



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

PURIFICACIÓN DE ANTÍGENOS EXCRETADOS/SECRETADOS DE LAS
FORMAS TRIPOMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi* POR CROMATOGRAFÍA
DE AFINIDAD, PARA SER UTILIZADOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS
(Modalidad: Investigación)

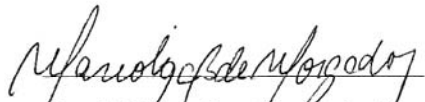
MARÍA ALEXANDRA FIGUERA CHIRINOS

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOANÁLISIS

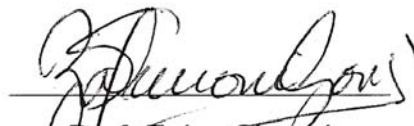
CUMANÁ, 2008

PURIFICACIÓN DE ANTÍGENOS EXCRETADOS/SECRETADOS DE LAS
FORMAS TRIPOMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi* POR
CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD, PARA SER UTILIZADOS EN EL
DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

APROBADO POR:


Prof. Mariolga Berrizbeitia
Asesora Académica


Prof. Del Valle Guilarte


Prof. Zulay Simoni

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
Antígenos TESA de <i>T. cruzi</i>	7
Purificación de los antígenos TESA por cromatografía de afinidad usando una resina de concanavalina A.....	7
Preparación de la columna cromatográfica con la resina concanavalina A	7
Aplicación de la muestra de TESA	8
Elución de la proteína TESA.....	8
Electroforesis de las proteínas purificadas de TESA	8
Preparación de las muestras para la corrida electroforética	8
Corrida electroforética de las fracciones purificadas	9
Tinción de plata de los geles de poliacrilamida	9
Tinción de Coomasie coloidal de los geles de poliacrilamida	10
Determinación de la concentración de las proteínas purificadas de TESA mediante el método de Bradford.....	10
Preparación de estándares y muestras	11
Concentración de las fracciones de la proteína purificadas de TESA para el Western blot	12
Western blot de las proteínas purificadas de TESA.....	12
Transferencia de las proteínas purificadas separadas por electroforesis.....	12

Bloqueo de las membranas de nitrocelulosa e incubación con el pool de sueros positivos para la enfermedad de Chagas	12
Revelado con diaminobencidina (Sigma)	13
Revelado por quimioluminiscencia.....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
CONCLUSIONES	21
RECOMENDACIONES	22
BIBLIOGRAFÍA	23
APÉNDICES.....	28
Hoja de Metadatos	38

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a la profesora Mariolga Berrizbeitia, mi asesora académica, que con sus conocimientos y experiencia supo guiarme para una buena realización de mi trabajo de grado.

A la M.Sc. Jessica Rodríguez y las licenciadas Mayelys González, Milagros Figueroa, la profesora Del Valle Guilarte, el profesor Tomás Hermoso y a la Magister María Narváez, por su colaboración y apoyo.

Y a todos aquellos, que de una u otra manera contribuyeron a la culminación exitosa de este trabajo de grado, como los profesores: Luz Bettina Villalobos, Antonio Maldonado, José Bubis y Mairín Lemus. A todos ellos muchas gracias.

DEDICATORIA

Dedicado primeramente a Dios padre celestial, para su gloria, por mostrarme y darme todo lo necesario para vencer.

A mi madre Doris Chirinos, por su apoyo y amor incondicional.

A mi padre Alexis Figuera, por sus sabios consejos oportunamente.

A la profesora Mariolga Berrizbeitia, por ser en la realización de este trabajo, más que una asesora académica.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de estándares de albúmina para la determinación de proteínas mediante el método de Bradford.	11
Tabla 2. Preparación del buffer muestra.	33
Tabla 3. Preparación de los geles de poliacrilamida al 7,00% para la corrida electroforética de las fracciones purificadas.	34
Tabla 4. Preparación de los geles de poliacrilamida al 10,00% para la corrida electroforética de las fracciones purificadas.	34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Separación electroforética unidimensional (SDS-PAGE) de bandas proteicas purificadas de TESA por cromatografía de afinidad con concanavalina A, visualizadas con coomassie blue brillante coloidal G-250. (Mr= masa relativa, 1 al 6 fracciones eluidas). L 1: lavado 1, L 3: lavado 3. Las flechas indican las bandas proteicas purificadas (220, 170, 45, 30 y 20 Mr)..... 16
- Figura 2. Separacion electroforética unidimensional (SDS-PAGE) de bandas proteicas purificadas de TESA por cromatografía de afinidad con concanavalina A, visualizadas con tinción de plata. (Mr= masa relativa, 1 al 10 fracciones eluidas). L1: lavado 1. Las flechas indican las bandas proteicas purificadas (220, 115, 85, 83 y 20 Mr). 17
- Figura 3. Representación del Western blot de las fracciones purificadas de los antígenos de TESA, con el pool de sueros chagásicos. Revelado con diaminobencidina. (A) patrón de peso molecular pre-teñido, (B) TESA total, (C) pool de sueros positivos para la enfermedad de Chagas (reconocimiento de una banda de aproximadamente 200 Mr)..... 18
- Figura 4. Western blot de las fracciones purificadas con concanavalina A de los antígenos de TESA, con el pool de sueros chagásicos. Revelado por quimioluminiscencia (Mr= masa relativa, 1 a 6 = fracciones eluidas, las flechas indican las proteínas purificadas reconocidas por el pool de sueros chagásicos. 19

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una infección endémica severa que afecta a millones de personas de América Central y del Sur, y es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. En la actualidad no existe una prueba estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Los métodos para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en su mayoría emplean extractos enteros o semipurificados de las formas epimastigotes de *T. cruzi*; estos antígenos pueden ocasionar reacciones cruzadas, principalmente con leishmaniasis. En el presente trabajo se realizó la purificación de los antígenos excretados/secretados de *T. cruzi* (TESA), por cromatografía de afinidad utilizando la resina concanavalina A. Estos antígenos fueron eluidos con una mezcla de glucosa y manosa de $0,3 \text{ mol l}^{-1}$. El SDS-PAGE teñido con coomasie blue coloidal permitió la visualización de 5 bandas de, aproximadamente, 220, 170, 45, 30 y 20 Mr. La inmunogenicidad fue evaluada por Western blot, obteniendo unas series de bandas inmunogénicas de 220, 85, 45, 30 y 20 Mr; utilizando un pool de sueros positivos para la enfermedad de Chagas. Sin embargo, el rendimiento proteico obtenido por éste método de purificación fue bajo ($1,22 \mu\text{g ml}^{-1}$), indicando que la cromatografía de afinidad con concanavalina A no es la más adecuada para su utilización como método rutinario para la obtención de antígenos inmunogénicos, para ser empleados en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*; ésta es una infección endémica severa que afecta a millones de personas de América Central y del Sur. Se estima que existen de 6 a 12 millones de personas infectadas por el parásito, principalmente en áreas rurales, dando como resultado de 23 000 a 43 000 muertes anuales (Peralta *et al.*, 1994; López *et al.*, 2000). *T. cruzi* posee un ciclo de vida que incluye cuatro estadios de desarrollo, comprendidos en dos fases: una en el vector invertebrado y otra en el hospedero mamífero. En el hombre y otros vertebrados, se presenta bajo las formas de tripomastigotes, localizados en la sangre, y amastigotes en los tejidos; en el invertebrado, se presenta como las formas de amastigote, epimastigote y tripomastigote metacíclicos (forma infectante en el hospedero) (Hómez *et al.*, 1995; Botero y Restrepo, 1998). El parásito es transmitido mayormente por insectos infectados de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (triatominos), sin embargo, otros modos de transmisión como la transfusión de sangre, trasplante de órganos, infección congénita e infección oral se han encontrado incluso en países en los cuales la enfermedad de Chagas no es endémica (Ponce, 1999; Edson *et al.*, 2000; Meira *et al.*, 2002; Gütlér *et al.*, 2003; Ponce *et al.*, 2005; Hunter *et al.*, 2006; Garrido *et al.*, 2007; Schmunis, 2007).

La enfermedad se caracteriza por una fase aguda breve, sumamente parasitaria, que no es diagnosticada en la mayoría de los casos; una fase indeterminada en la cual no hay signos ni síntomas clínicos, y el diagnóstico se realiza detectando la presencia de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi*, y por último, una fase crónica que persiste durante toda la vida, en donde sólo unos pocos parásitos son encontrados en la sangre y la cual se caracteriza por alteraciones cardíacas y digestivas, ésta última se presenta en los países del cono Sur (Umezawa *et al.*, 1996). La enfermedad de Chagas es una

enfermedad compleja, debido a que la mayoría de los pacientes se infectan sin tener conocimiento de la infección; pasando directamente a una fase indeterminada o silente (Botero y Restrepo, 1998). Entre el 10,00 al 20,00% de los pacientes infectados pueden desarrollar la fase crónica, pero en esta fase la patología es irreversible. El problema se agrava debido a que hasta el momento no existe una droga 100,00% eficaz contra el parásito. Se cuenta actualmente con dos fármacos: nifurtimox y benznidazole, los cuales sólo son efectivos en la fase aguda de la infección. Ambas drogas son altamente tóxicas para el ser humano ya que producen efectos secundarios como son: anorexia, pérdida de peso, erupciones cutáneas, náuseas, cólicos, diarreas, trombocitopenia, polineuropatía, entre otros. Estas drogas poseen poca eficacia durante las fases indeterminada y crónica (Engel *et al.*, 1998; Coura y De Castro, 2002). Asimismo, tampoco existe una prueba estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, por este motivo la Organización Panamericana de la Salud recomienda el uso de dos técnicas serológicas diferentes para el diagnóstico de esta patología (Cura *et al.*, 1994).

El diagnóstico diferencial de la enfermedad de Chagas varía de acuerdo a la forma clínica en que se encuentre el paciente; en la fase aguda se utilizan los métodos parasitológicos como el examen directo, hemocultivo y el xenodiagnóstico, sin embargo, estos métodos presentan una baja sensibilidad (menor al 50,00%) y consumen tiempo (Peralta *et al.*, 1994; Botero y Restrepo, 1998; Zavala, 2004). El diagnóstico para la fase crónica, se basa generalmente en los métodos serológicos como el ensayo inmunoenzimático ligado a una enzima (ELISA), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la hemaglutinación indirecta (HAI). La mayoría de estos métodos utilizan extractos enteros o semipurificados de la forma epimastigote de *T. cruzi*; estos antígenos pueden ocasionar reacciones cruzadas, principalmente debidas a anticuerpos desarrollados contra otros agentes de

parasitemias, como leishmaniasis (Umezawa *et al.*, 1996; Nakazawa *et al.*, 2001; Zavala, 2004; Ponce *et al.*, 2005).

La técnica serológica ideal para la enfermedad de Chagas debe ser fácil de realizar, rápida, confiable y poseer una elevada sensibilidad y especificidad. Muchas preparaciones antigénicas se han utilizado para el diagnóstico serológico de esta infección. De estas preparaciones, los antígenos excretados/secretados de las formas tripomastigotes de *T. cruzi* (TESA) han demostrado poseer excelente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Lopez *et al.*, 2000; Berrizbetia *et al.*, 2006). La caracterización de algunas de estas proteínas ha sido descrita, mostrando que muchas son miembros de la familia transialidasa (TS), las cuales se encuentran sujetas a la superficie celular de la forma tripomastigote de *T. cruzi* (Kesper *et al.*, 2000). Las transialidasas son glicoproteínas abundantes en mucina altamente glicosiladas, con azúcares unidos a residuos de serina y tirosina; éstas catalizan la transferencia del ácido sialico desde las células hospederas glicoconjugadas hasta las moléculas de mucina localizadas sobre la membrana de la superficie del parásito (Schenkman *et al.*, 1994; Frasch, 2000).

Se ha demostrado que las TS y el ácido-siálico participan en las interacciones parásito hospedero y median las etapas iniciales de la invasión de los tripomastigotes en las células hospederas (Schenkman *et al.*, 1994). La TS posee una región N-terminal donde radica un dominio catalítico y una región C-terminal, ambas regiones estimulan la respuesta celular de los linfocitos B en pacientes con la enfermedad de Chagas en fase aguda y crónica (Umezawa *et al.*, 1996). La región C-terminal es altamente inmunogénica y la mayor parte de la respuesta inmune contra el parásito durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* se restringe a este dominio, lo que resulta en la producción de anticuerpos contra antígenos en la fase aguda (Schenkman

et al., 1994).

Debido a la alta inmunogenicidad de las proteínas TESA, diversos trabajos han demostrado que estas proteínas son excelentes para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Umezawa *et al.* (1996) utilizaron las proteínas TESA en el formato de Western blot para el diagnóstico de la fase aguda y crónica de la enfermedad de Chagas, así como también para el diagnóstico de Chagas congénito. El estudio se realizó en 512 pacientes, 111 fueron no chagásicos (incluyendo casos de leishmaniasis u otras patologías), y 401 pacientes chagásicos (361 casos crónicos, 36 casos agudos, y 4 casos congénitos). Los datos mostraron que todos los casos agudos y congénitos fueron positivos a IgG e IgM anti-*T. cruzi*, los sueros reconocieron las bandas antigénicas de 130 a 200 kDa en el TESA-blot, mientras los casos crónicos reaccionaron con las bandas de 150 a 160 kDa en un 100,00% de positividad para anticuerpos tipo IgG; ninguna reacción cruzada fue observada.

Kesper *et al.* (2000) utilizaron los antígenos TESA en Western blot para evaluar el nivel de polimorfismo de estas proteínas, para ello estudiaron 5 cepas y 10 aislados de *T. cruzi* obtenidos de distintos pacientes con diversas formas de la enfermedad de Chagas, el Western blot reveló patrones de bandas específicas para cada cepa; de este modo demostraron que estas proteínas pueden ser utilizadas como herramientas para caracterizar aislados y cepas de *T. cruzi*.

Nakazawa *et al.* (2001) analizaron 42 sueros de pacientes chagásicos, 14 sueros de pacientes con serología negativa y 25 sueros de pacientes con otras enfermedades parasitarias, utilizando la técnica del Western blot. Adicionalmente, por TESA-ELISA, analizaron 124 sueros de pacientes chagásicos crónicos, 205 individuos sanos y 31 pacientes con otras enfermedades parasitarias (leishmaniasis cutánea y leishmaniasis visceral). En este trabajo, con la técnica de TESA-blot, los sueros

procedentes de pacientes chagásicos reconocieron en un 100,00% una banda de 150-170 Mr; además observaron que las reacciones cruzadas con los sueros provenientes de pacientes con leishmaniasis ocurrieron con bandas proteicas por debajo de 150 Mr. Mientras que en el TESA-ELISA los 124 sueros provenientes de individuos con enfermedad de Chagas confirmada, resultaron positivos y en los 205 de los individuos no chagásicos (controles) resultaron negativos, pero con esta técnica se observaron reacciones cruzadas con sueros de individuos con leishmaniasis (1 de los 14 sueros de individuos con leishmaniasis cutánea, y 9 de 17 sueros de individuos con leishmaniasis visceral). De acuerdo a los resultados obtenidos estos investigadores concluyeron que el TESA-BLOT, puede ser empleado como prueba confirmatoria específica luego de la evaluación de los sueros por la serología convencional.

Umezawa *et al.* (2001) estandarizaron un TESA-ELISA, en este ensayo estudiaron 284 pacientes, de los cuales 67 se encontraban en fase crónica y 53 en fase aguda de la enfermedad. El TESA-ELISA demostró una sensibilidad del 100,00% y especificidad de 96,34% para anticuerpos tipo IgG anti-*T. cruzi*, con el grupo de sueros analizados. Matsumoto *et al.* (2001), con el propósito de mejorar la especificidad de las proteínas TESA, clonaron un péptido (TESA-1) perteneciente a la fracción TESA de 150 a 160 kDa. Sin embargo, a pesar de que la especificidad del Western blot fue de 100,00%, los antígenos recombinantes de TESA obtuvieron una sensibilidad baja (82,20%).

Igualmente el TESA-blot ha sido utilizado para evaluar sueros con resultados dudosos. Silveira *et al.* (2004) emplearon el TESA-blot como prueba confirmatoria en 348 muestras de sueros, provenientes de diferentes bancos de sangre de Brasil, los cuales habían sido clasificados como resultados no concluyentes mediante los análisis convencionales ELISA e IFI. El TESA-blot logró confirmar 10 sueros como positivos (2,87%) y 338 como negativos (97,12%). Los datos arrojados en este trabajo

demonstraron que TESA-blot es tan sensible como las pruebas que utilizan los antígenos recombinantes. Santos *et al.* (2006) estandarizaron una prueba enlazante de múltiples antígenos (MABA), para detectar simultáneamente anticuerpos IgG específicos para la enfermedad de Chagas, malaria y sífilis. En esta prueba se usaron las proteínas de TESA para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, la sensibilidad y especificidad del ensayo fue 99,00 y 100,00%, respectivamente.

Berrizbeitia *et al.* (2006) purificaron 5 bandas de los antígenos TESA (220, 170, 120, 85 y 60 Mr) por cromatografía de afinidad, usando una columna de bromuro de cianógeno, con la finalidad de estandarizar un ELISA para ser empleado en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. El ELISA estandarizado obtuvo una sensibilidad de 98,60% y una especificidad de 100,00%, sin embargo, las proteínas no mostraron estabilidad en el buffer de elución (glicina 0,10 mol.l⁻¹, pH 2,5) experimentando degradación después de dos meses de almacenamiento a -70°C. Este problema fue resuelto dializando el eluido en buffer fosfato salino (PBS, pH 7,4) pero el rendimiento proteico se redujo apreciablemente.

Con la finalidad de seguir ampliando los conocimientos acerca de las proteínas TESA y su potencial como antígenos de diagnóstico, en la presente investigación se realizó la purificación de los antígenos TESA de *T. cruzi* (cepa Tulahuen) por cromatografía de afinidad utilizando una columna de concanavalina A, como un método alternativo de purificación no descrito anteriormente para estos antígenos. El cual permitirá ampliar las posibilidades y herramientas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

METODOLOGÍA

Antígenos TESA de *T. cruzi*

Los antígenos totales de TESA (cepa Tulahuen) para la realización del presente proyecto de investigación, fueron donados por “McGill University” (“Research Institute”, Canadá).

Purificación de los antígenos TESA por cromatografía de afinidad usando una resina de concanavalina A

La concanavalina A es una lectina, que se une a un monosacárido específico de forma reversible. La concanavalina A, se unirá al azúcar (α -D-manosa o α -D-glucosa) presente en la proteína a purificar. Las proteínas fijadas a la columna serán eluidas utilizando diferentes concentraciones de un azúcar (α -D-manosa o α -D-glucosa), el cual establecerá un medio competitivo con el azúcar presente en la proteína fijada; de esta forma la proteína purificada será desplazada y finalmente recolectada (Bollag *et al.*, 1996; Camacho, 2005).

Preparación de la columna cromatográfica con la resina concanavalina A

Se siguió el protocolo descrito por el inserto de la casa comercial (Amersham Biosciences). Se tomaron 1,50 ml de resina de concanavalina A y se lavó en un tubo Falcon inicialmente con 10 volúmenes de agua destilada y luego con 30 volúmenes del buffer de cromatografía (20 mmol.l⁻¹ Tris-HCl; 0,50 mol.l⁻¹ NaCl; 1 mmol.l⁻¹ MgCl₂; 1 mmol.l⁻¹ CaCl₂; pH 7,4), con la finalidad de ajustar el pH de la resina al pH del buffer de cromatografía (pH 7,4). Después, la resina fue empaquetada en una

columna de 5 cm de alto y 1 cm de diámetro.

Aplicación de la muestra de TESA

Se diluyó la proteína 1:1 v/v con el buffer de cromatografía (500 µl de antígeno TESA y 500 µl del buffer de cromatografía) y se aplicó a la resina, haciendo pasar la proteína TESA 3 veces, luego se recogió la fracción de la proteína no pegada a la resina. Finalmente se lavó la resina nuevamente con 10 volúmenes del buffer de cromatografía para eliminar los restos de proteína no enlazada a la Concanavalina A.

Elución de la proteína TESA

Para la elución de la proteína fijada a la resina se utilizó una mezcla de 0,30 mol.l⁻¹ de metil- α -D-manopiranosido y metil- α -D-glucopiranosido en el buffer de cromatografía. La elución se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo Biologic Dou Flow (Biorad).

Electroforesis de las proteínas purificadas de TESA

Las proteínas purificadas fueron evaluadas por electroforesis unidimensional, en base al método descrito por Laemmli (1970).

Preparación de las muestras para la corrida electroforética

Las fracciones recogidas fueron calentadas a 100°C por 5 minutos con el buffer reductor (1,00 mol.l⁻¹ Tris-HCl pH 6,8; glicerol al 25,00%; SDS al 10,00%; azul de bromofenol al 2,00%-y β -mercaptoetanol) en una proporción 2:1 v/v (20 µl de la muestra y 10 µl de buffer reductor), luego las muestras fueron sembradas en cada uno

de los pozos de los geles de poliacrilamida al 7,00% y al 10,00%, las cuales poseían un espesor de 0,80 mm.

Corrida electroforética de las fracciones purificadas

La corrida electroforética se realizó por 1 h en buffer Tris-glicina (25 mmol.l⁻¹ Tris, 192 mmol.l⁻¹ glicina, 0,10% p/v SDS, pH 8,3), a un voltaje constante de 120 V. Se incluyeron marcadores de amplio rango de masa molecular pre-teñidos para determinar las masas relativas separadas en la corrida electroforética (Biorad e Invitrogen). Las bandas proteicas separadas se tiñeron con plata y coloración de Coomasie coloidal.

Tinción de plata de los geles de poliacrilamida

La tinción de plata consiste en el tratamiento previo con ditionito de sodio, el cual reducirá el ión plata a plata metálica, de forma restringida a las zonas de sensibilización (proteínas). Inmediatamente después de realizar la corrida electroforética, el gel se colocó en una solución de 50 ml de la solución A (ácido acético al 10,00% y etanol al 30,00%) por 1 h en recipiente de vidrio, en la oscuridad y con agitación constante. Al cabo de este tiempo, se descartó la solución A y el gel fue sumergido en 50 ml de una nueva solución B (etanol al 30,00%), la solución B fue cambiada 3 veces, incubando el gel en esta solución 20 minutos cada vez.

Luego, se realizaron 2 lavados con 50 ml de agua destilada, por 15 minutos cada vez, posteriormente, se descartó el último lavado de agua destilada y el gel se colocó en 50 ml de la solución C (1,43 mmol.l⁻¹ de ditionito de sodio: Na₂O₄S₂), el gel en esta solución se incubó por 1 minuto y se lavó 2 veces con 50 ml de agua destilada por 1 minuto. Al cabo de este tiempo, el gel se colocó en 50 ml de la

solución D (12 mmol.l⁻¹ de nitrato de plata: AgNO₃ y 0,01% de formaldehído) por 45 minutos, en agitación constante y en la oscuridad. Al finalizar este periodo de incubación, el gel se lavó con 50 ml de agua destilada por 1 minuto. Las bandas proteicas se revelaron sumergiendo el gel en 50 ml de una solución que contenía 0,40 mol.l⁻¹ de carbonato de sodio (Na₂CO₃); 0,031 mol.l⁻¹ de tiosulfato de sodio (Na₂SO₂O₃) y 0,06% de formaldehído por 10 minutos. Al observarse las bandas de color marrón, se detuvo la reacción con 2 ml de ácido acético glacial. Los geles se conservaron con solución de ácido acético al 10,00% (Rabilloud *et al.*, 1998).

Tinción de Coomasie coloidal de los geles de poliacrilamida

El gel se colocó en 50 ml de solución I (ácido fosfórico: H₃PO₄ al 2,00% y etanol al 30,00%), cambiando la solución 3 veces por 15 minutos cada vez, en constante agitación. Luego se descartó esta solución y se le añadió 50 ml de solución II (ácido fosfórico: H₃PO₄ al 2,00%), se realizaron 3 cambios con la solución II y se incubó por 15 minutos cada vez. Seguidamente, se descartó la solución II y se le agregó 50 ml de solución III (sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ al 15,00%, ácido fosfórico (H₃PO₄) al 2,00% y etanol al 30,00%) por 30 minutos, después de transcurrido este tiempo, se le añadió a la solución III, con el gel sumergido en esta solución, 500 µl de solución de coomasie coloidal (al 2,00%) evitando que ésta hiciera contacto directo con el gel, y se dejó hasta el día siguiente y en agitación. Para obtener el contraste con el fondo del gel, éste se lavó con solución decolorante (etanol al 10,00% y ácido acético al 10,00%) hasta obtener el fondo claro (Neuhoff *et al.*, 1998).

Determinación de la concentración de las proteínas purificadas de TESA mediante el método de Bradford

Para cuantificar las proteínas purificadas de TESA se usó el método de

Bradford. Éste se basa en la adición del colorante de Coomassie blue a la solución de proteínas y de determinar la concentración de la muestra, a 595 nm en un espectrofotómetro. El colorante se une primariamente a residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente arginina. La concentración de proteínas será directamente proporcional a la intensidad de color del colorante, ésta se determinará por medio de una curva de calibración, aplicando la ley de Beer (Bradford, 1976).

Preparación de estándares y muestras

A partir de un estándar de proteínas (albúmina de suero bovino: BSA) de 1 mg/ml se prepararon siete patrones a diferentes concentraciones, como se especifica en la tabla presentada a continuación:

Tabla 1. Preparación de estándares de albúmina para la determinación de proteínas mediante el método de Bradford.

Concentración $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Volumen del estándar de BSA (μl)	Volumen de agua destilada (μl)
0	0	800
1	1	799
2	2	798
4	4	796
7	7	793
10	10	790
15	15	785

Se prepararon diluciones, del antígeno TESA total de 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, y de las fracciones eluidas (1/5, 1/10, 1/20, 1/40). Tanto a los estándares como a las muestras se les adicionaron 200 μl del reactivo de Bradford, sin diluir. Las

soluciones se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos y se procedió a realizar la lectura en un espectrofotómetro a 595 nm.

Concentración de las fracciones de la proteína purificadas de TESA para el Western blot

Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf y se cubrieron con papel parafilm con hoyos en la parte superior. Las muestras se congelaron a -80°C , la concentración se llevó a cabo por centrifugación al vacío sin aplicar calor durante 60 minutos; empleando un equipo concentrador Speedvac SC210A (Savant) con bomba de vacío UVS400 Universal (Vacuum System) (Bollag *et al.*, 1996).

Western blot de las proteínas purificadas de TESA

Transferencia de las proteínas purificadas separadas por electroforesis

Las proteínas separadas en SDS-PAGE fueron transferidas en hojas de nitrocelulosa (MFS, Pleasanton, CA), como lo descrito por Towbin *et al.* (1979) usando un minitanque electroforético (BioRad). La transferencia se realizó a 4°C por 1 hora en buffer de transferencia (25 mmol.l^{-1} Tris, 192 mmol.l^{-1} de glicina y 20,00% v/v de metanol a pH 8,3) a un voltaje constante de 0,25 A. Se incluyeron marcadores de masa molecular pre-teñidos (BioRad y Biolabs) de amplio rango.

Bloqueo de las membranas de nitrocelulosa e incubación con el pool de sueros positivos para la enfermedad de Chagas

Las membranas fueron bloqueadas toda la noche a 4°C con PBS con 5,00% de leche descremada (Nestle) y 0,10% Tween 20 (solución bloqueadora: PBST), luego

se incubaron por 2 h con un pool de sueros confirmados como positivos para la infección por *T. cruzi*, por tres técnicas serológicas diferentes (ELISA, HAI e IFI), la dilución del suero fue 1:400 (para revelado con diaminobencidina), y 1:200 (para revelado con luminol). Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno con PBS conteniendo Tween 20 al 0,10% (solución de lavado: PBST). Seguidamente, la membrana se incubó con IgG anti-humana conjugada con peroxidasa de rábano picante por 2 h, en una dilución 1:4 000 (para revelado con diaminobencidina) y 1:2 000 (para revelado con luminol), en la solución bloqueadora. Las membranas de nitrocelulosa se lavaron 4 veces con PBST, y los complejos inmunes se revelaron utilizando diaminobencidina (Sigma) y con reactivo de luminol (West Pico Chemiluminescent Supersignal) (Towbin *et al.*, 1979).

Revelado con diaminobencidina (Sigma)

Se colocó la membrana en la solución de diaminobencidina, en un tiempo no mayor a 10 minutos. Esta solución se preparó siguiendo las indicaciones de la casa comercial (SIGMA). Para ello, se disolvieron 2 tabletas de 3,3'-diaminobencidina y 2 tabletas de urea peróxido de hidrógeno en 10 ml de agua destilada. Al visualizarse las bandas, la reacción se detuvo con agua destilada.

Revelado por quimioluminiscencia

Primeramente se colocó la membrana de nitrocelulosa sobre papel de acetato y allí se añadió 2 ml de la mezcla 1:1 v/v de reactivo de luminol (solución A *West pico stable peroxide*, y solución B *West pico luminol/enhancer*); inmediatamente se envolvió en papel de envoplast y se observaron las bandas reactivas utilizando el equipo de imagen molecular *Chemidoc XRS system* (BioRad).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de los antígenos TESA utilizando el método de Bradford, antes de ser sometidos al proceso de purificación fue de 319,62 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Luego del proceso de purificación utilizando la resina de Concanavalina A, el rendimiento proteico disminuyó considerablemente (1,22 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). La intención de sustituir los extractos de los parásitos por proteínas purificadas de los mismos representa una alternativa para aumentar la sensibilidad y especificidad de los análisis; pero estas purificaciones resultan ser difíciles en cuanto a practicidad, debido a que las cantidades proteicas obtenidas son relativamente bajas (Marcipar *et al.*, 2003).

Bajo rendimiento proteico en procesos de purificación de proteínas de *T. cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, han sido obtenidos en otros trabajos. Silber *et al.* (2002) purificaron la glicoproteína LLGP-67 kDa a través de la cromatografía de afinidad con eritrocitos humanos desializados, en base a su interacción específica con los residuos de galactosa exhibida en la superficie de los eritrocitos; sin embargo, las cantidades de proteínas requeridas para realizar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas fueron bajas.

Otras investigaciones han logrado un buen rendimiento proteico en sus intentos de obtener antígenos purificados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Scharfstein *et al.* (1985) purificaron la glicoproteína Gp25 enlazada a iodo 125 (^{125}I -Gp 25) por medio de la cromatografía de afinidad con concanavalina A, obteniendo un buen rendimiento proteico. Sin embargo, el método de diagnóstico empleado (radioinmunoprecipitación) utiliza compuestos radioactivos, lo cual es inapropiado para las pruebas de diagnóstico de rutina, ya que representa un alto riesgo de contaminación radioactiva. Berrizbeitia *et al.* (2006) obtuvieron un mejor rendimiento

antigénico de las proteínas TESA purificadas utilizando la resina de bromuro de cianógeno, con la cual la obtención de proteínas purificadas fue de $190 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a partir de una concentración inicial de $850 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Una vez eluidas las proteínas purificadas de TESA, se seleccionaron métodos de tinción que ofrecieran alta sensibilidad para identificar y poder visualizar las bandas proteicas obtenidas después de la elución con el azúcar, como son la coloración coomasie blue coloidal G-250 y la coloración de plata. En la figura 1, se observa que el SDS-PAGE al 10%, teñido con coomasie blue coloidal G-250, permitió identificar cinco proteínas de aproximadamente 220, 170, 45, 30 y 20 Mr. Asimismo, los geles al 7%, teñidos con plata identificaron diferentes bandas proteicas de aproximadamente 220, 115, 85, 83 y 20 Mr (Figura 2). Ambas tinciones demostraron que se logró la purificación de las proteínas TESA, ya que las bandas proteicas contenidas en la solución inicial de TESA se redujeron considerablemente.

Las proteínas TESA están clasificadas como glicoproteínas y por primera vez se demuestra, que éstas presentan residuos de glucosa y manosa, ya que se logró la purificación con una resina de concanavalina A utilizando un buffer de elución que contenía una mezcla de ambos azúcares. Berrizbeitia *et al.* (2006), purificaron 6 bandas de TESA utilizando una columna de bromuro de cianógeno (220, 170, 80, 60, 35, 25 Mr), las cuales fueron visualizadas en la electroforesis unidimensional con tinción de plata. En el presente trabajo, el número de bandas proteicas resultantes de la purificación se redujo considerablemente comparado con la mezcla total de TESA (Figuras 1 y 2). Es importante mencionar que las proteínas purificadas comenzaron a eluirse a partir de la fracción 2, lo cual fue detectado por el cromatógrafo (Apéndice1) y visualizado en ambas técnicas de tinción (Figuras 1 y 2).

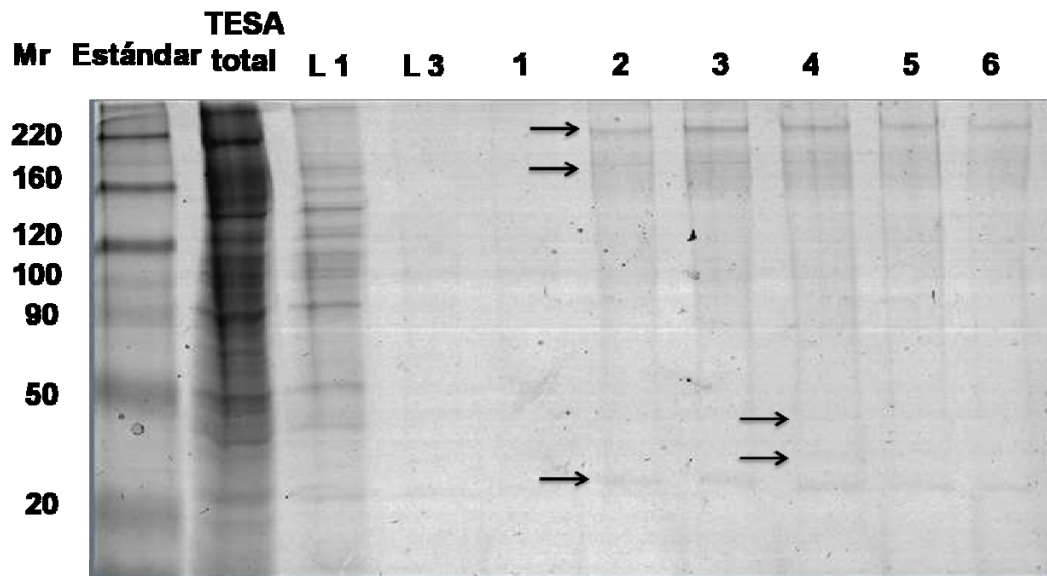


Figura 1. Separación electroforética unidimensional (SDS-PAGE) de bandas proteicas purificadas de TESA por cromatografía de afinidad con concanavalina A, visualizadas con coomassie blue brillante coloidal G-250. (Mr= masa relativa, 1 al 6 fracciones eluidas). L 1: lavado 1, L 3: lavado 3. Las flechas indican las bandas proteicas purificadas (220, 170, 45, 30 y 20 Mr)

En la presente investigación, tanto la tinción de plata como la coloración de coomassie blue coloidal G-250 identificaron un igual número de bandas; sin embargo en la tinción de plata las bandas fueron más evidentes. Recientemente, se ha demostrado que la coloración de coomassie blue coloidal G-250, modificación del protocolo de Neuhoff *et al.* (1988), ha elevado su sensibilidad de forma tal que se acerca a los hallados por la tinción de plata convencional; pero la tinción de plata sigue siendo el método de coloración más sensible para la visualización de proteínas en geles de poliacrilamida; además de mencionar que la coloración de coomassie blue tiene la desventaja de no poder teñir ciertas glicoproteínas adecuadamente (Candiano *et al.*, 2004; Oin *et al.*, 2006, Brea *et al.*, 2007).

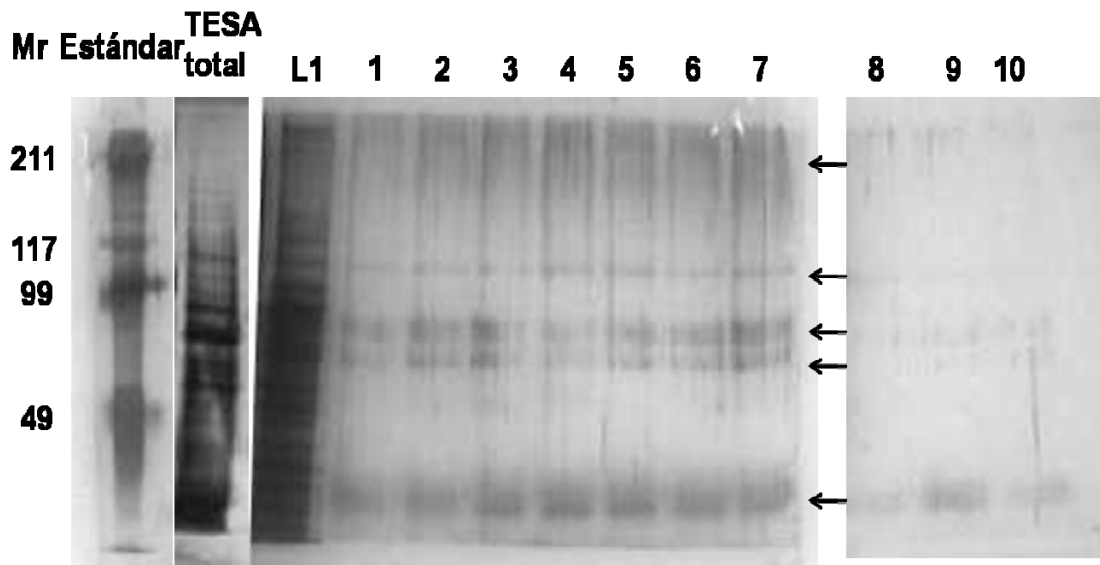


Figura 2. Separación electroforética unidimensional (SDS-PAGE) de bandas proteicas purificadas de TESA por cromatografía de afinidad con concanavalina A, visualizadas con tinción de plata. (Mr= masa relativa, 1 al 10 fracciones eluidas). L1: lavado 1. Las flechas indican las bandas proteicas purificadas (220, 115, 85, 83 y 20 Mr).

Una vez identificadas las bandas proteicas purificadas de los antígenos TESA, se demostró la inmunogenicidad de las proteínas purificadas mediante la prueba de Western blot. Esta prueba utilizando el cromógeno diaminobencidina demostró que el pool de sueros de pacientes chagásicos reconoció la banda proteica de aproximadamente 200 Mr (Figura 3). Debido a que la reacción observada con diaminobencidina fue débil se decidió utilizar un método de revelado que aumentara la sensibilidad de la prueba (Apéndice 3).

Por tal motivo, los inmunocomplejos formados en el Western blot fueron revelados por quimioluminiscencia (Super signal West Pico, Pierce). Utilizando la técnica fluorescente se logró visualizar 5 bandas inmunogénicas de 220, 85, 45, 30 y 20 Mr (Figura 4). Distintos trabajos afirman que el cromógeno diaminobencidina posee una sensibilidad débil; mientras que el reactivo de luminol cuenta con una alta

sensibilidad, de un rango de detección que va desde los 10 a 12 μg ; además de poseer gran afinidad por las moléculas proteicas (Mills *et al.*, 1980; Peacock *et al.*, 1991; Castelló *et al.*, 2002). Estos hallazgos demuestran que las proteínas purificadas de TESA son inmunogénicas y pueden ser utilizadas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Igualmente algunas bandas proteicas identificadas en el SDS-PAGE unidimensional, contenidas en las proteínas TESA mostraron ser no inmunogénicas. Este es el caso de la proteína de 170 Mr revelada por la tinción de coomassie coloidal G-250 y la de 115 Mr revelada por la tinción de plata. Tanto el revelado de diaminobencidina como el de luminol permitieron visualizar bandas con masas relativas mayores de 200 Mr, lo cual muestra que son altamente inmunogénicas. Diversos trabajos, han mostrado la utilidad de las proteínas de TESA por encima de 150 Mr, ya que estas proteínas con estas masas molares son específicas para *T. cruzi* y no presentan reacciones cruzadas con *Leishmania* sp. (Umezawa *et al.*, 1996; Nakazawa *et al.*, 2001).

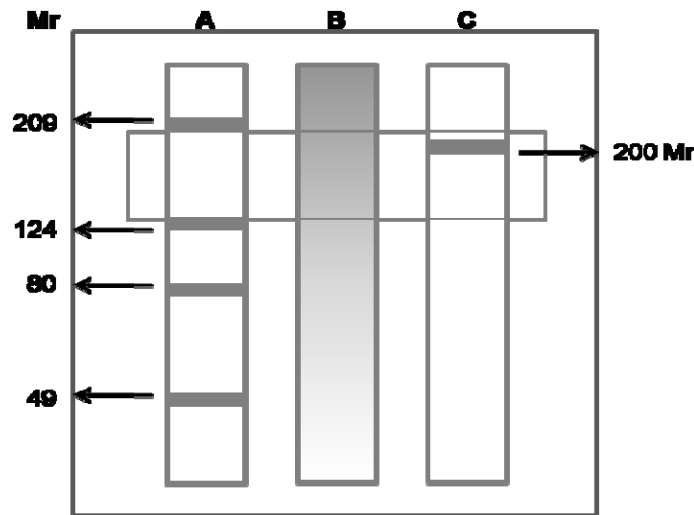


Figura 3. Representación del Western blot de las fracciones purificadas de los antígenos de TESA, con el pool de sueros chagásicos. Revelado con diaminobencidina. (A) patrón de peso molecular pre-teñido, (B) TESA total, (C) pool de sueros positivos para la enfermedad de Chagas (reconocimiento de una banda de aproximadamente 200 Mr)

En la presente investigación se demostró la inmunogenicidad de las proteínas purificadas de TESA con Mr mayores a 85 Mr. Bandas proteicas de TESA con Mr elevadas han demostrado su sensibilidad y especificidad en la detección de infección por *T. cruzi*, en sueros provenientes de pacientes en fase aguda, crónica e infecciones congénitas (Umezawa *et al.*, 1996; Nakazawa *et al.*, 2001). Igualmente se logró purificar proteínas de TESA utilizando una columna de concanavalina A, la inmunogenicidad de estas proteínas purificadas coincide con lo reportado por Berrizbeitia *et al.* (2006), en donde también se describe proteínas inmunogénicas similares con masas relativas mayores a 85 Mr (220, 170, 120 y 85 Mr).

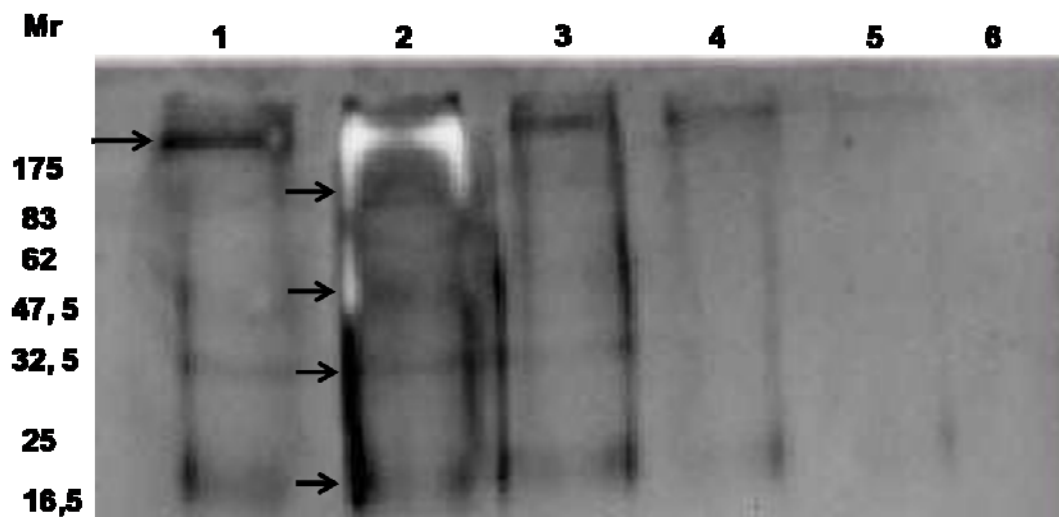


Figura 4. Western blot de las fracciones purificadas con concanavalina A de los antígenos de TESA, con el pool de sueros chagásicos. Revelado por quimioluminiscencia (Mr= masa relativa, 1 a 6 = fracciones eluidas, las flechas indican las proteínas purificadas reconocidas por el pool de sueros chagásicos).

En este trabajo, se planteó una nueva alternativa de purificación de los antígenos TESA, la cual no había sido descrito previamente, igualmente la estabilidad de las proteínas eluidas, ya que se mantuvieron estables durante su almacenamiento, (aproximadamente 5 meses). Asimismo el rendimiento proteico obtenido con esta técnica de purificación fue bajo y poco práctico, en la obtención de proteínas purificadas de TESA, para ser utilizado de rutina, con fines de diagnóstico, como por

ejemplo en la prueba de ELISA, donde se necesitan una mayor cantidad de antígeno para la sensibilización de la microplaca. Sin embargo, una vez demostrada la inmunogenicidad de las proteínas purificadas de TESA y su estabilidad con este tipo de purificación (resina de concanavalina A), se podría secuenciar las proteínas purificadas para la obtención de péptidos sintéticos o a través de biología molecular lograr clonar estas proteínas, para de este modo obtener un rendimiento antigénico suficiente, que permita obtener suficiente cantidad de antígeno para ser utilizado en pruebas serológicas de diagnóstico para la enfermedad de Chagas.

CONCLUSIONES

- El rendimiento proteico de los antígenos TESA, purificados por cromatografía de afinidad con una resina de concanavalina A, es bajo, para la obtención de proteínas de diagnóstico para la infección por *T. cruzi*.
- Las proteínas purificadas de TESA presentan residuos de manosa y glucosa, los cuales se fijaron a la concanavalina A.
- La tinción de plata permitió la visualización de las bandas de 220, 115, 85, 83 y 20 Mr; mientras que en la coloración de coomasie blue coloidal G-250 se observaron bandas de 220, 170, 45, 30 y 20 Mr, coincidiendo entre ellas las bandas de 220 y 20 Mr.
- Las bandas purificadas de 220, 85, 45, 30 y 20 Mr son inmunogénicas ya que fueron reconocidas por el pool de sueros chagásicos.

RECOMENDACIONES

- Eluir las proteínas purificadas en el gel para secuenciación.
- Construir péptidos sintéticos.
- Producir antígenos recombinantes.
- Utilizar otros métodos de purificación.

BIBLIOGRAFÍA

Berrizbeitia, M.; Ndao, M.; Bubis, J.; Gottschalk, M.; Aché A.; Lacouture, S.; Medina, M. y Ward, B. 2006. Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2): 291-296.

Bollag, D.; Rozycki, M. y Edelstein, S. 1996. *Protein methods*. Second edition. Wiley. New York.

Botero, D. y Restrepo, M. 1998. *Parasitología humana*. Tercera edición. Corporación para investigaciones biológicas. Medellín.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*, 72: 248-254.

Brea, D.; Cristobo, I.; Sobrino, T.; Rodríguez, R.; Mosquera, E.; Moldes, O. y Castillo, J. 2007. Aplicación de la proteómica a las enfermedades neurológicas. *Neurología*, 22(3): 170-179.

Camacho, F. 2005. Importancia de la proteasa peptona Nº 3 en la producción de pigmento por *Streptococcus agalactiae* en el medio granada. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. Granada.

Candiano, G., Bruschi, M.; Musante, L., Santucci, L.; Ghiggeri, G., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. y Righetti, P. 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9): 1327-1333.

Castelló, A.; Álvarez, M.; Miguel, M. y Verdú, F. 2002. “Revelado de manchas latentes: efectividad del luminol y evaluación de su efecto sobre el estudio del DNA”. “Cuaderno de medicina forense Nº 28”. <SciELO.isciii.es/pdf/cmfn28/original2.pdf> (11/10/2009).

Coura, J. y De Castro, S. 2002. Critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 3-24.

Cura, E.; Wendel, S. y Peralta, J. 1994. Manual de procedimientos de control de

calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre. PAHO. Washington, DC.

Edson, L.; Camandaroba, C.; Pinheiro, L. y Andrade, S. 2002. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotype in the intragastric experimental infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44(2): 4636-4665.

Engel, J.; Doyle P.; Hsieh, F. y McKerrow, J. 1998. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 188: 725-734.

Frasch, A. 2000. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, 16(7): 282-286.

Garrido, F.; Córdova, J.; Rivas, L. y Montiel, L. 2007. *Vigilancia de enfermedad de Chagas: guía para el diagnóstico, manejo y tratamiento de enfermedad de Chagas en fase aguda a nivel de los establecimientos de salud*. Primera edición. Dirección General de Epidemiología. Caracas.

Gürtler, R.; Segura, E. y Cohen, J. 2003. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1): 29-32.

Homez, Ch.; Soto, R.; De Soto, S.; Mendez, H. y Marmol, L. 1995. *Parasitología*. Octava edición. Ediluz. Maracaibo.

Hunter, R.; Kubak, B.; Kuchnert, M.; Kun, H.; Lawrence, G.; Leiby, D.; Mascola, L.; Mone, T.; Moore, A.; Radhakrishnas y Steurer, F. 2006. "Chagas disease after organ transplantation los Angeles, California, 2006. HighbeamEncyclopedia". <<http://www.encyclopedia.com/doc/1G1149763875.htm>> (23/04/2008).

Kesper, N.; Almeida, K.; Stolf, A. y Umezawa, E. 2000. Immunoblot analysis of tripomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. *Journal of Parasitology*, 86(4): 862-867.

Laemmli, V. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227: 680-685.

López, F.; Rangel, H. y Ramos, C. 2000. Diagnosis of Chagas disease. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42: 121-129.

Marcipar, I.; Welchen, E.; Roodveldt, C.; Marcipar, A. y Silver, A. 2003. Purification of the 67-kDa lectin-like glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*, LLGP-67, and its

evaluation as a relevant antigen for the diagnosis of human infection. *FEMS Microbiology Letters*, 220: 149-154.

Matsumoto, T.; Cotrim, C., Da Silveira, J.; Stolf, A. y Umezawa, E. 2001. *Trypanosoma cruzi*: Isolation of an immunodominant peptide of TESA (trypomastigote excreted-secreted antigens) by gene cloning. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 42: 187-192.

Meira, W.; Galvão, L.; Gontijo, E.; Machado, G.; Norris, K. y Chiari, E. 2002. *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10): 3735-3740.

Mills, E.; Rholl, K. y Quie, P. 1980. Luminol-amplified chemiluminescence: a sensitive method for detecting the carrier state in chronic granulomatous disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 12(1): 52-56.

Nakazawa, M.; Rosa, D.; Pereira, V.; Moura, M.; Furtado, V.; Souza, W.; Neves, M.; Abath, F. y Gomes, Y. 2001. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(5): 1024-1027.

Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D. y Ehrhardt, W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using coomassie brilliant blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 6: 255-262.

Oin, H.; Liu, T.; Liu, B.; Song, X.; Huang, X.; Yang, J.; Zhao, X. y Wei, Y. 2006. Comparison between protein detection methods for two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Experimental Hematology*, 14(1): 168-172.

Partel, C. y Rossi, C. 1998. A rapid, quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of Chagas disease. *Immunological Investigations*, 27(1-2): 89-96.

Peacock, C., Thompson, I. y Van Nourden, S. 1991. Silver enhancement of polymerised diaminobenzidine: increased sensitivity for immunoperoxidase staining. *Journal of Clinical Pathology*, 44(9): 756-758.

Peralta, J.; Teixeira, M.; Shreffler, W.; Pereira, J.; Burns, J.; Sleath, P. y Reed, S. 1994. Serodiagnosis of Chagas disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(4): 971-974.

Ponce, C. 1999. La enfermedad de Chagas transfusional en Honduras y otros países de America Central. *Medicina*, 59: 135-137.

Ponce, C.; Ponce E.; Vinelli, E.; Montoya, A.; de Aguilera, V.; Gonzalez, A.; Zingales, B.; Rangel, A.; Levin, M.; Esfandiari, J.; Umezawa, E.; Luquetti, A. y de Silveira, J. 2005. Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of Chagas disease by detection of *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies in blood of donors and patients in central America. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10): 5065-5068.

Rabilloud, T.; Carpentier, G. y Tarroux, P. 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis*, 9(6): 288-291.

Santos, J.; Da Silva, I.; Antunes, E.; Sarti, M.; Berikó, M.; Do Lago, S.; Walter, A. y Arroyo, M. 2006. A multianalyte Dot-ELISA for simultaneous determination of malaria, Chagas disease and syphilis-specific IgG antibodies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 38(2): 223-230.

Scharfstein, J.; Luquett, A.; Murta, A.; Senna, M.; Rezende, J.; Rassi, A. y Mendonca, L. 1985. Chagas disease: serodiagnosis with purified Gp25 antigen. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 34(6): 1153-1160.

Schechter, M.; Voller, A.; Marinkelle, C.; Flint, J.; Guhl, F. y Miles, M. 1983. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas disease). *Lancet*, 2(8356): 939-941.

Schenkman, S.; Eichinger, D.; Pereira, M. y Nussenzweig, V. 1994. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. *Annual Review Microbiology*, 48: 499-523.

Schmunis, G. 2007. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(1): 75-85.

Silber, A.; Mancipar, I., Roodveldt, C.; Cabeza, P.; Laguens, R. y Macipar A. 2002. *Trypanosoma cruzi*: identification of a galactose-binding protein that binds to cell surface of human erythrocytes and is involved in cell invasion by the parasite. *Experimental Parasitology*, 4: 217-225.

Silveira, E.; Silva, A.; Junior, S.; Souza, M.; Kesper, N.; Botelho, A. y Umezawa, E. 2004. Chagas disease: Application of TESA-blot in inconclusive sera from a brazilian blood bank. *Vox Sanguinis*, 87: 204-207.

Towbin, H.; Stachelin, T. y Sordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyanylamine gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 4350-4354.

Umezawa, E.; Nascimento, M. y Stolf, A. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas disease. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 39: 169-176.

Umezawa, E.; Nascimento, M.; Kesper, N.; Couana, J.; Borges, J.; Junqueira, A. y Camargo, M. 1996. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute and chronic Chagas disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9): 2143-2147.

Zavala, J. 2004. Enfermedad de Chagas y otras triposomosis. En: *Parasitología médica de las moléculas a la enfermedad*. Becerril y Romero. (eds). Distrito Federal. Págs. 73-83.

APÉNDICES

Apéndice 1

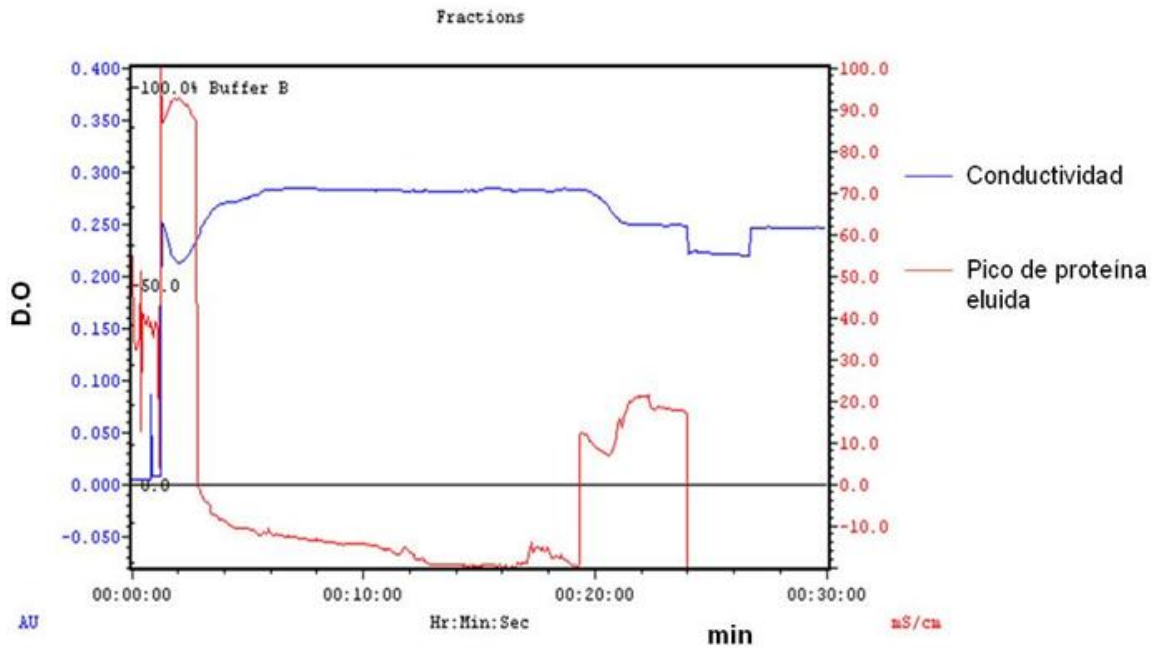


Figura 1. Cromatograma de las fracciones purificadas de los antígenos TESA, eluidas con la solución de azúcares.

Apéndice 2

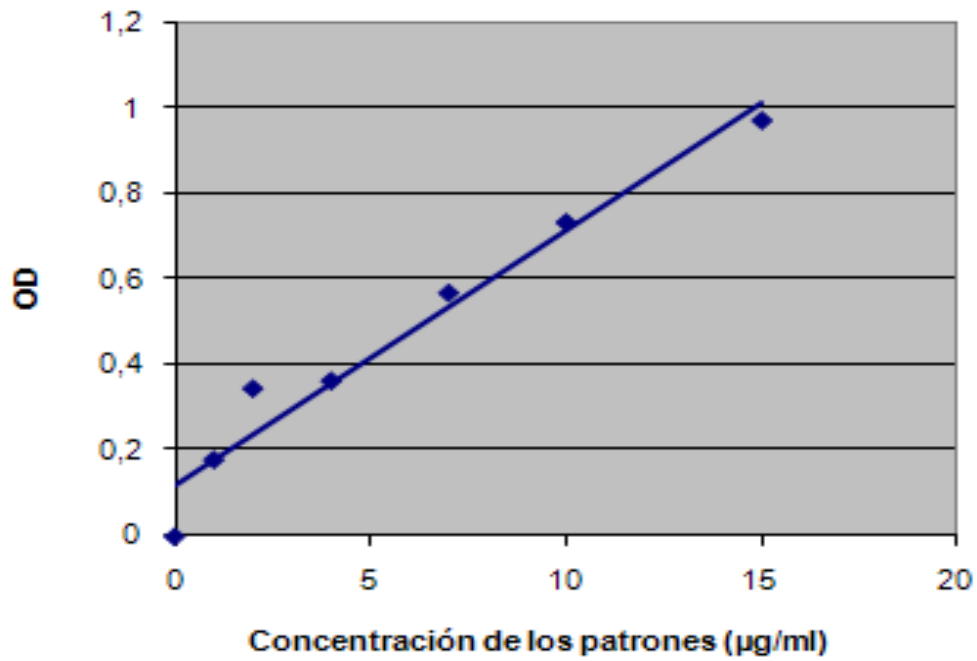
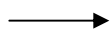


Figura 2. Curva de calibración del método de Brabford, para la determinación de la concentración proteica de la fracción 2.

Ecuación de la recta

$$y = mx + b$$



$$x = \frac{y - b}{m}$$

$$y = 0,0726$$

$$b = 0,035$$

$$m = 0,030$$

$$r = 0,9835$$

$$x = 1,22 \mu\text{g} / \text{ml}$$

Donde:

x = Concentración de la fracción purificada

Pendiente

y = Lectura de la densidad óptica

b = Intercepto

m =

r = Pearson

Apéndice 3

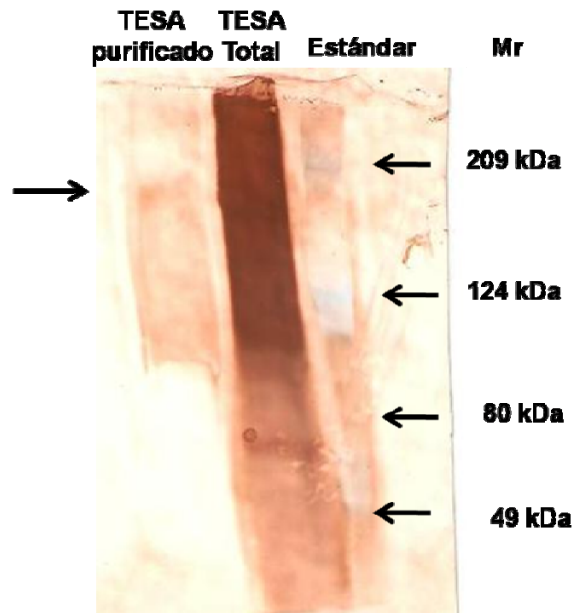


Figura 3. Western blot de las fracciones purificadas de los antígenos de TESA, con el pool de sueros chagásicos. Revelado con diaminobencidina (Mr: masa relativa, la flecha indica la proteína de aproximadamente 200 Mr, reconocida por el pool de sueros chagásicos).

Apéndice 4

Preparación de las soluciones de los diferentes métodos empleados en la purificación de los antígenos TESA

Cromatografía de afinidad (con A)

1) Buffer de cromatografía: (20 mmol.l⁻¹ tris-HCl, 0,50 mmol.l⁻¹ de Cloruro de sodio: NaCl, 1 mmol.l⁻¹ de Cloruro de calcio: CaCl₂, 1 mmol.l⁻¹ de Cloruro de magnesio: MgCl₂)

Se mezcló 1,5759 g de tris-HCl, 14,6100 g NaCl, 0,0555 g de CaCl₂, 0,1017 g y MgCl₂ con 250 ml de agua destilada y se ajustó a pH= 7,4 con NaOH y finalmente se completó hasta 500 ml con agua destilada.

2) Solución de elución: (0,30 mol.l⁻¹)

Se mezcló 1,1652 g de metil- α -D-manopiranosido y 1,1652 g de metil- α -D-glucopiranosido con 20 ml de buffer de cromatografía.

Electroforesis unidimensional

1) Tris-HCl (1,50 mol.l⁻¹ pH 8,8)

Se disolvió 27,23 g de tris-base con 80 ml de agua destilada, se ajustó a pH 8,8 con HCl puro y luego se enrasó hasta 150 ml. Se conservó a 4°C por un mes.

2) Tris-HCl (1,00 mol.l⁻¹ pH 6,8)

Se diluyó 12,11 g de tris-base con 80 ml de agua destilada, se ajustó a pH 6,8 con HCl puro y luego se afora hasta 100 ml. Se conservó a 4°C por un mes.

3) Acrilamida-Bisacrilamida (30,00%p/v; 2,60%p/v).

Se mezcló 29,20 g de acrilamida y 0,80 g de bis-acrilamida en 100 ml de agua destilada, se filtró y conservó a 4°C en envase color ámbar.

4) SDS AL 10,00%

Se pesó 10 g de SDS y se diluyó en 100 ml de agua destilada.

5) APS (Persulfato de amonio) al 10,00%p/v

Se disolvió 0,10 g de APS con 1 ml de agua destilada.

6) Bromofenol blue 0,50%p/v

Se disolvió 0,125 g de Bromofenol blue en 25 ml de agua destilada.

7) Buffer corrida: (25 mmol.l⁻¹ Tris, 192 mmol.l⁻¹ glicina, 0,10%p/v SDS, pH 8,3)

Se disolvió 3,03 g de Tris-base, 14,40 g de glicina y 1 g de SDS con 500 ml de agua destilada, y luego de enraso a un volumen final de 1000 ml.

8) Buffer muestra

Tabla 2. Preparación del buffer muestra.

Reactivo	Volumen (ml)
Agua destilada	4,17
Tris-HCl 1 mol.l ⁻¹ pH 6,8	0,625
Glicerol	2,50
SDS 10,00% p/v	2,00
Azul de bromofenol	0,200
Volumen total	9,50

11) Buffer muestra reductor

Se mezcló 950 μ l de buffer muestra más 50 μ l de β -Mercaptoetanol.

12) Geles de Poliacrilamida

Tabla 3. Preparación de los geles de poliacrilamida al 7,00% para la corrida electroforética de las fracciones purificadas.

Reactivos	Gel de separación (volumen en ml)	Gel de apilamiento (Volumen en ml)
Agua destilada	4,964	2,70
Acrilamida (30,00%)	2,33	0,67
Tris-HCl 1,5 mol.l ⁻¹ pH 8,8	2,50	-
Tris-HCl 1 mol.l ⁻¹ pH 6,8	-	0,50
SDS 10,00%p/v	0,10	0,04
APS 10,00%p/v	0,10	0,04
Temed	0,006	0,004
Volumen Final	10	4

Tabla 4. Preparación de los geles de poliacrilamida al 10,00% para la corrida electroforética de las fracciones purificadas.

Reactivos	Gel de separación (volumen en ml)	Gel de apilamiento (Volumen en ml)
Agua destilada	4	2,70
Acrilamida (30,00%p/v)	3,30	0,67
Tris-HCl 1,50 mol.l ⁻¹ pH 8,8	2,50	-
Tris-HCl 1 mol.l ⁻¹ pH 6,80	-	0,50
SDS 10,00%p/v	0,10	0,04
APS 10,00%p/v	0,10	0,04
Temed	0,004	0,004
Volumen Final	10,004	4

Tinción de plata

1) Solución A: (Etanol al 30,00% v/v; Acido acético al 10,00% v/v)

Se mezcló 15 ml de etanol y 5 ml de ácido acético, luego se completo hasta un volumen de 50 ml.

2) Solución B: (Etanol al 30,00% v/v)

Se midió 45 ml de etanol y se enraso con agua destilada hasta 150 ml.

3) Solución C: ($1,43 \text{ mmol.l}^{-1}$ de Ditionito de sodio: $\text{Na}_2 \text{O}_4\text{S}_2$)

Se diluyó 0,0125 g de ditionito de sodio con 50 ml de agua destilada.

4) Solución D: ($11,77 \text{ mmol.l}^{-1}$ de Nitrato de plata: AgNO_3 ; 0,01% v/v de formaldehido)

Se mezcló 0,10 g de AgNO_3 y 5 μl de formaldehido con 50 ml de agua destilada; se conservó en envase color ámbar.

5) Stock de Tiosulfato de sodio: ($31,37 \text{ mmol.l}^{-1}$ de Tiosulfato de sodio: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)

Se diluyó 0,0496 g de tiosulfato de sodio con 10 ml de agua destilada.

6) Solución de Revelado: ($0,38 \text{ mol.l}^{-1}$ de Carbonato de sodio: Na_2CO_3 , 0,06% v/v de formaldehido)

Se mezcló 4 g de Na_2CO_3 , 60 μl de formaldehido y 100 μl de solución stock de tiosulfato de sodio con 100 ml de agua destilada.

7) Acido acético glacial

Coloración de coomasie blue coloidal G-250

1) Solución I: (Acido Fosfórico: H_3PO_4 al 2,00% v/v y Etanol al 30,00% v/v)

Se midió 3 ml de ácido fosfórico y 45 ml de etanol, luego se enrasó con agua destilada hasta un volumen de 150 ml.

2) Solución II: (Acido Fosfórico: H_3PO_4 al 2,00% v/v)

Se midió 3 ml de ácido fosfórico y se aforó con agua destilada hasta 150 ml.

3) Solución III: (Sulfato de amonio: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 15,00% v/v, Ácido Fosfórico: H_3PO_4 al 2,00% v/v y Etanol al 30,00%v/v)

Se midió 7,50 ml de Sulfato de amonio, 1 ml de Ácido Fosfórico más 15 ml de Etanol, luego se enrasa con agua destilada hasta 50 ml.

4) Solución de Coomasie blue coloidal G-250 al 2,00% p/v

Se mezcló 2 g de coomasie blue coloidal G-250 con 100 ml de agua destilada.

Western blot

1) Buffer de transferencia: (25 mmol.l^{-1} Tris, 192 mmol.l^{-1} de glicina y 20,00%v/v de metanol a pH 8,3)

Se diluyó 3,03 g de tris-base, 14,41 g de glicina en 500 ml de agua destilada, luego se mezcló con 200 ml de metanol y finalmente se enrasó hasta un volumen de 1 000 ml.

2) Solución bloqueadora: (solución de PBS, leche descremada al 5,00%p/v y tween 20 al 0,10%v/v)

Se mezcló 5 g de leche descremada Carnation (Nestle) y 100 μl de tween 20 con 100 ml de agua destilada.

3) Solución de lavado: (solución de PBS, 0,05% de tween 20)

Se mezclaron 1 000 ml de solución de PBS con 500 μl de tween 20.

4) Solución de PBS: (0,14 mol.l^{-1} de cloruro de sodio: NaCl, 10 mmol.l^{-1} de

fosfato ácido de sodio: Na_2HPO_4 , 1 mmol.l^{-1} fosfato diácido de potasio:
 KH_2PO_4 , 3 mmol.l^{-1} de cloruro de potasio: KCl)

Se mezcló 8 g de NaCl ; 1,15 g de Na_2HPO_4 ; 0,20 g de KH_2PO_4 y 0,20 g de KCl con 1 000 ml de agua destilada.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	Purificación de antígenos excretados/secretados de las formas tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> Por Cromatografía De Afinidad, Para Ser Utilizados En El Diagnóstico De La Enfermedad De Chagas
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Figuera Ch. María A.	CVLAC	16.486 696
	e-mail	m.alex888@hotmail.com
	e-mail	figuerachirinos@yahoo.com
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

TESA, CROMATOGRAFÍA, <i>Trypanosoma cruzi</i>

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

La enfermedad de Chagas es una infección endémica severa que afecta a millones de personas de América Central y del Sur, y es causada por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi*. En la actualidad no existe una prueba estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Los métodos para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en su mayoría emplean extractos enteros o semipurificados de las formas epimastigotes de *T. cruzi*; estos antígenos pueden ocasionar reacciones cruzadas, principalmente con leishmaniasis. En el presente trabajo se realizó la purificación de los antígenos excretados/secretados de *T. cruzi* (TESA), por cromatografía de afinidad utilizando la resina concanavalina A. Estos antígenos fueron eluidos con una mezcla de glucosa y manosa de $0,3 \text{ mol l}^{-1}$. El SDS-PAGE teñido con coomasie blue coloidal permitió la visualización de 5 bandas de, aproximadamente, 220, 170, 45, 30 y 20 Mr. La inmunogenicidad fue evaluada por Western blot, obteniendo unas series de bandas inmunogénicas de 220, 85, 45, 30 y 20 Mr; utilizando un pool de sueros positivos para la enfermedad de Chagas. Sin embargo, el rendimiento proteico obtenido por éste método de purificación fue bajo ($1,22 \mu\text{g ml}^{-1}$), indicando que la cromatografía de afinidad con concanavalina A no es la más adecuada para su utilización como método rutinario para la obtención de antígenos inmunogénicos, para ser empleados en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Guilarte, Del Valle	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
Simoni, Zulay	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
Berrizbeitia, Mariolga	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	6 119 292
	e-mail	mberriz@yahoo.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2010	05	25
------	----	----

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-Figueram.doc	Aplication/ Word

Alcance:

Espacial : Universal (Opcional)

Temporal: Intemporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciada en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente-Núcleo de Sucre

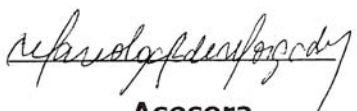
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

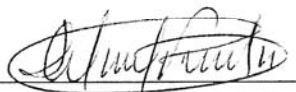
El autor garantiza en forma permanente a la Universidad de Oriente el derecho de archivar y difundir, por cualquier medio, contenido de esta tesis. Esta difusión será con fines estrictamente científicos y educativos, pudiendo cobrar a la Universidad de Oriente una suma destinada a recuperar parcialmente los costos involucrados. El autor se reserva los derechos de propiedad intelectual así como todos los derechos que pudieran derivarse de patentes industriales o comerciales.



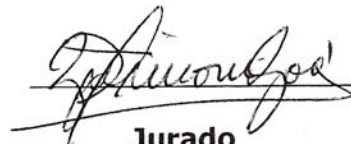
Autor
Figuera. Ch. María. A



Asesora
Berrizbeitia, Mariolga



Jurado
Guilarte, Del Valle



Jurado
Simoni, Zulay

POR LA COMISIÓN DE TESIS:

