopatía Chagásica Crónica con dilatación de las cavidades, aneurisma apical en ventrículo izquierdo y adelgazamiento de las paredes ventriculares. Fuente: Botero, 2001

En algunos pacientes (varia con la región geográfica) hay dilatación del esófago dando como resultado, un mega (Fig. 11 y 12). Esto tiene efectos en la digestión y el peristaltismo es afectado por la destrucción de células ganglionares por los parásitos. Las lesiones del tubo digestivo están relacionadas con grados diversos de destrucción de células nerviosas del Sistema Nervioso Intrínseco y con un proceso inflamatorio.



**Figura 11.** Megaesófago en adulto con enfermedad de Chagas crónica. Fuente: Botero, 2001



**Figura 12.** Megacolon en adulto con enfermedad de Chagas crónica. Fuente: Botero, 2001

## **6.10. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

Existen dos tipos de métodos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en sus dos fases. Los métodos de diagnóstico directo que requieren la detección del parásito mediante el desarrollo del parásito en el vector o en medios de cultivo durante la fase aguda, y los métodos de diagnóstico indirectos que identifican anticuerpos específicos contra el parásito mediante pruebas serológicas durante la fase crónica. El diagnóstico debe estar complementado con la historia clínica, datos de viajes a regiones endémicas, transfusiones sanguíneas recientes y picaduras de reduvidos. Además, se complementa el diagnóstico con pruebas diferenciales contra brucelosis, endocarditis, salmonelosis, schistosomiasis, toxoplasmosis, tuberculosis, enfermedades de tejido conectivo y leucemia.

### **6.10.1. Diagnóstico directo**

Como ya se mencionó, la enfermedad de Chagas cursa por dos fases. En la etapa aguda, el parásito se encuentra en sangre periférica, la detección es exitosa al menos en el 60% de los casos y se incrementa al 100% cuando se utiliza un método de concentración como el Xenodiagnóstico o el Hemocultivo, con una sensibilidad del 60 al 90%, la cual disminuye hasta  $\leq 10\%$  en el estadio crónico. Además, se puede visualizar al parásito mediante la observación directa al microscopio de preparaciones en fresco de sangre, como por ejemplo el frotis, la gota gruesa, el strout y el microstrout, teñidos con colorantes supravitales.

La OMS establece que el Xenodiagnóstico es el estándar de oro en las pruebas diagnósticas en la etapa aguda, ya que se permite que los vectores se alimenten de la sangre de los pacientes sospechosos y después de un período de incubación, se busquen parásitos al microscopio en las heces de los insectos. Aunque el Xenodiagnóstico sigue siendo el método de elección, este y el hemocultivo presentan muchas desventajas. La sensibilidad varía entre 17 y el 70% para el Xenodiagnóstico y entre el 35 y 50% para el hemocultivo dependiendo de la fase de la enfermedad. Además, se requiere de varias semanas para obtener un número de parásitos elevados para detectarlos al



microscopio (aproximadamente 60 días para el Xenodiagnóstico). Estas pruebas son complicadas y requieren de un espacio para criar a los insectos, así como equipos y suministro para cultivar a los parásitos (5).

### **6.10.2. Diagnóstico indirecto**

En etapas tardías de la enfermedad, el parásito ha invadido tejido muscular y el organismo ha creado anticuerpos dirigidos contra el parásito o contra productos de este. Se sabe que *T. cruzi* libera proteínas que circulan libremente en la sangre, las cuales se detectan con técnicas serológicas como la ELISA (Prueba de inmunoabsorción), IFI (Inmunofluorescencia Indirecta), HAI (Hemaglutinación Indirecta), FC (Fijación de Complemento) y AD (Aglutinación Directa) (24).

La sensibilidad de la FC, HAI, IFI y AD es  $\geq 98.9\%$  y la especificidad  $\geq 98.5\%$ , si se utilizan tres de ellas, la sensibilidad aumenta al 100% pero la especificidad es la misma o disminuye al 96.5% y presentan el problema de reacciones cruzadas. La prueba de ELISA, aunque fácil de normalizar por la automatización, requiere una mayor concentración de anticuerpos en la muestra para una buena correlación con otras técnicas. Estas pruebas se han aplicado durante mucho tiempo, con escasa normalización; en varios países de Centro y Sudamérica se ha intentado normalizar pero no ha sido posible porque no existen métodos diagnósticos completamente seguros.

En la actualidad, existen varios Kits comerciales, producidos por países sudamericanos. Desafortunadamente, no se pueden aplicar en México porque usan antígenos obtenidos de cepas sudamericanas que presentan diferencias antigénicas con las mexicanas obteniendo resultados falsos positivos o negativos, además de que no se ha podido obtener información independiente y objetiva sobre la sensibilidad y especificidad de estas.

También se han detectado antígenos del parásito en la orina, pero resulta ser una alternativa complicada, ya que están muy diluidos y es necesario concentrar un gran volumen de orina antes de poder realizar la prueba.

Está claro que la baja sensibilidad de varias de estas pruebas no es apropiada para la detección selectiva en bancos de sangre. Todas las pruebas tienen un problema común: el antígeno empleado para la detección de anticuerpos, compuesto por parásitos enteros o fracciones, que pueden dar lugar a una sensibilidad y especificidad inferiores a las necesarias, por lo que se requiere emplear dos o tres reacciones de las ya mencionadas.

### **6.10.3. Diagnóstico molecular**

Otra alternativa es la posibilidad de detectar DNA del parásito mediante su amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta técnica se ha propuesto para el diagnóstico de *T.cruzi* utilizando DNA mitocondrial, denominado DNA del cinetoplasto (DNA<sub>K</sub>), el cual tiene dos tipos de moléculas: los maxicírculos y los minicírculos. Existen 30 000 moléculas de los minicírculos en una sola célula de *T.cruzi* y tienen cuatro repeticiones internas elevando el número de probabilidades para identificarlo por PCR a 120 000 por célula. El problema principal es que todos los minicírculos están encadenados en una sola red de gran tamaño lo que provoca que los resultados por PCR no sean reproducibles (20).

### **6.10.4. Diagnóstico por Tecnología del DNA recombinante**

Esta claro que los problemas de sensibilidad de las pruebas serológicas usadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas ocasionan resultados erróneos que deben ser solucionados de inmediato. Una de las soluciones a este problema consiste en el empleo de antígenos producidos por tecnología del DNA recombinante ó el uso de péptidos sintéticos fabricados con secuencias de DNA publicadas (22). Estas alternativas surgieron desde 1986 y a la fecha se han identificado, clonado y determinado parcial ó completamente las secuencias de al menos 40 genes que expresan proteínas homólogas a antígenos de *T.cruzi*. Se ha demostrado que las moléculas recombinantes identificadas correspondían a antígenos que inducían una respuesta de anticuerpos durante las fases aguda o crónica de la infección en seres humanos. Los epítomos antigénicos más

importantes en varias de estas moléculas están compuestos por diferentes unidades de aminoácidos repetidas varias veces en cada molécula. Algunas de estas proteínas también fueron útiles para identificar específicamente la presencia de IgM e IgG en infecciones congénitas por *T.cruzi*. Todavía no se ha comprobado si se puede tener reacciones cruzadas en la infección con *T.rangeli* o *Leishmania*. Se propuso el uso de péptidos sintéticos elaborados de secuencias de aminoácidos repetidos en varias zonas del antígeno, una combinación de varios antígenos o el uso de un antígeno recombinante, como el SAPA que es la enzima trans-sialidasa del parásito, para detectar anticuerpos en el suero de infecciones agudas y crónicas observando resultados más satisfactorios. Desafortunadamente, aún no se ha logrado obtener un antígeno que pueda ser usado en un kit, debido a la alta heterogeneidad que presenta el parásito, por lo que se debe seguir con el diseño de genotecas de expresión para obtener un péptido recombinante que determine la presencia de anticuerpos en fase aguda y crónica sin presentar reacciones cruzadas (1, 29).

Por tanto, estos datos indican que en un futuro próximo los antígenos de *T.cruzi* expresados en sistemas de *Escherichia coli* sustituirán a las complejas mezclas de antígenos utilizadas actualmente. Esta sustitución no sólo aliviará la necesidad de cultivar parásitos, sino también conseguirá una sensibilidad y especificidad más apropiadas. El rendimiento final de esta segunda generación de pruebas diagnósticas sólo se conocerá cuando finalmente se disponga de kits con antígenos recombinantes (8).

## 7. JUSTIFICACIÓN

---

Las técnicas serológicas comerciales empleadas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas son obtenidas con parásitos de origen sudamericano y presentan problemas que generan frecuentemente resultados falsos positivos o negativos y reacciones cruzadas lo que ocasiona un riesgo en la transmisión de la enfermedad, sobre todo en los Bancos de Sangre. Es necesario modificar las técnicas existentes aumentando la sensibilidad y especificidad al 100% empleando antígenos de cepas mexicanas. Por tal motivo, se plantea la construcción de una genoteca de expresión a partir de cDNA de *T.cruzi* de un aislado mexicano para obtener péptidos recombinantes que puedan ser usados en la identificación de anticuerpos en suero.

## 8. HIPÓTESIS

---

El uso de péptidos recombinantes obtenidos a partir de cDNA de *T.cruzi* de un aislado mexicano, permitirá identificar específicamente la presencia de anticuerpos en el suero de pacientes chagásicos mexicanos.

## 9. OBJETIVO GENERAL

---

Identificar los péptidos de *T.cruzi* de un aislado mexicano, por medio de la construcción de una genoteca de expresión de cDNA, que puedan ser usados para la identificación de anticuerpos presentes en el suero de pacientes chagásicos mexicanos.

### 9.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9.1.1. Mantener en cultivo un aislado mexicano de *T.cruzi* obtenido de vector.

9.1.2. Construir una genoteca de cDNA de epimastigotes de un aislado mexicano de *T.cruzi*.

9.1.3. Identificar los péptidos que reaccionen con anticuerpos anti-*T.cruzi* presentes en el suero de pacientes chagásicos.

9.1.4. Determinar la secuencia de los péptidos.

## 10. MATERIAL

---

### 10.1. SOLUCIONES

Todas las soluciones se encuentran en el Anexo I, los medios de cultivo en el Anexo II

### 10.2. VECTORES

- Vector ZAP Express™ pre-digerido con EcoRI (Stratagene, Cat No. 239211). Contiene un sitio de policlonación con 12 dianas únicas para enzimas de restricción distintas en las cuales se pueden insertar fragmentos de DNA de 0-12 Kb flanqueados por las regiones promotoras T3 y T7, tiene resistencia a Tetraciclina.
- Vector Fagemido pBK-CMV. Tiene un sitio de policlonación con 17 dianas únicas para enzimas de restricción flanqueadas por los promotores T3 y T7. Tiene resistencia a Kanamicina.
- TOPO 10: Tiene un sitio de policlonación entre las bases 234-357 para enzimas de restricción flanqueadas por el promotor T7. Tiene resistencia a Kanamicina y Ampicilina. Esta compuesto por 3908 nucleótidos (3.9 Kb).

### 10.3. BACTERIAS

- XL1-Blue MRF'. *\_(mcrA)183 \_(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1gyrA96 relA1 lac[F'proAB lac<sup>f</sup>Z \_M15 Tn10(Tet<sup>f</sup>)]*
- XL0LR. *\_(mcrA)183 \_(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lac<sup>f</sup>Z \_M15 Tn10(Tet<sup>f</sup>)] Su<sup>-</sup> [F<sup>R</sup>].*
- DH5α-T1<sup>R</sup>. *F<sup>-</sup> [80lac [M15] (lac [YA<sup>-</sup>argF) U169 deoR recA1 endA1 hsd R17(r<sub>K</sub>, m<sup>+</sup><sub>K</sub>) phoA supE44 thi-I gyrA96 rel A1 tonA (confers resistance to phage T1)*

#### **10.4. BACTERIOFAGOS**

- Ex Assist™ (Stratagene) Fago cooperador F1, provoca la escisión in vivo del vector ZAP Express en el fagemido pBK-CMV resistente a Kanamicina.

#### **10.5. ANIMALES**

- Ratones Balb-c de 3 semanas de vida inoculados con 100 µg/ml de proteínas totales del aislado mexicano Campeche de *T. cruzi*.
- Conejos Nueva Zelanda de 3 meses de vida, inoculados con proteínas totales del aislado mexicano Campeche de *T. cruzi*.

#### **10.6. MEMBRANAS**

- Protran BA 85 (Schleicher & Schuell, Cat. No. 10402525). Filtros circulares de nitrocelulosa de 132 mm de diámetro y 0.45 µm de poro, empleados para transferir genotecas plaqueadas.
- Trans-Blot Transfer Medium (Bio-Rad, Cat. No. 162-0112). Membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm de poro, empleada para transferir proteínas.

#### **10.7. ENZIMAS**

- Transcriptasa reversa Superscript II (GIBCO BRL Cat. No. 28025-013)
- Deoxinucleotidil exotransferasa terminal (TdT) (Roche, Cat. No. 220582)
- Taq DNA polimerasa. (Promega, Cat. No. M1665)
- EcoRI (Promega, Cat. No. 13662602)
- T4 DNA ligasa (Stratagene, Cat. No. 203003)

#### **10.8. OLIGONUCLEÓTIDOS**

- Oligo(dT)<sub>17</sub> (Promega, Cat. No. 15199901)
- Oligo(dT)<sub>17</sub>-EcoRI ATACCGCTCTGGTGAATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTT
- Iniciadores P y RP que flanquean el sitio de clonación de ZAP Express y pBK-CMV

P = 3'TGTAACGACGGCCAGTGA 5'

RP = 3'TGACCATGATTACGCCAAGC 5'

## **10.9. NUCLEÓTIDOS**

- Desoxiadenosina trifosfato (dATP). (Promega, Cat. No. 13467310)
- Desoxicitosina trifosfato (dCTP). (Promega, Cat. No. 15139209)
- Desoxitimina trifosfato (dTTP). (Promega, Cat. No. 15203012)
- Desoxiguanidina trifosfato (dGTP). (Promega, Cat. No. 13199607)
- Low DNA Mass Ladder. (Invitrogen, Cat. No. 10068-013)

## **10.10. KITS COMERCIALES**

- Gigapack III Gold Packaging extract. (Stratagene, Cat No. 200451)
- DNA Ligation. (Stratagene, Cat No. 203003)
- High Pure PCR Product Purification Kit. (Roche, Cat. No. 1732668)
- High Pure Plasmid Isolation Kit. (Roche, Cat. No. 1754777)
- Renaissance Kit. (Dupont, Ct. No. NEO803)
- ABI Prism<sup>®</sup> Big Dye<sup>™</sup> Terminator cycle sequencing ready reaction kit. (PE Applied Biosystems a division of Perkin-Elmer. Cat. No. 4303573)
- TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Invitrogen<sup>®</sup> life Technologies (Cat. No.K4500-01)
- Marligen Bioscience Inc. (Cat. No. 11456-019)

## **10.11. PROGRAMAS INFORMÁTICOS**

- La comparación de las secuencias de DNA se hizo por BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) en la dirección electrónica <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (3).



## 11. MÉTODOS

---

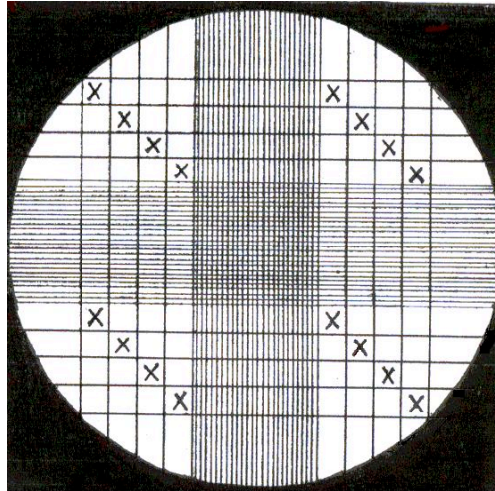
### 11.1. PARÁSITO

Para el desarrollo del presente trabajo se emplearon parásitos de *Trypanosoma cruzi* aislados de un vector encontrado en la ciudad de Campeche. Los parásitos fueron observados en las heces del triatomino mediante un frotis directo y cultivados en medio LIT (Liver Infusión Tryptose, Anexo II), donde se han mantenido desde su aislamiento (enero de 1999).

### 11.2. CULTIVO DE PARÁSITOS

Se cultivaron epimastigotes del aislado Campeche de *T. cruzi* en medio LIT a 28°C por periodos de 28 días en cajas Nunc de 50 ml, conteniendo 25 ml del medio LIT y un total de  $1 \times 10^9$  parásitos/ml. Para realizar el experimento, los parásitos se cosecharon por centrifugación en tubos Costar de 50 ml a 1500xg durante 10 minutos a 4°C. El paquete celular se lavó con PBS 1X (Anexo I), y se resuspendió en 100  $\mu$ l del mismo. Los parásitos se contaron en cámara de Neubauer, para ello se tomó una alícuota y se hizo una dilución 1:10 en PBS. Se tomaron 10  $\mu$ l y se colocaron en cada ranura de la cámara de Neubauer (Figura 13), posteriormente se hizo el conteo de flagelados visiblemente móviles con ayuda de un microscopio óptico, con el objetivo 40X. Se contaron los cuadros de las esquinas, formando un total de 16, tomando en cuenta solo los parásitos móviles que se encontraron en los cuadros en posición diagonal (16). Los 16 cuadros miden 0.1 mm<sup>3</sup>, este valor se multiplicó por 10<sup>3</sup> (número en 1 mm) y el resultado se multiplicó por 10 (número en 1 ml). Finalmente, para obtener el número total de parásitos/ml, se multiplicó por el factor de dilución:

$$\# \text{ parásitos/ml} = \# \text{ organismos en 16 cuadros} \times 10 \times 10^3 \times 10$$



**Figura 13.** Cámara de Neubauer. Se observan los cuadrantes contados y las X indican la forma de conteo. Fuente: Deane, 1984.

### **11.3. CLONACIÓN DE LA GENOTECA DE *T.cruzi* MEDIANTE EL SISTEMA ZAP Express II**

La genoteca fue construida a partir de 300 flagelados contados en cámara de Neubauer utilizando un método que permite trabajar con pocas células (6).

#### **11.3.1. Síntesis de cDNA**

La lisis celular se realizó incubando a 65°C durante 1 minuto en la solución de lisis-RT (Anexo I). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 minutos para permitir el alineamiento del oligo(dT)<sub>17</sub> a los RNAs mensajeros. Se adicionaron 15 U/μl de la enzima Transcriptasa reversa Superscript II y se incubó a 37°C durante 15 minutos, posteriormente la enzima se inactivó a 65°C.

Se adicionó un Poli-nucleótido de desoxiadenina (dA)<sub>17</sub> al extremo 3' de la primera cadena de cDNA, utilizando 10 U de la enzima TdT a 37°C por 15 minutos en presencia de 1.5 mM de ATP.

Transcurrido el tiempo, la TdT se inactivó a 65°C por 10 minutos, manteniendo al final el tubo de reacción en hielo. La síntesis de la segunda cadena de cDNA se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando

como iniciador 100 pmoles/ $\mu$ l del oligo(dT)<sub>17</sub> que presenta un sitio de restricción de la enzima EcoR1. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 100  $\mu$ l con 10 U de Taq DNA polimerasa, amortiguador 10X de la enzima, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 25 mM de dNTPs. Las condiciones para la amplificación fueron: Un ciclo inicial a 96°C durante 10 segundos, 25 ciclos: a 96°C por 1 minuto, 42°C por 2 minutos y 72°C durante 6 minutos. Se finalizó con un ciclo de extensión a 72°C durante 5 minutos.

Inmediatamente se añadieron 10 U más de ampli-Taq para realizar una segunda reacción de PCR bajo las mismas condiciones, con excepción del último ciclo de extensión a 72°C durante 30 minutos.

Con la finalidad de observar si la síntesis de cDNA fue correcta, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X , tomando 10  $\mu$ l del producto de amplificación y 2  $\mu$ l del amortiguador de carga de electroforésis (Anexo I).

El producto de amplificación (cDNA) se purificó con un Kit comercial siguiendo las indicaciones del proveedor, obteniendo el purificado en 50  $\mu$ l del amortiguador de elusión (10 mM de Tris-HCl pH=8.5). Se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y en placas de agar con Bromuro de Etidio (Anexo II).

### **11.3.2. Digestión con EcoRI**

El cDNA (1.5  $\mu$ g) fue digerido con 12 unidades de la enzima EcoRI, a 37°C durante 4 horas. La reacción se detuvo inactivando la enzima a 65°C por 10 minutos. La digestión fue nuevamente purificada y la concentración fue estimada en placas de agar con Bromuro de Etidio (Anexo II).

### **11.3.3. Cuantificación de cDNA en placas de agar con Bromuro de Etidio**

Se preparó un placa de agarosa al 0.8% en TAE (Anexo I) con 10  $\mu$ l de una solución de Bromuro de Etidio 10 mg/ml. Además, se prepararon 5 diluciones de DNA de concentraciones conocidas para usarse como estándares (Low DNA mass ladder: 20, 40, 60, 80, y 100 ng/ $\mu$ l). Se colocó en la superficie de la placa 0.5

1  $\mu$ l del cDNA digerido a cuantificar y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente, se observó con una lámpara de luz UV y se comparó con los estándares.

#### **11.3.4. Ligación al vector ZAP Express y Empaquetamiento.**

Para ligar el cDNA digerido a los brazos del vector ZAP Express II predigerido con EcoR1 y desfosforilado, se resuspendieron 100 ng del cDNA en el amortiguador de reacción de la T<sub>4</sub> DNA ligasa, 1  $\mu$ g del vector y 2 U de la enzima T<sub>4</sub> DNA. La reacción se incubó a 12°C durante toda la noche. Posteriormente, el producto de ligación (genoteca de cDNA en ZAP Express) fue empaquetada con el sistema Gigapack III Gold durante 1 hora 45 minutos a 22°C, según las condiciones especificadas por el proveedor.

#### **11.3.5. Titulación, Porcentaje de Recombinantes y Amplificación de la Genoteca**

Se sembraron 10  $\mu$ l del stock de bacterias XL1-blue en dos placas de medio LB-Tetraciclina (Anexo II), las placas se incubaron a 37°C toda la noche. Se tomó una colonia bacteriana y se sembró en 30 ml de medio LB-Tetraciclina suplementado con MgSO<sub>4</sub> 10 mM y Maltosa al 0.2% (p/v). Se dejó crecer a 37°C en agitación a 250 rpm toda la noche. La suspensión bacteriana se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos para obtener un botón, el cual, fue resuspendido en 30 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM estéril (en este punto las bacterias se encuentran a una D.O<sub>600</sub>=1). Se hizo una dilución hasta obtener la D.O<sub>600</sub>=0.5.

Para determinar el título de la genoteca y el número fagos recombinantes se mezcló 1  $\mu$ l de la genoteca empaquetada en tres diluciones diferentes (10<sup>1</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>) con 200  $\mu$ l de bacterias XL1-blue D.O<sub>600</sub>= 0.5 en MgSO<sub>4</sub> 10 mM a 37°C por 15 minutos. Enseguida se añadieron 3 ml de NZY top agar (Anexo II) fundido a 48°C, 15  $\mu$ l de IPTG 0.5 M y 50  $\mu$ l de X-Gal 250 mg/ml homogenizando perfectamente, enseguida se vació sobre placas de agar LB/Tetraciclina precalentadas a 37°C y se incubó toda la noche, el crecimiento del fago dentro de la bacteria se manifestó por la formación de halos de lisis. El título de la

genoteca se determinó contando el número total de halos de lisis y se midió en unidades formadoras de placas (ufp) de acuerdo al calculo:

$$\text{ufp}/\mu\text{l}=(\text{número de halos})(\text{factor de dilución})/1 \text{ ml}$$

El porcentaje de recombinantes se determinó por la relación entre el número halos azules (fagos no recombinantes) y el de halos blancos (recombinantes) con el total de halos líticos.

La genoteca se amplificó para obtener títulos más altos y cantidades más estables a partir de 8  $\mu\text{l}$  de una dilución 1:10, 600  $\mu\text{l}$  de bacterias XL1-blue D.O.<sub>600</sub>= 0.5 y 7 ml de NZY top agar (previamente fundido a 50°C), se incubó 15 minutos a 37°C con agitación y posteriormente, se vació sobre placas de 150 mm con LB/Tetraciclina 5 mg/ml, las cuales se incubaron a 37°C durante 10 horas sin dejar crecer las placas líticas más de 2 mm. Transcurrido el tiempo, las placas fueron cubiertas con 9 ml de amortiguador SM (Anexo I) y se guardaron a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se recuperó en tubos de polipropileno estériles toda la suspensión que contenía los bacteriófagos y se adicionó cloroformo a una concentración final del 5%. Se mezcló bien y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se centrifugó a 1000xg por 10 minutos para eliminar restos celulares, el sobrenadante se recuperó en tubos nuevos estériles y se determinó el título de la genoteca amplificada usando diluciones seriadas ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) como ya se mencionó anteriormente.

#### **11.3.6. Confirmación de moléculas recombinantes por PCR de los insertos de cDNA de la genoteca.**

De las placas Petri con LB-Tetraciclina (Anexo II) usadas para la titulación, se seleccionaron al azar 10 clonas diferentes para su aislamiento del gel con una punta de micropipeta, posteriormente fueron eluidas en un tubo eppendorf que contenía 500  $\mu\text{l}$  de amortiguador SM y 20  $\mu\text{l}$  de cloroformo.

Se agitó vigorosamente y se almacenó a 4°C para permitir la elusión del DNA del gel al amortiguador, que después fue identificado por PCR utilizando como iniciadores de la reacción los oligonucleótidos P y RP, que corresponden a la región que flanquea al cDNA insertado en el vector ZAP Express. La reacción de

PCR se realizó en un volumen total de 50  $\mu$ l conteniendo 5  $\mu$ l de amortiguador 10X de la enzima Taq DNA polimerasa, 5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  25 mM, 4  $\mu$ l de la mezcla de dNTPs 2.5 mM, 2.5  $\mu$ l del iniciador P 10 pmol/ $\mu$ l, 2.5  $\mu$ l del iniciador RP 10 pmol/ $\mu$ l, 0.2  $\mu$ l de la enzima Taq polimerasa, 10  $\mu$ l del fago eluido en SM 10 ng/ $\mu$ l y c.b.p 50  $\mu$ l de  $H_2O$  d.d.e. El programa de amplificación en el termociclador consistió en: un ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos, 25 ciclos: a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C durante 60 segundos. Se finalizó con un ciclo de extensión a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1%.

#### **11.4. INMUNODETECCIÓN**

Para identificar los péptidos que son reconocidos por anticuerpos presentes en el suero de pacientes chagásicos confirmados por ELISA, HAI e IFI, se utilizó la inmunodetección en membrana.

Se sembraron bacterias XL1-blue en cajas de Petri con LB-Tetraciclina y se incubaron 24 horas a 37°C. Se tomó una colonia bacteriana y se sembró en 30 ml de medio líquido LB-Tetraciclina suplementado con maltosa al 0.2% y  $MgSO_4$  10 mM, se incubó toda la noche a 37°C con agitación. La suspensión bacteriana fue cosechada por centrifugación a 1000xg eliminando el sobrenadante y el botón se resuspendió en 30 ml de  $MgSO_4$  10 mM, para obtener una suspensión con una  $DO_{600}=1.4$ . Se hicieron diluciones en  $MgSO_4$  10 mM, para obtener bacterias a una  $DO_{600}=0.5$ .

De la genoteca, se tomó el volumen necesario para tener 2000 fagos, los cuales, se mezclaron con 600  $\mu$ l de bacterias XL1-blue ( $DO_{600}=0.5$ ) en un tubo de polipropileno estéril y se incubó 15 minutos a 37°C en agitación suave. Enseguida se agregaron 6 ml de medio NZY top agar (fundido a 48°C) al tubo de reacción y se mezcló bien para después vaciarse sobre placas de 150 mm con LB-Tetraciclina. Se dejó solidificar 15 minutos a temperatura ambiente y enseguida se incubaron 5 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo se colocaron filtros de nitrocelulosa de 132 mm tratados con IPTG 10 mM (Anexo I), sobre el tapete

bacteriano y se continuó con otra incubación a 37°C durante 5 horas (42). Posteriormente, se marcaron las membranas sobre las placas y se retiraron para bloquear con una solución de TBS-A leche descremada al 5% (Anexo I) durante 3 horas a 37°C con agitación suave. Las membranas fueron lavadas dos veces en TBS-T (Anexo I) por 10 minutos a 37°C en agitación suave. Después, fueron incubadas durante toda la noche a 37°C en agitación suave con el primer anticuerpo (Suero de paciente chagásico confirmado por ELISA, IFI y HAI) diluido 1:250 en TBS-T (La dilución se determinó por Dot-blot, Anexo IV). Se hizo un segundo lavado bajo las mismas condiciones e inmediatamente se incubó durante toda la noche a 37°C en agitación suave con un segundo anticuerpo (anti-IgG conjugada a peroxidasa de rábano) diluido 1:1000 en TBS-T. Se realizó un tercer lavado con TBS en las mismas condiciones y se reveló con LUMINOL exponiendo las membranas sobre placas de rayos X identificando así la clona recombinante que expresa un péptido que reaccione con los anticuerpos presentes en el suero. Para identificar las clonas positivas se comparó la película autorradiográfica con las placas y se recuperó el tapón de agar sobre el que crecieron utilizando una punta de micropipeta recortada. Las clonas recuperadas fueron eluidas en amortiguador SM y en 20  $\mu$ l de cloroformo, se agitó fuertemente y se incubó a 4°C toda la noche.

Con el propósito de confirmar los resultados de las clonas recuperadas se utilizó suero de humano positivo a Chagas y suero de ratón y conejo inmunizados con proteínas totales de *T. cruzi* del aislado Campeche (Anexo III).

### **11.5. ESCISIÓN IN VIVO DEL VECTOR ZAP Express II**

Con el objeto de analizar las clonas identificadas por la Inmunodetección se realizó una escisión *in vivo* para ello se utilizó un fago cooperador y el vector que fue transformado a fagemido. Para llevar a cabo este procedimiento, se crecieron cultivos de células XL1-blue y XLOL en placas de agar LB-Tetraciclina y LB Kanamicina respectivamente. Las colonias obtenidas de cada placa se crecieron por separado en cultivos nocturnos a 37°C, en 30 ml de medio LB-Tetraciclina

suplementado con 0.2% de maltosa y MgSO<sub>4</sub> 10 mM para XL1-blue y 30 ml de medio LB sin suplementos para XLOL. Después de detener el crecimiento a 4°C, se centrifugó 10 minutos a 1000xg para obtener un botón, el cual se resuspendió en 30 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM (DO<sub>600</sub>=1.44). Las bacterias se llevaron a una DO<sub>600</sub>=1.0 con MgSO<sub>4</sub> 10 mM y de ahí se tomaron 200  $\mu$ l para mezclarlas con 250  $\mu$ l de cada uno de los fagos identificados en la Inmunodetección y 1  $\mu$ l del fago cooperador. El tubo con la mezcla de reacción se incubó a 37°C por 15 minutos y después se adicionaron 3 ml de medio LB-MgSO<sub>4</sub> incubándose toda la noche en las mismas condiciones. Al día siguiente, el tubo se colocó en un baño maría a 65°C durante 20 minutos para lisar las bacterias, eliminándolas por centrifugación y recuperando el fagemido escisado en el sobrenadante. Para plaquear el fagemido, se colocaron en tubo de polipropileno estériles, 200  $\mu$ l de bacterias XLOL recién crecidas (DO<sub>600</sub>=1.0) y 100  $\mu$ l del fagemido escindido, se incubaron 15 minutos a 37°C en agitación suave. Enseguida se preparó un cultivo nocturno con 300  $\mu$ l de medio LB-MgSO<sub>4</sub> vaciando sobre placas de agar LB-Kanamicina (50  $\mu$ g/ml).

## **11.6. CLONACIÓN DE LA GENOTECA DE *T.cruzi* MEDIANTE EL SISTEMA TOPO TA.**

Se obtuvo cDNA con la metodología descrita. Se visualizó el cDNA en gel de agarosa y se purificó mediante el Kit de Marligen según las especificaciones del proveedor obteniendo el cDNA en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O d.d.e.

### **11.6.1. Cuantificación del cDNA por espectrofotometría**

El cDNA purificado fue cuantificado por espectrofotometría, se midió la DO<sub>260 nm</sub> de una dilución 1:50 en agua del cDNA. Se realizaron los cálculos para tener 100 ng/ $\mu$ l del cDNA purificado.



### **11.6.2. Ligación al vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO**

Para ligar el cDNA purificado por Marligen a los brazos del vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO se resuspendieron 100 ng/μl del cDNA con 1 μl de solución salt, 1 μl del vector y agua. La ligación se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente en hielo.

### **11.6.3. Transformación de *E.coli* DH5α-T1**

El producto de ligación fue usado para transformar células de *E.coli* DH5α-T1 competentes por choque térmico: 15 minutos en hielo, 30 segundos a 42°C en baño maría e inmediatamente regresarlas al hielo. Las bacterias se crecieron en 250 μl de medio SOC durante 1 hora a 37°C con agitación, posteriormente se vaciaron sobre placas LB-Kanamicina/IPTG/X-Gal precalentadas a 37°C, permitiendo el crecimiento durante toda la noche a 37°C. Se calculó el porcentaje de recombinantes en base al número de colonias blancas y azules presentes en la placa. Se determinó la eficiencia de la genoteca.

### **11.6.4. Análisis de la Genoteca clonada en pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO**

Se seleccionaron las colonias con inserto (blancas) para crecerlas toda la noche en 10 ml de medio LB-Kanamicina. Se tomaron 5 ml del cultivo nocturno para obtener proteínas y 5 ml para extraer el DNA plasmídico de cada clona. Las proteínas se analizaron por Western blot para identificar la presencia de clonas reactivas con el suero humano positivo a Chagas. El DNA plasmídico fue aislado con el Kit de Purificación de Plásmidos (Roche) siguiendo las especificaciones del proveedor.

### **11.6.5. Western blot**

Se obtuvieron los cultivos de las clonas seleccionadas por Inmunodetección, se lisaron con solución de lisis para proteínas durante 30 minutos en hielo y se centrifugó a máxima velocidad para obtener el sobrenadante de donde se cuantificó la concentración de proteínas. Se separaron por electroforesis utilizando el método de Laemmli (31). Se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por

el método de Towin (47). Las membranas se bloquearon en TBST-Leche al 5% y se incubaron en el primer anticuerpo 1 hora a 37°C (suero humano positivo adsorbido dil. 1:20). Después de lavar en TBS-T, se incubó en el segundo anticuerpo 1 hora a 37°C (Anti-IgG conjugada a peroxidasa de rábano). La reacción se reveló con 4-CN.

### **11.7. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO**

Para separar el DNA del plásmido del DNA de la bacteria (en ambas genotecas) se usó el Kit de aislamiento de plásmidos. Es un método de extracción de lisis alcalina que separa sin dañar el DNA plasmídico, elimina el RNA. Se partió de una colonia bacteriana crecida en placa de agar LB-Kanamicina, la cual se volvió a crecer en agitación a 37°C en un cultivo nocturno con 5 ml de medio LB. Por centrifugación máxima, se obtuvo el paquete celular y se resuspendió con 250  $\mu$ l del amortiguador de suspensión y 250  $\mu$ l del amortiguador de lisis; se mezcló suavemente y se incubó 5 minutos. Inmediatamente se agregaron 350  $\mu$ l del amortiguador de unión, se mezcló e incubó 5 minutos más. Por centrifugación máxima, se separó el sobrenadante y se colocó en una columna con matriz de fibra de vidrio, en donde se quedó adherido el DNA del plásmido y se eliminaron los restos bacterianos. Después de lavar la columna, se recuperó el DNA plasmídico en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O d.d.e. a 65°C con DO<sub>260/280</sub> = 2.0.

Para verificar la presencia del inserto de cDNA en el plásmido se realizó una digestión con la enzima EcoRI y el producto de la digestión se observó en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio.

### **11.8. SECUENCIACIÓN**

La secuenciación del DNA plasmídico con inserto (DNA de doble cadena) se llevó a cabo con el Kit de Secuenciación ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction basado en el método de Sanger (43).

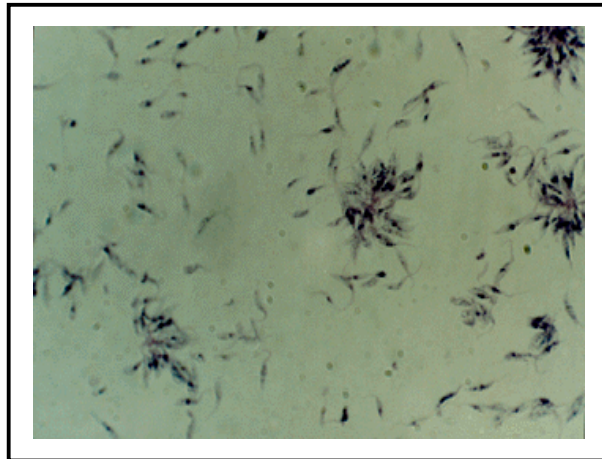
La mezcla de reacción para las secuencias en ZAP Express II contenían 500 ng de DNA plasmídico, 10 pmol del iniciador P, ddNTP's, dNTP's, Amplitaq DNA polimerasa, MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl pH=9 y H<sub>2</sub>O c.b.p. 20  $\mu$ l. El programa de amplificación estuvo constituido por: 1 ciclo a 98°C por 1 minuto, 25 ciclos a 96°C por 30 segundos, 60°C/30 segundos, 68°C/2 minutos y se finalizó con 1 ciclo a 68°C/1 minuto. La mezcla de reacción para secuenciar las clonas obtenidas por el sistema TOPO contenían 100 ng de DNA plasmídico, 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l del iniciador M13, ddNTP's, dNTP's, Amplitaq DNA polimerasa, MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl pH=9 y H<sub>2</sub>O c.b.p. 20  $\mu$ l. El programa de secuenciación fue igual a excepción de la temperatura de alineamiento que fue de 55°C. Los productos de amplificación de ambas secuencias se purificaron por precipitación con isopropanol, como lo recomienda el proveedor y se corrió en un equipo ABI Prism DNA Sequencer del Instituto de Biología de la UNAM.

## 12. RESULTADOS

---

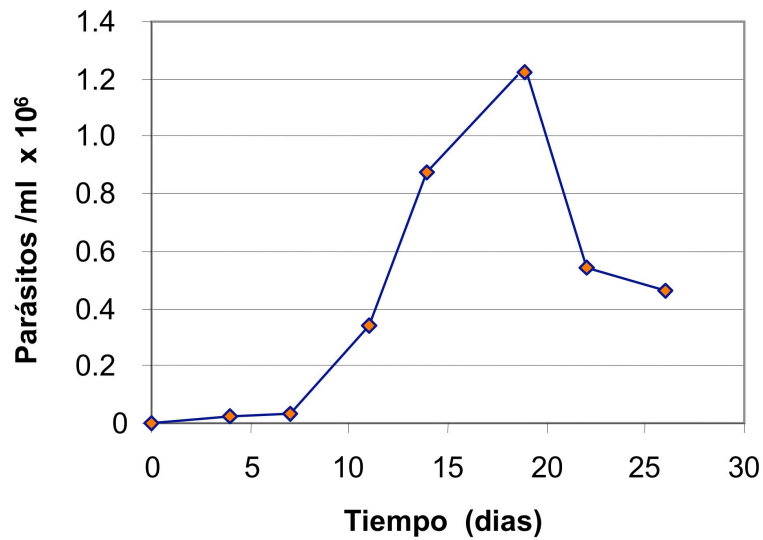
### 12.1. CULTIVO DE PARÁSITOS.

El primer objetivo fue mantener, un sistema de cultivo *in vitro*, de *T.cruzi* aislado de un vector del género *Triatoma dimidiata* macho adulto encontrado en la ciudad de Campeche en enero de 1999. Se realizaron varios sub-cultivos hasta lograr un aumento en el número de flagelados/ml de medio. Se observó que el cultivo presentaba un máximo crecimiento en el día 20 obteniendo cifras de hasta  $1.25 \times 10^6$  flagelados/ml. En la Figura 14 se observa una preparación en fresco de un cultivo de 20 días, en donde se distingue perfectamente la estructura morfológica del flagelado de *T.cruzi*.



**Figura 14.** Aislado Campeche de *T.cruzi* obtenido de un vector y cultivado en medio LIT, vista al microscopio óptico con el objetivo 40X.

En la Grafica 1, se muestra el comportamiento en el crecimiento del parásito hasta llegar a su máximo a los 20 días y después de este día presenta una tendencia a la disminución de parásitos vivos.

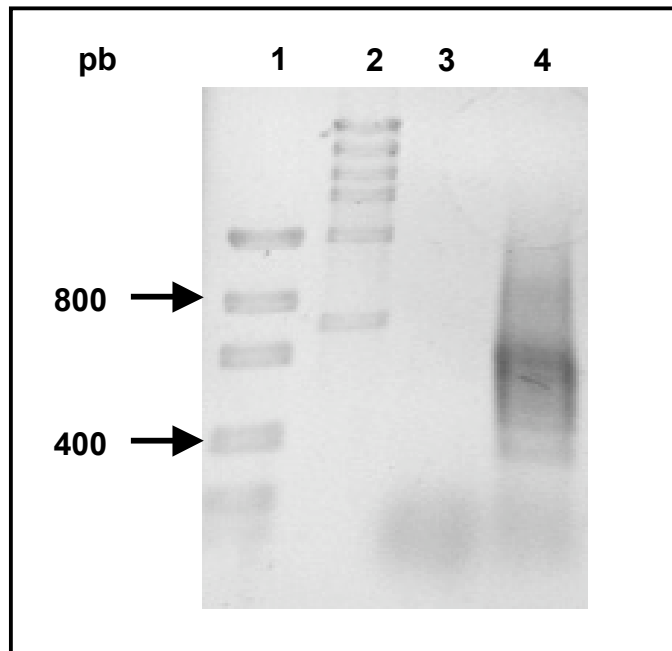


**Grafica 1.** Curva de crecimiento del aislado Campeche de *T.cruzi* en medio LIT cultivado a

Se realizaron 15 cultivos por triplicado para determinar la cinética de crecimiento, en los 5 últimos cultivos los valores se mantuvieron constantes entre las réplicas. Todos los tubos de cultivos fueron tratados bajo las mismas condiciones. A partir de estos ensayos, se seleccionó el cultivo de epimastigotes de donde se generó la genoteca.

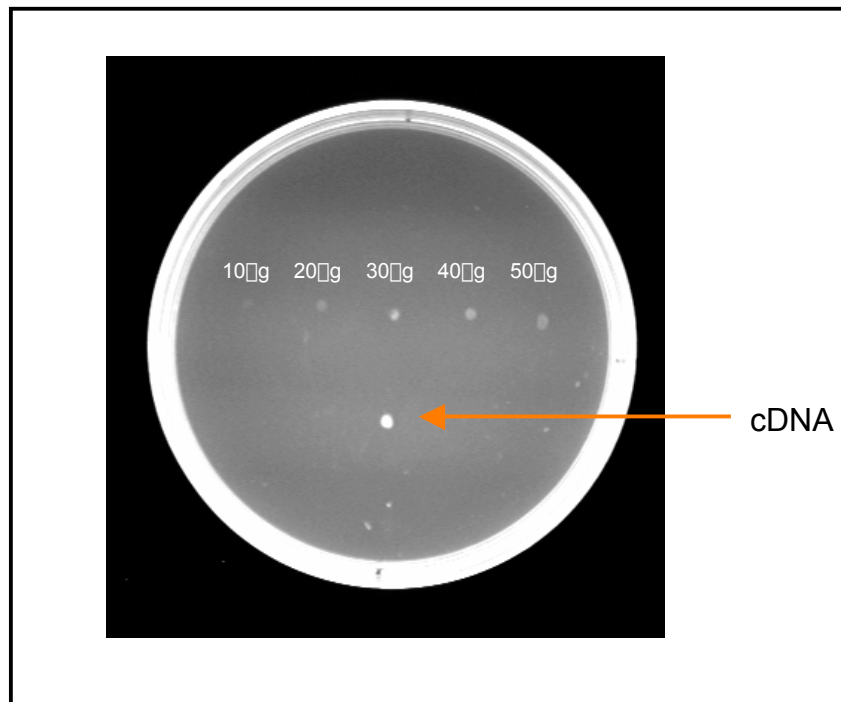
## 12.2. CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS DE cDNA

Se realizaron dos intentos de elaboración de genotecas de *T.cruzi*, a partir de 300 flagelados cada una, de cultivos de 20 días de crecimiento. Se tuvo éxito en una de las genotecas, En la figura 15 se observa la amplificación del cDNA sintetizado observándose fragmentos de entre 400 y 800 pb. (Figura 18)



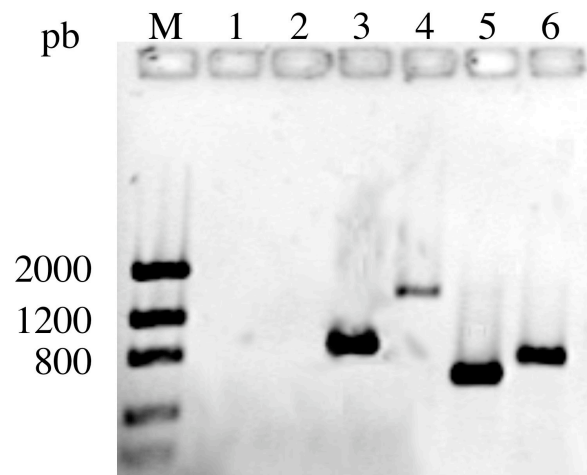
**Figura 15.** Gel de agarosa al 1% del cDNA obtenido de *T.cruzi*. Carril 1: Low DNA Mass Ladder. Carril 2: High DNA Mass Ladder. Carril 3: Genoteca 1. Carril 4: Genoteca 2.

El cDNA purificado fue digerido con EcoRI y ligado a los brazos del vector Zap Express II, para realizar esto, se cuantificó el cDNA en placas de agar con Bromuro de Etidio antes y después de la ligación, la concentración obtenida fue mayor de 50 ng que se tenían como limite superior en los estándares utilizados. (Figura 16)



**Figura 16.** Placa de agar con Bromuro de Etidio para cuantificar la concentración del cDNA. Se observa que la [cDNA] = >50 µg.

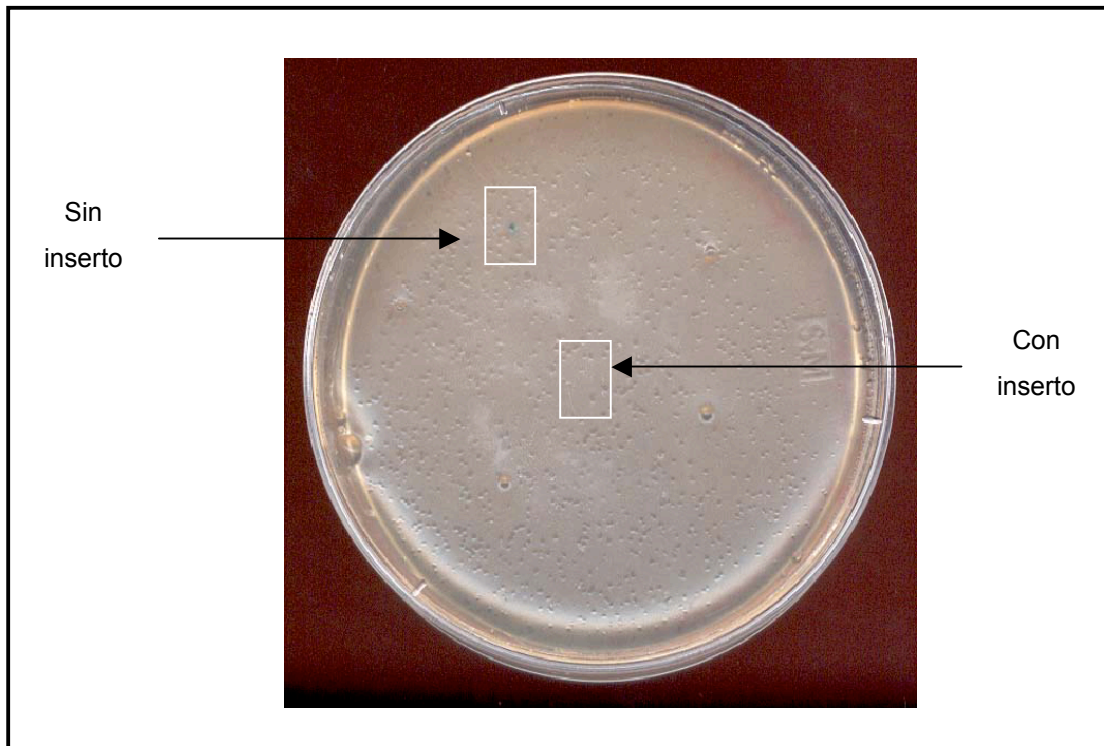
Los productos de la ligación fueron empaquetados con extractos de empaquetamiento de alta eficiencia, con esto se infectaron bacterias *E.coli* listas para su transformación. Para determinar el tamaño de los insertos de cDNA de la genoteca producida, se seleccionaron algunos clones al azar, sobre los cuales se realizó PCR, utilizando los oligonucleótidos P y RP como iniciadores que flanquean el sitio de clonación en el vector ZAP Express II. Los productos de amplificación se observan en un gel de agarosa al 1% (Figura 17), la mayor parte de los insertos correspondían a un tamaño entre los 800 y 1200 pb, lo que garantizaba que los cDNAs clonados poseían una longitud confiable para su interpretación así como para su comparación en los bancos de genes.



**Figura 17.** Tamaño de los insertos presentes en la genoteca de cDNA de *T.cruzi* en ZAP Express II. Los insertos de algunos clones seleccionados al azar que fueron amplificados por PCR y separados en geles de agarosa al 1%. Carril 1 y 2: Clonas sin inserto. Carril 3-6: Clonas con inserto.

El título de la genoteca en ZAP Express II (ufp/ml) y el porcentaje de recombinantes fueron determinados por el cultivo sobre placas de NZY-agar-Tetra-IPTG-Xgal para reconocer colonias con inserto y sin el. Se obtuvo un título de  $3.9 \times 10^6$  ufp/ml con un 99.5% de recombinantes antes de amplificar. Después de la amplificación, el título aumentó a  $2.3 \times 10^9$  ufp/ml (Figura 18).



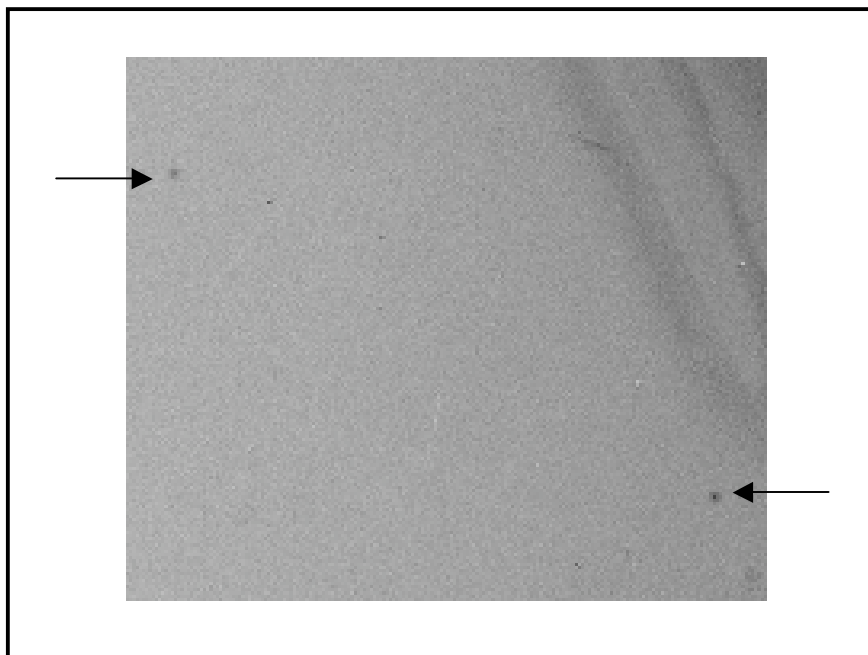


**Figura 18.** Placa de NZY-agar-Tetra-IPTG-Xgal en la cual se reconocen colonias con inserto (blancas) y sin el (azules).

Los resultados obtenidos demostraron la eficiencia del sistema de clonación de cDNA con la metodología desarrollada cumpliendo con dos de los objetivos establecidos en el trabajo.

### **12.3. INMUNODETECCIÓN**

Una vez construida y caracterizada la genoteca en ZAP Express, se procedió a la identificación de transcritos que expresaran péptidos que pudieran ser identificados con anticuerpos presentes en el suero de personas chagásicas comprobadas por ELISA, HAI e IFI. Esto se realizó mediante un análisis diferencial creciendo 2000 ufp sobre placas de NZY-agar (Método). Estos clones se transfirieron a filtros de nitrocelulosa con IPTG. Los péptidos se fijaron a la membrana, en donde fueron reconocidos por los anticuerpos en suero. Esta reacción se puso de manifiesto en placas de Rx, como se observa en la Figura 19.



**Figura 19.** Placa de Rx en donde se observan dos clonas identificadas con el suero de personas chagásicas crónicas.

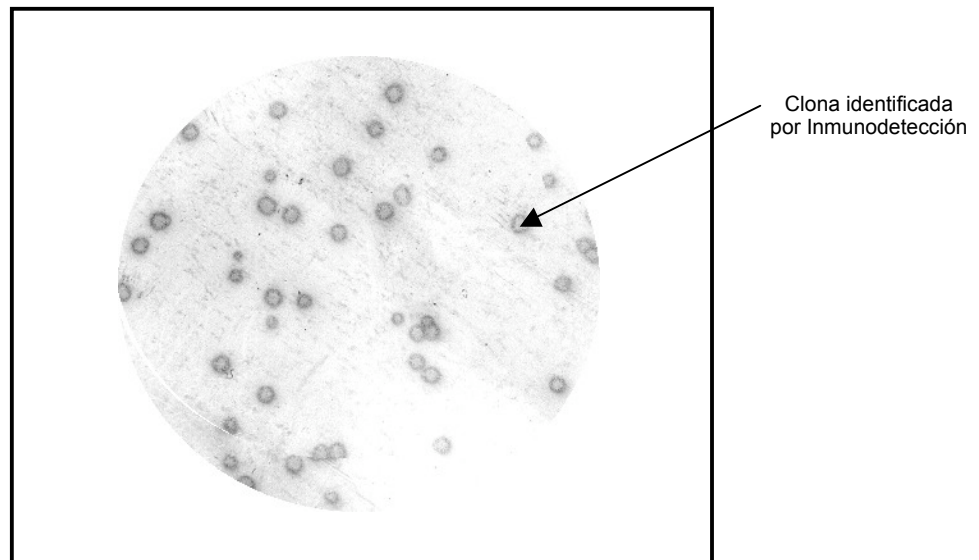
Estas clonas fueron aisladas del gel y eluidas en SM para su análisis. Se realizó la digestión con EcoRI de los productos de escisión in vivo para comprobar la presencia de inserto, obteniendo sólo una clona positiva. Sin embargo, la falta de reproducibilidad en los resultados y la poca especificidad, llevó a modificar el método de revelado utilizando el 4-cloro-1-naftol en lugar de LUMINOL.

En una primera Inmunodetección revelada con 4-CN se identificaron 4 clonas positivas al suero, las cuales fueron escindidas para ser secuenciadas al igual que la clona anterior. Los resultados de la secuenciación de las 5 clonas fueron analizados en las bases de datos para su identificación, y se encontró que las secuencias no presentaban homología con la base de genes reportada para *T.cruzi*. (Tabla 2) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (3).

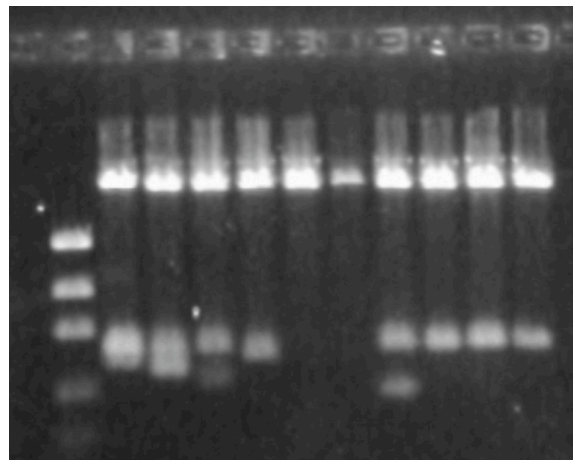
**Tabla 2.** Análisis de secuencias seleccionadas por Inmunodetección con 4-CN en la genoteca de *T.cruzi* aislado Campeche.

Clona	Secuencia con mayor homología	Identidad	Acceso a la base de datos
Tc1A	Secuencia de DNA de ratón de la clona DN-74E14	93% (55/59)	AL683801
Tc1B	Secuencia de mRNA de la metaxina 1 de ratón	92% (304/327)	BC023071
Tc2B	Clona CTD-2182N23 del cromosoma 8 de humano	94% (120/127)	AF 305872
Tc3B	Clona RP1-232K4 del DNA humano	91% (260/285)	AL021938
Tc6B	Cromosoma 3 de ratón	92% (220/235)	AC104327

Debido a que la información obtenida presentaba homología con secuencias de humano y de ratón, se repitió la Inmunodetección revelando con 4-CN utilizando el suero adsorbido con proteínas de *E.coli* XL1-blue para evitar inespecificidades (Anexo IV). Se identificaron 15 clonas que coincidieron con la placa (Figura 20), las cuales fueron escindidas in vivo y sub-clonadas en pBK-CMV para tener un sistema mas simple que pueda ser secuenciado. Esta clonas fueron digeridas con EcoRI para observar los insertos en un gel de agarosa al 1%. (Figura 21)



**Figura 20.** Inmunodetección revelada con 4-CN. Se identificaron 15 clonas con suero adsorbido con proteínas de *E.coli*.



**Figura 21.** Gel de agarosa al 1% con las digestiones con EcoRI de las 15 clonas identificadas por Inmunodetección. Carril 1: marcador de pesos moleculares. Carril: 2-10: digestiones.

De los resultados de secuenciación se tienen a la fecha secuenciadas las clonas Tc1C y Tc2C, las demás están pendientes. La secuencia Tc1C no presentó similitud significativa con lo reportado en la base de datos del Gene Bank, esto hace suponer que tal vez se trata de una secuencia nueva de *T. cruzi*. Los resultados del análisis en las bases de datos indican claramente que la clona Tc2C presentó homología con un RNA ribosomal S5 (RPS5) de *Homo sapiens*

con una valor de identidad del 99% (509/513), probabilidad de error de 0% y valor de Gaps 2/513 (0%).

### Secuencia Tc1C

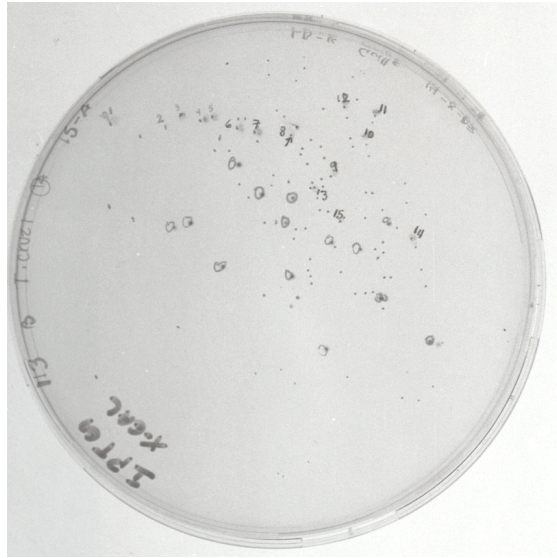
```
CTCTGTCCCA TAGTGAGACA AGCGGGTTCG ACCCCACGTT ACCGTAATAA TATCGAGTAA 60
CGTCGGAAGT TAGAGGGTCC GAGTTCATTA GGGGGGTGGA GTCGGAGGGT TCATCCACCC 120
TGATGCCCGT GTACGGTGGT GCTACCAGATC AAACAACAAC AACAACAACA ACAAAAATCA 180
TCTCTGCCTA AGAGTGATAC AACGGGTCCG ACCAGAGTTT GAGGACTCGA GTTCGTTAGG 240
AGGGTGGAGT AGGAGGGTTT CCTGATCCCA ATGTCCACAC TCGGTGGGGT GAGTCGGTCT 300
TATTTAGGTA AATTTTCAAT AGTTTAGGTA ATTTTCGACAT GTGCTCTATA TGCAGTTATG 360
GGATGTTAAG GTAAGAAACC TAGGTGATCA CAGCTGGACG TCGCGCGCTC AGGT 414
```

### Secuencia Tc2C

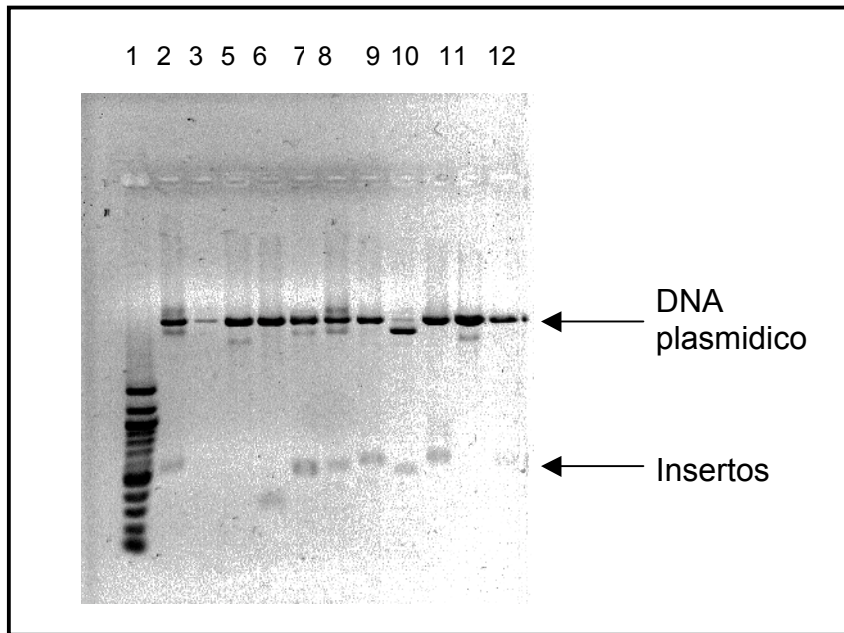
```
GCTGGGACTG CCCCAAAGGG CAGACAGGTT TATTGGGCAG CAGCTGGGAA AATCAGCGGT 60
TGGACTTGGC CACACGCTCC AGCTCGTCC TCTTCTTAAT GGCATAGGAG TTCGAGGAGC 120
CCTTGGCAGC ATTGATGAGC TCATCTGCCA GGCACCTCAGC AATGGTCTTA ATGTTCCGGA 180
AGGCAGCCTC ACGAGCGCCT GTGCACAACA GCCAGATGGC CTGGTTCACA CGGCGCAGGG 240
GGGACACATC CACAGCCTGT CGTCTCACAG TCCC GGCGCG CCAATGCGT GTGGAGTCCT 300
CCCGGGGACC ACTGTTGATG ATGGCGTTCA CCAGGACCTG CAGAGGGTTC TCGCCTGTGA 360
GCAGGTGTAT GATCTCGAAG CATGCTTGAC GATGCGCACA GTCATGAGCT TCCTGCCGTT 420
GTTGCGGCCG TGCATCATCA TGGAGTTAGT GAGGCGCTCC ACAATGGGAC ACTGACTTTG 480
CGGAAGCGTT TGGCGGCATA CCGCCCTGCA C 511
```

## 12.4. GENOTECA CLONADA EN EL SISTEMA TOPO TA

El cDNA ligado a los brazos del vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO genero una genoteca con un por ciento de recombinantes del 89.2%. Se aislaron 15 clonas con inserto y una sin el para usarse como control negativo (Figura 22), todas las clonas blancas fueron digeridas con la enzima EcoRI para observar los insertos en un gel de agarosa al 1% (Figura 23).

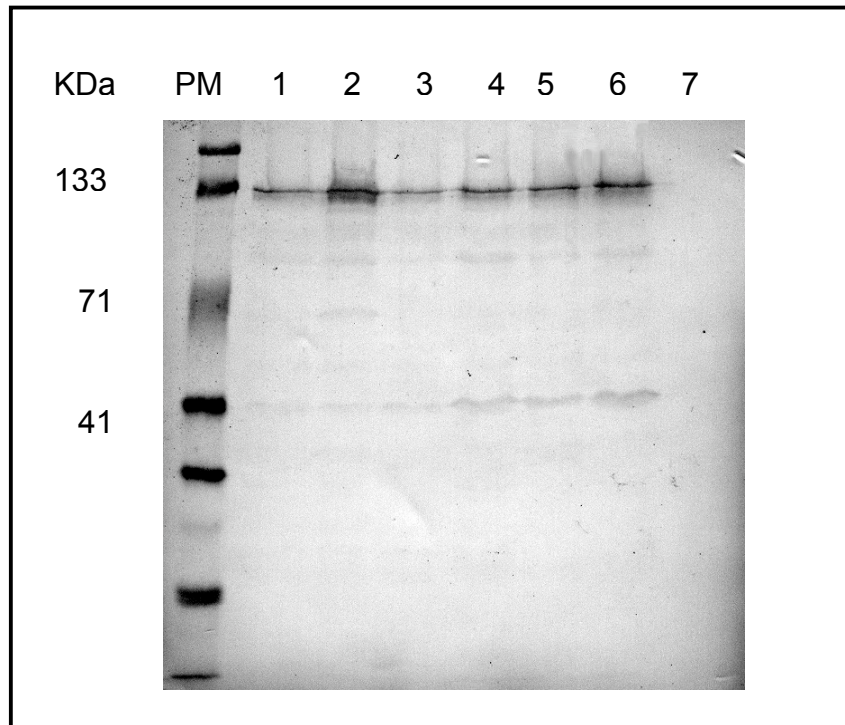


**Figura 22.** Placa de LB-Kanamicina/IPTG/X-Gal con genoteca TOPO TA. Las colonias blancas tienen inserto y las colonias azules no.



**Figura 23.** Gel de agarosa al 1% con las digestiones con EcoR1 de las 15 clonas identificadas por Inmunodetección. Carril 1: marcador de pesos moleculares. Carril2-12: digestiones.

Para comprobar los resultados se realizó un Western blot con las proteínas de cada clona identificada y como control se usaron proteínas de la bacteria XL1-blue con vector pero sin inserto (colonia azul). Se obtuvo una banda común en todas las clonas de 133 KDa, una banda de 71 KDa en la clona 3 y una banda de 17 KDa en las clonas 6, 7 y 8 (Figura 24).



**Figura 24.** Western blot en membrana de nitrocelulosa de las clonas de *T.cruzi* del aislado mexicano, identificadas con suero humano positivo adsorbido con proteínas de , dilución 1:20 Carriles del 1-6: clonas 1, 3, 5, 6, 7 y 8 con inserto. Carril 7: clona sin inserto.

Se enviaron a secuenciar las 15 clonas, logrando caracterizar a M13Tc1 y M13Tc2, las demás están pendientes. El análisis de la secuencia M13Tc1 mostró homología con una secuencia completa de un gen del RNA ribosomal 18S de *Trypanosoma cruzi*, con un valor de Identidad del 99% (387/389), probabilidad de error de 0% y Gaps 0% (2/389). La secuencia obtenida se puede encontrar con el número de acceso a la base gi|7960233|gb|AF239981.1| (Figura 25). La clona

presenta homología con fragmentos pequeños de probables proteínas flagelares, las proteínas de 140/116 KDa y alfa-tubulinas y glicoproteínas de *T.cruzi*.

```

Query: 1  acatcagacgtaaatctgccgcaaaaatccttgcggctcctccgcaaaattggataacttggcg 60
          |||
Sbjct: 78  acatcagacgtaaatctgccgcaaaaatccttgcggctcctccgcaaaattggataacttggcg 137

Query: 61  aaacgccaaagctaatacatgaaccaaccggatggttctctgttccggcggcagggcaacct 120
          |||
Sbjct: 138 aaacgccaaagctaatacatgaaccaaccggatggttctctgttccggcggcagggcaacct 197

Query: 121 gctgccatgggacgtccagcgaatgaatgaa-gtaaaaccaatgccttcaccgggcagta 179
          |||
Sbjct: 198 gctgccatgggacgtccagcgaatgaatgaaagtaaaaccaatgccttcaccgggcagta 257

Query: 180 aactcagaagtgttgattcaattcattccgtgcgaaagccgggtttttta-ccggcgtc 238
          |||
Sbjct: 258 aactcagaagtgttgattcaattcattccgtgcgaaagccgggttttttatccggcgtc 317

Query: 239 tttgacgaacaactgcctatcagccagcagtgccggtgtagtgactgccatggcggt 298
          |||
Sbjct: 318 tttgacgaacaactgcctatcagccagcagtgccggtgtagtgactgccatggcggt 377

Query: 299 gacgggagcgggggattagggttcgattccggagagggagcctgagaaatagctaccact 358
          |||
Sbjct: 378 gacgggagcgggggattagggttcgattccggagagggagcctgagaaatagctaccact 437

Query: 359 tctacggagggcagcagggcgcaaatg 387
          |||
Sbjct: 438 tctacggagggcagcagggcgcaaatg 466

```

**Figura 25.** Homología entre la secuencia de la clona M13Tc1 obtenida con la genoteca de *T.cruzi* clonada en el sistema TOPO TA y la secuencia del gen del RNA ribosomal 18S de *Tripanosoma cruzi*.

**Tabla 3.** Análisis de la secuencia M13Tc1 de *T.cruzi* aislado Campeche.

Homología de la secuencia	Identidad	Acceso a la base de datos
Proteína de TC3 47112.3 de <i>T.cruzi</i>	25% (16/62)	gb AAM08903.1
Antígeno de 140/116 KDa de <i>T.cruzi</i>	36% (9/25)	gb AAA67560.1
Probable proteína flagelar	75% (9/12)	pir   A61144
p-glicoproteína de <i>T.cruzi</i>	42% (8/19)	pir   T14633



La clona M13Tc2 presentó homología del 98-100% con pequeñas regiones satélites del cromosoma 17 de humano y el cromosoma 2 de ratón, aunque se encontró 25% de similitud con alfa-tubulina de *T. cruzi* sin importancia estadísticamente significativas.

### Secuencia M13Tc2

```

CCCTTTTGAT TGCTGTGCCG TGTCTCACT AAAACATTAA CTGCGCCATC CACTCTTCCC 60
GTCCCCACTA ACAATCGGTG CTTCTGCTCC CCATTAACCA TCCCCCACC CAAACACACA 120
CGTATGGAGG CATCTTCCCA ATACCCTCTT TTCGTCTCCTCC CCAAACCCCA CTACCACCCG 180
ACGGAGACAC GACAGTTTCG CACGTAATGG CGGTAATGCG AGGGAAGGGC ACGCAACAGC 240
AGCAGCAGCT CCCCTCTCCT CCCATCGCTT TGACAAGTGT GCGTGCATCC TCCGTGACGC 300
CCTGTCCAC GCGTGCGTAC CGGAGACAAA CACACACACA CACACACACA AAAAGAAAGA 360
AGAAACAAAA CCAAACAAG CTAAACATGG AAGGATACGT ACCATTGAAT GCATGGAACA 420

```

**Tabla 4. Análisis de la secuencia M13Tc2 de *T. cruzi* aislado Campeche.**

Homología de la secuencia	Identidad	Acceso a la base de datos
Secuencia completa de Homo sapiens chromosome 17, clone CTD-2510F5	93% (28/30)	<a href="http://gi 28927880 gb AC099850.7 ">gi 28927880 gb AC099850.7 </a>
Drosophila melanogaster chromosome 3R	100% (23/23)	<a href="http://gi 23171576 gb AE003719.3 ">gi 23171576 gb AE003719.3 </a>
Mouse DNA sequence from clone RP23-219M22 on chromosome 2	100% (23/23)	<a href="http://gi 37515831 emb AL844579.10 ">gi 37515831 emb AL844579.10 </a>
Mus musculus 2 days neonate thymus thymic cells cDNA	100% (23/23)	<a href="http://gi 26105045 dbj AK089031.1 ">gi 26105045 dbj AK089031.1 </a>
Arabidopsis thaliana chromosome 2 clone F24H14 map CIC06E08	96% (25/26)	> <a href="http://gi 20197571 gb AC006135.3 ">gi 20197571 gb AC006135.3 </a>

## 13. DISCUSIÓN

---

El diagnóstico de individuos infectados con *T. cruzi* se realiza mediante la detección de anticuerpos específicos en suero. Las pruebas inmunológicas que se emplean para tal fin utilizan como antígeno una mezcla compleja de diversas moléculas obtenidas de parásitos lisados, dicha heterogeneidad en el antígeno puede originar reacciones falsas positivas o reacciones cruzadas con otros patógenos específicos como *Leishmania* y *T. rangeli*. El uso de la tecnología de DNA recombinante para la síntesis de péptidos ha provocado que la sensibilidad y la especificidad de las pruebas diagnósticas se vea beneficiada.

Se amplificó una genoteca de cDNA de *T. cruzi* y se clonó en dos vectores:

- ZAP Express II, puede expresarse en procariontes y eucariontes, incrementa la capacidad de clonación y el número de sitios únicos de clonación en el fago lambda, esto garantiza que la genoteca sea representativa y que al menos contenga un clon de cDNA representando cada RNAm en la célula.
- pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO, liga más rápido produciendo un 99% de recombinantes, siendo la enzima DNA topoisomerasa I la clave de la ligación. Este sistema de clonación garantiza la obtención de recombinantes de forma muy eficiente.

Se identificaron 30 clonas recombinantes de ambas estrategias de clonación, de las cuales se ha obtenido la secuencia de las clonas Tc1C, Tc2C, M13Tc1 y M13Tc2.

El análisis de la secuencia Tc1C no presentó homología con el banco de genes reportado para *T. cruzi*, ni para otros genes que se encuentran el Gene Bank; por lo que se puede sugerir que esta es una secuencia nueva del parásito aun por caracterizar. La relevancia de haber obtenido una secuencia nueva radica en

determinar si la información contenida es la necesaria para un péptido con probable aplicación diagnóstica, evitando las reacciones cruzadas y desarrollando una prueba con el 100% de especificidad y sensibilidad, con un valor de predicción positivo alto. La secuencia Tc2C presentó homología con un RNA ribosomal S5 de *Homo sapiens*, no se sabe cual es la causa por la que fue identificado por los anticuerpos presentes en suero, aunque no se descarta la posibilidad de contaminación.

Por otra parte, el análisis de la secuencia M13Tc1 clonada en pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO presentó homología total con la secuencia del gen del RNA ribosomal 18S de *T.cruzi*. El RNA ribosomal 18S es muy conservado filogenéticamente lo que le da importancia evolutiva y como patrón de diferenciación entre cepas de distintas regiones geográficas; es decir, determina las relaciones filogenéticas que existen entre diversas cepas de *T.cruzi*. Se puede pensar que es poco probable que una secuencia de RNA ribosomal fuera antigénica en pacientes de Chagas. Sin embargo, se ha encontrado que clonas con secuencias de RNA ribosomal de *Leishmania* son reconocidos por sueros de personas con Leishmaniosis. No hay una explicación definitiva para esto, pero existen antecedentes de enfermedades autoinmunes en las que se ha descrito la existencia de anticuerpos frente a ciertos motivos de RNAr (37) (30). Además, presentó homología alta en un fragmento muy pequeño con proteínas de membrana y de flagelo del parásito. Esto sugiere que se identificó un dominio de estas proteínas de alto peso molecular que probablemente también está presente en otras proteínas.

La secuencia M13Tc2 presentó homología con muchas secuencias satélites de humano y de ratón que probablemente indiquen contaminación. Sin embargo, con el genoma de *T.cruzi* se encontraron homologías puntuales con alfa-tubulina, la cual es una proteína que se encuentra en la membrana celular del parásito.

Los resultados del Western blot muestran que existe una banda común de 133 KDa en todas las clonas, esto sugiere que con el sistema TOPO se tienen

recombinantes que expresan proteínas quiméricas con la proteína codificada por el gen Lac Z $\beta$ . Estas proteínas son identificadas por los anticuerpos presentes en sueros positivos a Chagas. Las otras bandas identificadas en el Western blot podrían ser fragmentos de péptidos producidos por digestión enzimática inespecífica, o productos de traducciones abortivas de un mensajero policistrónico. Estas hipótesis podrían ser probadas analizando los mensajeros producidos por las clonas mediante Northern blot utilizando como sondas las regiones de LacZ $\beta$ , ori f1 y la de resistencia a Kanamicina para determinar si existe uno o varios mensajeros y de que talla.

Da Silveira (2001) y cols. mencionan que algunos grupos de investigación han tratado de identificar fracciones antigénicas he inmunodominantes de *T. cruzi* que puedan ser usadas en pruebas diagnosticas, aunque no se ha logrado obtener un antígeno capaz de ser identificado por el 100% de anticuerpos presentes en el suero de pacientes chagásicos con alta sensibilidad y especificidad.

Los antígenos de *T. cruzi* son específicos en cada uno de los dos estadios de la Tripanosomiasis. Este es el caso del antígeno SAPA (shed acute-phase antigen) que es detectado por el 90% de sueros positivos agudos y el 10-49% en individuos crónicos. La respuesta del antígeno SAPA esta relacionada con la fase aguda de la enfermedad de Chagas, cuando los parásitos son abundantes en sangre. Se ha demostrado que la respuesta anti-SAPA esta fuertemente asociada con la infección temprana y tardía. La determinación del antígeno SAPA no presenta diferencias significativas en pacientes con y sin resultados positivos a las pruebas de aglutinación y PCR, sin embargo, en algunos casos asintomáticos y sintomáticos no se ha podido determinar. Se propone el uso del antígeno SAPA para el diagnóstico de recién nacidos y casos tempranos de la infección con *T. cruzi*.

Se han utilizado mezclas de antígenos recombinantes para el diagnóstico que muestran secuencias muy similares o idénticas entre si, a las cuales se les ha

nombrado de diferente forma y se han agrupado con base en la estructura celular de donde fueron identificadas. Las mezclas de antígenos recombinantes con SAPA presentan 100% de sensibilidad y 99.3% de especificidad, además no se detectan reacciones cruzada con sueros de personas con *Leishmania* o *T.rangeli*. Esto sugiere que esta mezcla de antígenos podría ser utilizada para el diagnóstico en ambos estadios. Sin embargo, estas fracciones antigénicas se han obtenido de cepas sudamericanas, que presentan diferencias genéticas con las cepas mexicanas, esto ocasiona dificultades en el diagnóstico de la tripanosomiasis en México. Por lo que fue importante para nosotros, usar un aislado mexicano de *T.cruzi* para obtener cultivos homogéneos que nos permitan determinar la heterogeneidad antigénica que presentan las cepas mexicanas con las sudamericanas, evitando la falta de especificidad en el diagnóstico. Además, el hecho de usar cultivos de epimastigotes para la obtención de antígenos recombinantes nos da una idea de las características que tienen las moléculas antigénicas presentes en la fase infectiva para el hombre, que son los tripomastigotes.

Está documentado que *T.cruzi* tiene antígenos de 45 y 29 KDa que pertenecen al flagelo el cual juega un papel importante en la movilidad del parásito y es reconocido por sus características antigénicas frente a sueros de chagásicos (21) (38). Los antígenos de 116 KDa con características antigénicas que son de citoplasma están bien definidos en epimastigotes y tripomastigotes, han mostrado reactividad frente anticuerpos anti-*T.cruzi* presentes en el suero de conejos inmunizados con proteínas solubles del parásito e identificados por RIA. Las alfa-tubulinas y glicoproteínas (4) de *T.cruzi* se han identificado por IFI en antígenos obtenidos a partir de genotecas de  $\square$ gt11.y las proteínas de 70 KDa que son de la familia de las hsp (proteínas de choque térmico) presentes en membrana (18) juegan un papel importante en la resistencia a los cambios de temperatura a los que se somete el parásito en sus diferentes ambientes (vector y hospederos vertebrados e invertebrados).

## 14. CONCLUSIONES

---

- Se identificaron 30 clonas mediante dos sistemas de clonación, de las cuales se tiene el análisis de cuatro, quedan pendientes 26 clonas. Del análisis de las cuatro secuencias, la clona Tc1C podría tratarse de una nueva proteína cuya certificación será necesario repetir bajo las mismas condiciones experimentales. La clona Tc2C presentó homología con RNA ribosomal S5 de *Homo sapiens*, M13Tc1 mostró homología con una secuencia completa del gen del RNA ribosomal 18S de *Trypanosoma cruzi* y M13Tc2 presentó homología del 98-100% con pequeñas regiones satélites del cromosoma 17 de humano y el cromosoma 2 de ratón, aunque se encontró 25% de similitud con alfa-tubulina de *T.cruzi*.
- Se sugiere en un futuro, utilizar un sistema de Inmunodetección revelado con yodo radioactivo que permita seleccionar un mayor número de clonas de un modo más sensible.
- Es necesario continuar con este trabajo, debido a la importancia epidemiológica que tiene la enfermedad de Chagas en México

## 15. BIBLIOGRAFÍA

---

1. **Affranchino, J.L., Ibanez, C.F., Luquetti, A.O., Rassi, A., Reyes, M.B., Macina, R.A., Aslund, L., Pettersson, U. Frasch, A.C.** 1989. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* **34**:221-8.
2. **Alejandre, A.R., Noguera, T.B., Calvo, M.M.L. Cortés, J.M.** 1993. Comparative study of the susceptibility of 5 triatomine species (Insecta: reduviidae) to *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Latinoam Microbiol* **35**:201-206.
3. **Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. Lipman, D.J.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
4. **Andrews, N.W., Katzin, A.M. Colli, W.** 1984. Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity. *Eur J Biochem* **140**:599-604.
5. **Avila, A., Borges, P., Thiemann, O., De Pavia, E., Degrave, W., Morel, C. Simpson, L.** 1993. 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. of Clin. Microbiol.* **31**:2421-2426.
6. **Bonilla, G. del Mazo, J.** 2003. Deregulation of gene expression in fetal oocytes exposed to doxorubicin. *Biochem. Pharmacol.* **65**:1701-1707.
7. **Botero, D. Restrepo, M.** 2001. *Parasitosis humanas*, 3a. ed. Corporación para investigaciones biológicas, Colombia.
8. **Burns, J.M., Shreffler, W.G., Rosman, D.E., Sleath, P.R., March, C. Reed, S.** 1992. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:1239-1243.

9. **Calvo, M., Noguera, T., Alejandro, A. Cortés, J.** 1994. Infección experimental con *Trypanosoma cruzi* a través de agua y alimentos contaminados. Rev. Lat. Amer. Microbiol. **36**:67-69.
10. **Camargo, E. Chiari, E.** 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **6**:93-100.
11. **Cevallos, A. Hernández, R.** 2001. *Trypanosoma cruzi* y la Enfermedad de Chagas.
12. **Cheng, C.** 1996. General Parasitology, 3a ed. Academic Press College.
13. **Chester, B., Clifton, J. Wayne, C.** 1994. Parasitología Clínica, 2a. ed. Editorial Salvat. Ciencia y cultura Latinoamericana, S.A. de C.V., México.
14. **Committee, W.E.** 2002. Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser. **905**:1-109.
15. **Cruz, R.A. Camargo, C.B.** 2001. Glosario de términos en Parasitología y ciencias afines, 1a. ed. Plaza y Valdez Editores, México, D.F.
16. **Deane, M., Moriearty, P. Thomaz, N.** 1984. Cell Differentiation in Trypanosomatids and other parasitic protozoa. Morel, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.
17. **Dias, J.C., Silveira, A.C. Schofield, C.J.** 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **97**:603-612.
18. **Dragon, E.A., Sias, S., Kato, E. Gabe, J.** 1987. The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. Mol Cell Biol **7**:1271-1275.
19. **Dumonteil, E., Gourbiere, S., Barrera, P.M., Rodriguez, F.E., Ruiz, P.H., Banos, L.O., Ramirez, S.M.J., Menu, F. Rabinovich, J.E.** 2002. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan peninsula of México. Am. J. Trop. Med. Hyg. **67**:173-183.
20. **Ferreira, A.W., Belem, Z.R., Lemos, E.A., Reed, S. Campos-Neto, A.** 2001. Enzyme-linked immuinosorbent assay for serological diagnosis of



- Chagas' disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. J Clin Microbiol **39**:4390-4395.
21. **Frasch, A.C., Cazzulo, J., Aslund, L. Pettersson, U.** 1991. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. Parasitol Today **7**:148-151.
  22. **Frasch, A.C. Reyes, M.B.** 1990. Diagnosis of Chagas disease using recombinant DNA technology. Parasitol Today **6**:137-139.
  23. **Gajate, P., Pietrokovsky, S., L, O.A., Perez, O., Monte, A., Belmonte, J. Wisnivesky, C.C.** 2001. Links *Triatoma infestans* in Greater Buenos Aires, Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **96**:473-477.
  24. **García, E., Ramírez, L., Monteon, V. Sotelo, J.** 1995. Diagnosis of American Trypanosomiasis (Chagas' Disease) by the New Complement Fixation Test. J. of Clin. Microbiol. **33**:1034-1035.
  25. **Guzmán, B., García, G., Floriani, V., Guerrero, M., Torres, C., Ramírez, M. Velasco, C.** 1998. Riesgo de transmisión de sangre en México. Pan. Am. J. Public. Health. **4**:94-99.
  26. **Guzmán, B.C.** 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. Trends Parasitol. **17**:372-6.
  27. **Guzmán, B.C., Lahuerta, S. Velasco, C.O.** 1998. Chagas disease. First congenital case report. Arch. Med. Res. **29**:195-196.
  28. **Hyde, J.** 1993. Methods in Molecular Biology. Protocols in Molecular Parasitology, vol. 21. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
  29. **Ibañez, C.F., Affranchino, J.L. Frasc, A.C.** 1987. Antigenic determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA. Mol Biochem Parasitol **25**:175-184.
  30. **Ibarra, S., Soto, M., Carrion, J., Nieto, A. Requena, J.M.** 2003. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. Infect Immun. **71**:6562-72.
  31. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.

32. **Lewinsohn, R.** 1979. Carlos Chagas (1879-1934): The discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American Tripanosomiasis. Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg. **73**:513-523.
33. **Lopez, G. Moreno, J.** 1995. Genetic variability and differentiation between populations of *Rhodnius prolixus* and *R. pallescens*, vectors of Chagas' disease in Colombia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **90**:353-357.
34. **OPS.** 1994. La Enfermedad de Chagas y el Sistema Nervioso. Publicación científica de la OPS **547**.
35. **Paredes, G.E.A., Valdéz, M.J., Noguera, T.B., Alejandre, A.R. Canett, R.R.** 2001. Vectorial importance of triatominae bugs (*hemiptera: reduviidae*) in Guaymas, México. Rev. Latinoam. Microbiol. **3**:119-122.
36. **Perez, D.G.A., Escalante, G.R., Sousa, A.H.S. Babr, G.A.** 1995. Carlos Chagas y la enfermedad de Chagas. Rev. Soc. Venezolana de Gastroenterol. **49**:179-188.
37. **Petry, K. Eisen, H.** 1989. Chagas disease: A model for the study of autoimmune diseases. Parasitol Today **5**:111-116.
38. **Pinto, A., Campana, P., Beltramini, L., Silber, A. Araujo, A.** 2003. Structural characterization of a recombinant flagellar calcium-binding protein from *Trypanosoma cruzi*. Biochim. Biophys. Acta **1652**:107-14.
39. **Ponce, C.** 1999. Towards the elimination of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in Honduras and Central American countries. Medicina (B Aires) **59**:117-119.
40. **Requena, J.M., Lopez, M.C. Alonso, C.** 1996. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Today **12**:279-283.
41. **Riarte, A., Luna, C., Sabatiello, R., Sinagra, A., Schiavelli, R., De Rissio, A., Maiolo, E., García, M.M., Jacob, N., Pattin, M., Lauricella, M., Segura, E.L. Vazquez, M.** 1999. Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience. Clin. Infect. Diseases **29**:561-567.
42. **Sambrook, J., Fritsch, E. Maniatis, T.** 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2th ed, vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press. CSH, New York, USA.

43. **Sanger, F., Nicklen, S. Coulson, R.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5363-5467.
44. **Sant'Anna, M.R., Diotaiuti, L., de Figueiredo, G.A., de Figueiredo, G.N. Pereira, M.H.** 2001. Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: Influence of mechanical characteristics and salivary function. J. Insect. Physiol. **47**:1459-1465.
45. **Shikanai, Y.M.A., Brisola, M.C., Guedes, L.A., Siqueiros, G.S., Barone, A.A., Dias, J.C.P., Amato Neto, V., Tolezano, J.E., Peres, B.A., Arruda Jr, E.R., Lopes, M.H., Shiroma, M. Chapadeiro, E.** 1991. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo **33**:351-357.
46. **Shore, G.** 2001. Diagnostic Medical Parasitology, 4th ed. ASM Press, Washington.
47. **Towbin, H., Staehelin, T. Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**:4350-4354.
48. **Urban, V. Fischer, V.** 2001. Unlocking the secrets of Trypanosome kinetoplast DNA network replication. Protist. **152**:255-262.
49. **Velasco, C.O., Guzmán, B.C., Cruz, R.J., Lopez, O.O. Gonzalez, D.F.** 1991. La enfermedad de Chagas. Una revisión historica suscita y parcial de lo que ocurre en México y en el mundo. Publicación Técnica del INDRE. **8**.
50. **Vidal, A.V., Ibanez, B.S. Martínez, C.C.** 2000. Natural *Trypanosoma cruzi* infection of Triatominae bugs associated with human habitations in México. Sal. Pub. Méx. **42**:496-503.
51. **Vidal, A.V., Ibáñez, B.S. Martínez, C.C.** 2000. Infección natural de chinches triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. Sal. Púb. Méx. **6**:496-503.

## 16. ANEXO 1

---

### 16.1. Preparación de soluciones.

#### 16.1.1. Fosfato bufferado salino, PBS pH = 7.4

- Cloruro de sodio (NaCl) 136 mM
- Cloruro de potasio (KCl) 26 mM
- Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1.7 mM
- Fosfato de sodio bibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 8 mM

#### 16.1.2. Solución de Lisis-RT

Se prepara inmediatamente antes de usarse.

- Amortiguador 5X de la retrotranscriptasa 10  $\mu$ l
- Ditionitrol (DTT) 0.1 M 5.0  $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O DEPC 30  $\mu$ l
- Igepal 10% (v/v) 2.5  $\mu$ l
- RNAsin (40 U/ $\mu$ l, Promega) 2.0  $\mu$ l
- Stock de nucleótidos 1/24 1.0  $\mu$ l
- Oligo (dT)<sub>17</sub> 37.5  $\mu$ M 0.4  $\mu$ l

#### 16.1.3. H<sub>2</sub>O DEPC

Agua tratada con una solución alcohólica de Dietil Pirocarbonato (DEPC) al 0.1 % (v/v). Se incubo 24 horas a 37°C con agitación vigorosa y se esterilizo en autoclave a 120°C (15 lb) durante 15 minutos.

#### 16.1.4. Amortiguador de carga de electroforesis de DNA

- Glicerol 50% (v/v)
- SDS 0.1% (p/v)
- EDTA 0.1 M
- Azul de Bromofenol 0.025% (p/v)

- Xilencianol 0.025% (p/v)

#### **16.1.5. Solución de Bromuro de Etidio 10 mg/ml**

- Se usa para teñir geles de agarosa a una concentración final de 3.3  $\mu$ g/ml

#### **16.1.6. Amortiguador SM**

- NaCl 0.1 M
- MgSO<sub>4</sub> 10 mM
- Tris-HCl 50 mM, pH = 7.5
- Gelatina 0.01% (p/v)

Esterilizar en autoclave y almacenar a 4°C.

#### **16.1.7. Amortiguador TAE**

- Tris-HCl 1.6 M
- Acetato de Sodio 0.8 M
- EDTA 2mM, pH = 8

#### **16.1.8. Amortiguador TBE**

- Tris-HCl 90 mM
- Ácido Borico 90 mM
- EDTA 2 mM, pH = 8

#### **16.1.9. Amortiguador TE**

- Tris-HCl 10 mM, pH = 7.5
- EDTA 1 mM, pH = 8

#### **16.1.10. Amortiguador TBS**

- Tris-HCl 10 mM
- NaCl 0.9 %

Ajustar el pH de la solución a 7.4

#### **16.1.11. Amortiguador TBS-A**

- $\text{NaN}_3$  0.02 % (p/v) en TBS

#### **16.1.12. Amortiguador TBS-T**

- Tween-20 0.1 % (p/v) en TBS

#### **16.1.13. Solución de 4-Cloro-1-naftol**

Mezclar inmediatamente antes de usar lo siguiente:

- 10 ml de 4-cloro-1-naftol 3 mg/ml de Metanol
- 50 ml de TBS
- 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 %

#### **16.1.14. Solución de IPTG 10 mM.**

Isopropil- $\beta$ -D-Tiogalactopiranosido. Se preparo una solución 10 mM en agua pesando 0.07 g en 10ml de  $\text{H}_2\text{O}$  d.d.e.

## 17. ANEXO 2

---

### 17.1. Medios de Cultivo

#### 17.1.1. Medio LIT (Liver-Infusion-Triptona)

Revisado inicialmente por el Dr. R. Vaeger de la Universidad de Tulane. Los primeros reportes de crecimiento fueron por Camargo en 1964 (10).

Composición:

• Cloruro de sodio (NaCl)	4.0 g
• Cloruro de potasio (KCl)	0.4 g
• Fosfato bibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	8.0 g
• Glucosa	2.0 g
• Triptosa	5.0 g
• Infusión de caldo de hígado	5.0 g
• Hemina	25 mg
• Suero Fetal Bovino	10% Conc. Final
• H <sub>2</sub> O d.d.e	1000 ml

Preparación:

1. Primero se preparo la Hemina pesando 0.25 g en 5 ml de trietanol amina, se esterilizo por filtración.
2. El suero estéril se inactivo 30 minutos a 56°C antes de tomar la cantidad necesaria para tener una concentración final al 10%.
3. Con excepción de la Hemina y el Suero, todos los componentes se disolvieron en agua, se ajusto el pH = 7.2 y se esterilizo por autoclave a 120°C (15 lb) durante 15 minutos. Se sometió a prueba de esterilidad 3 días y antes de ser usado se complemento con 50 µl de Hemina por cada 100 ml de medio y con el 10% de suero fetal inactivado.

### 17.1.2. Medio LB (Luria-Bertani)

Se usa para el crecimiento y selección de colonias fagicas

Composición:

- |                                 |                |
|---------------------------------|----------------|
| • Tryptona al 1 %               | 10 g           |
| • Extracto de Levadura al 0.5 % | 5 g            |
| • NaCl al 1 %                   | 10 g           |
| • H <sub>2</sub> O              | c.b.p. 1000 ml |

Preparación:

1. Se disolvieron todos los componentes en 900 ml de agua, se ajusto el pH en 7 y se llevo el volumen a 1 litro. Se esterilizo 20 minutos a 15 lb y se dejo enfriar a 55°C para adicionarle el antibiótico según sea el caso:

Tetraciclina: 1.25 ml de una solución 5 mg/ml

Kanamicina: De una solución de 50 mg/ml, agregar \_ □l por cada ml de medio.

2. Para la selección de cultivos, el medio se complemento con:

- MgSO<sub>4</sub> 10 mM
- Maltosa 0.2 % (p/v)
- IPTG 0.5 mM
- X-Gal 40 mg/ml (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyl-□-D-galactopiranosido)



### **17.1.3. Placas de LB-Agar**

Preparación:

1. Para un litro de LB, se agregaron 20 g de agar. Se esterilizo 20 minutos a 15 lb y se deajo enfriar a 55°C para agregar el antibiótico e inmediatamente vaciar sobre placas Petri de 132 mm y placas chicas. Después de dejar solidificar se almacenaron a 4°C protegidas de la luz.

### **17.1.4. Medio NZY Top-agar**

Medio semisólido que sirve para difundir los fagos sobre las placas de agar.

Composición:

- NaCl 0.5% 5 g
- MgSO<sub>4</sub> 0.2 % 2 g
- Extracto de levadura 0.5 % 5 g
- NZ Amina (hidrolizado de caseína) 1% 10 g
- Agarosa 0.7 % 7 g
- H<sub>2</sub>O d.d.e. 1000 ml

Preparación:

1. Con excepción de la agarosa, se disolvieron todos los reactivos en 800 ml de agua, se ajusto el pH a 7.5. Se agrego la agarosa y se esterilizo 20 minutos a 15 lb. El medio se almaceno a 4°C y cada que se usa se funde a 55°C.

### **17.1.5. Membranas de nitrocelulosa impregnadas con IPTG 10 mM.**

Se colocaron las membranas en una solución de IPTG 10 mM durante 10 minutos, se elimino el exceso de líquido y se colocaron sobre el tapete bacteriano en placas de LB-Tetraciclina en donde se deajo incubando 5 horas a 37°C.

### **17.1.6. Placas de agar con Bromuro de Etidio**

Medio sólido que sirve para cuantificar DNA visualizado con UV.

Composición:

- 100 ml de Agarosa al 0.8% (p/v)
- TAE 1X
- 10 $\mu$ l de Bromuro de Etidio (10 mg/ml)

Preparación:

Se prepararon 100 ml de agarosa al 0.8% en amortiguador TAE, se fundió la agarosa a 50°C y se adiciono el Bromuro de Etidio. Se mezclo perfectamente y se vaciaron 10 ml sobre placas Petri de 100 mm. Se almacenaron a 4°C protegidas de la luz.

## 18. ANEXO 3

---

### 18.1. Esquemas de Inmunización de Animales

El antígeno (Ag) se preparó de un cultivo de 20 días del aislado Campeche de *T. cruzi*. El medio se eliminó por centrifugación y se lavó con PBS. Se contaron  $1 \times 10^6$  flagelados/ml en cámara de Neubauer y se reventaron las células en una solución de lisis con inhibidores de proteasas y una incubación en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó a  $2000 \times g$  y el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo en donde se determinó la concentración de proteínas a 280 nm en un espectrofotómetro.

#### 18.1.1. Esquema para inmunizar conejo.

Inyección No.	Tiempo (día)	Dosis y vía
1	0	5 mg de Ag disuelto en 1 ml de solución salina, emulsificado con 1 ml de adyuvante completo de Freud. Vía ID en sitios múltiples.
2	15	Igual que el anterior usando adyuvante incompleto de Freud.
3	30	0.25 mg de Ag en solución salina. Vía IV
4	31	0.50 mg de Ag en solución salina. Vía IV
5	32	1mg de Ag en solución salina. Vía IV
Sangrar	39	

#### 18.1.2. Esquema de inmunización de ratón

Se inocularon cuatro ratones Balb/c de 4 semanas de edad con  $40 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  de antígeno total de *T. cruzi* aislado Campeche. A los 30 días se realizó una segunda inoculación y se sacrificaron a los 8 días recolectando la sangre por punción cardiaca. Se separó el suero para ser usado como anticuerpo.

## 19. ANEXO 4

---

### 19.1. Técnicas complementarias.

#### 19.1.1. Dot-blot

El Antígeno se preparo como en el Anexo III. Se depositaron 5  $\mu$ g/5 $\mu$ l del Ag sobre membranas de nitrocelulosa de 1 cm<sup>2</sup> previamente humedecidas en agua. Las membranas se incubaron 30 minutos a 37°C, posteriormente se bloquearon sitios inespecíficos con TBSA-Leche al 5% durante 1 hora a 37°C. Se adiciono el primer anticuerpo (suero humano positivo a Chagas) en las siguientes diluciones: 1:250, 1:500 y 1:1000. Transcurrido el tiempo, las membranas se lavaron con TBS-T y se incubo durante 1 hora a 37°C en el segundo anticuerpo diluido 1:1000 en TBS-T (Anti-IgG conjugada a peroxidasa de rábano). Después de lavarlas se revelo la reacción con 4-CN.

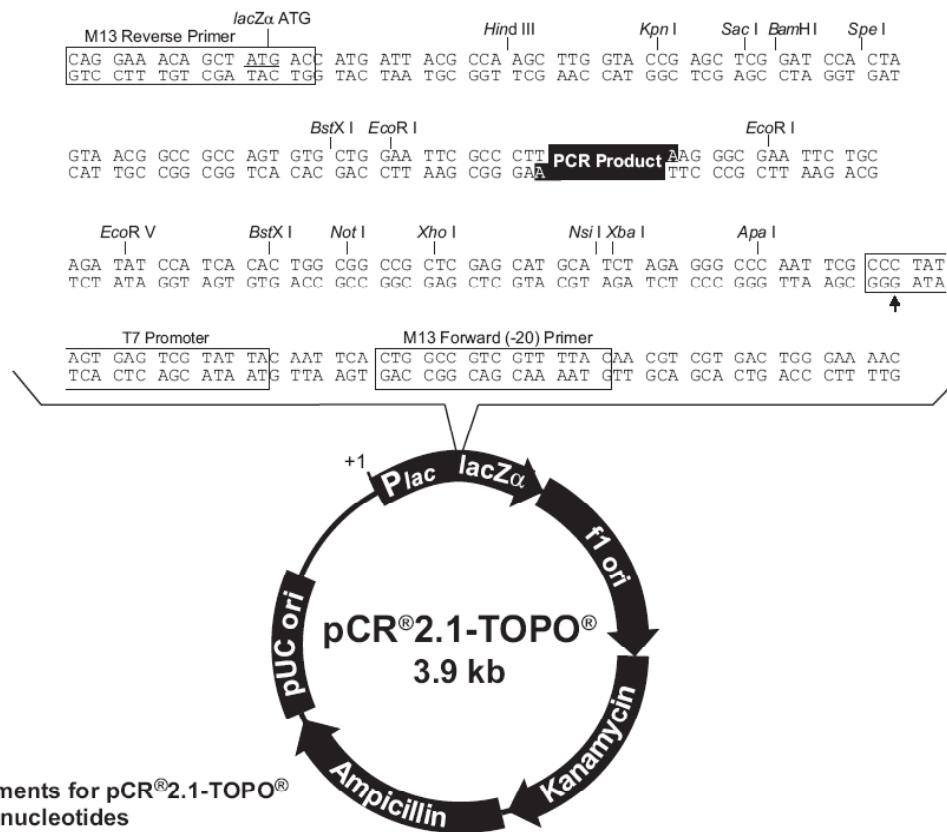
#### 19.1.2. Preparación de lisados de *E.coli* para absorción de anticuerpos anti- *E.coli*

Se creció un cultivo nocturno de *E.coli* XL1-blue en medio LB, las bacterias se cosecharon y se resuspendieron en amortiguador TE para ser lisadas por sonicación. El lisado se centrifugo a 12,000 x g durante 10 minutos a 4°C para separar el sobrenadante en un tubo nuevo y se almaceno a -4°C.

El lisado se adicionó a las diferentes diluciones del suero en una relación de 0.5 ml de lisado por cada ml de suero. La mezcla se incubo 4 horas a temperatura ambiente y después se uso para la Inmunodetección y el Western blot. El suero absorbido fue almacenado a 4°C en presencia de azida de sodio (42).

## 20. ANEXO 5. Mapa de restricción de los vectores utilizados.

### pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>



Comments for pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>  
3931 nucleotides

- LacZα fragment: bases 1-547
- M13 reverse priming site: bases 205-221
- Multiple cloning site: bases 234-357
- T7 promoter/priming site: bases 364-383
- M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
- f1 origin: bases 548-985
- Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
- Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
- pUC origin: bases 3136-3809

Vector Zap Express®.

