

ANTÍGENOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* CON FINES DIAGNÓSTICOS: DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA A LA PRÁCTICA

Antigens of Trypanosoma Cruzi with Diagnostic Purposes: from Basic Investigation to Practice

Yelitza Campos García^{1,2}, Luis Briceño¹, Walter Mosca¹.

¹ Instituto de Biomedicina - Universidad Central de Venezuela. ²CG Solutions S.A.
yelcampos@gmail.com

RESÚMEN.

La enfermedad de Chagas es producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Es una enfermedad crónica que afecta un gran número de seres humanos y representa un problema de salud pública en América Latina. Según datos de la OMS existen entre 6 y 8 millones de personas infectadas y 65 millones de personas en riesgo de infección. En Venezuela, la enfermedad de Chagas es endémica en las zonas rurales de la mayor parte del territorio nacional. Los métodos parasitológicos directos se utilizan para hacer el diagnóstico de la fase aguda de la enfermedad, pero durante la fase crónica de la infección con *T. cruzi*, la parasitemia es baja e inconstante, por lo que se recurre a métodos alternativos como es el caso del diagnóstico serológico. Aunque estos métodos sean los más utilizados ellos presentan algunas limitaciones inherentes a su propia naturaleza, tales como el asumir que todas las respuestas inmunes deben ser normales, lo que no sucede en toda la población. En este sentido, el objetivo de esta investigación de tipo experimental es evaluar diferentes condiciones de cultivo y parámetros como: temperatura/presión y la sonicación, en la obtención de antígenos de *Trypanosoma cruzi*, que puedan ser utilizados con fines diagnósticos en la enfermedad de Chagas. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que, el autoclavar epimastigotes de *T. cruzi* en fase estacionaria de crecimiento después de ser sometidos a condiciones de estrés de nutrientes, permite obtener un antígeno sensible, específico, de fácil obtención y bajo costo que puede ser utilizado para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, endémica, métodos parasitológicos, diagnóstico serológico, estrés de nutrientes.

ABSTRACT

Chagas disease is produced by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. It is a chronic disease that affects a large number of human beings and represents a public health problem in Latin America. According to WHO data there are between 6 and 8 million people infected and 65 million people at risk of infection. In Venezuela, Chagas disease is endemic in rural areas of most of the national territory. Direct parasitological methods are used to

make the diagnosis of the acute phase of the disease, but during the chronic phase of infection with *T. cruzi*, parasitemia is low and inconstant, so that alternative methods are used, as is the case of serological diagnosis. Although these methods are the most used, they present some limitations inherent to their own nature, such as assuming that all immune responses must be normal, which does not happen throughout the population. In this sense, the objective of this experimental research is to evaluate different culture conditions and parameters such as: temperature / pressure and sonication, in the production of *Trypanosoma cruzi* antigens, that can be used for diagnostic purposes in the disease. Chagas. The results obtained in this work indicate that autoclaving *T. cruzi* epimastigotes in stationary phase of growth after being submitted to nutrient stress conditions allows to obtain a sensitive, specific, easily obtainable and low-cost antigen that can be used for the diagnosis of Chagas Disease.

Keywords: Chagas disease, endemic, parasitological methods, serological diagnosis, nutrient stress.

INTRODUCCIÓN.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una zoonosis producida por el protozoario flagelado *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, descrito por primera vez en 1909 por Carlos Chagas, en Minas Gerais, Brasil. Es una enfermedad crónica debilitante que afecta la salud, el bienestar y la productividad de un gran número de seres humanos y representa un problema de salud pública en América Latina. Durante el proceso evolutivo de la enfermedad de Chagas se diferencian dos etapas con características clínicas distintas: fase aguda y fase crónica. La fase aguda comprende los fenómenos clínicos que se establecen en los primeros meses de la infección (2-4 meses). Esta etapa de la enfermedad se caracteriza por altos niveles de parasitemia demostrable por medio de examen directo en sangre. La fase crónica se caracteriza por una baja parasitemia y manifestaciones clínicas bastante amplias, desde la ausencia de síntomas hasta la aparición de una patología cardíaca progresiva que compromete la capacidad funcional del paciente.

El diagnóstico de los pacientes en fase crónica se basa generalmente en la detección de anticuerpos específicos contra epimastigotes de *T. cruzi*. Diferentes técnicas de diagnóstico y diferentes antígenos han sido desarrollados para detectar anticuerpos específicos, entre ellos, fracciones antigénicas, péptidos sintéticos y antígenos recombinantes. A pesar de todo el esfuerzo y trabajo realizado, aun no se ha encontrado el antígeno ideal para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*. En este sentido, para garantizar un diagnóstico certero de la enfermedad, la Organización Mundial de la Salud (OMS), sugiere el empleo de tres pruebas serológicas de principios diferentes en la determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi*.

El Laboratorio de Fisiopatología, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, está orientado al estudio del *Trypanosoma cruzi* y la Enfermedad de Chagas. Su misión es evaluar en las áreas de inmunoparasitología, bioquímica y biología molecular, las interacciones parásito-hospedero que originan el desarrollo de la cardiopatía chagásica, a través de la búsqueda incansable de respuestas, se han evaluado algunos antígenos en

pruebas de linfoproliferación obtenidos bajo diferentes condiciones experimentales, tales como, inhibidores de actividad proteolítica, efecto de la temperatura en la actividad proteolítica y diferentes tratamientos de ruptura en la obtención del antígeno (congelar-descongelar, prensa francesa) y se ha observado, entre otras cosas, que la temperatura es importante en la inhibición de la actividad proteolítica de estos parásitos y que las condiciones de ruptura empleadas influyen en la sensibilidad y especificidad de la preparación. Además, se ha empleado una suspensión de epimastigotes autoclavados, en pruebas linfoproliferativas en pacientes chagásicos, la cual ha demostrado presentar epitopes que son reconocidos por los linfocitos T, de pacientes con enfermedad de Chagas y de conservar características tales como las supresoras, reportadas en la infección con *T. cruzi*. Tomando en consideración el efecto de la temperatura sobre la actividad de las proteasas y considerando que este antígeno conserva alguna de sus características inmunológicas después de ser procesado a 120°C por 15 minutos en autoclave, se decidió evaluar el potencial de esta preparación en pruebas serológicas, observándose una buena sensibilidad y especificidad en el mismo. En vista de estos resultados y considerando la necesidad de contar con un antígeno que sea capaz de satisfacer requerimientos como: sensibilidad, especificidad, de fácil obtención, manejo y uso y bajo costo de producción, de forma tal que pueda ser utilizados como alternativas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas surge el planteamiento de esta investigación para evaluar diferentes condiciones de cultivo y parámetros como la temperatura y la presión, en la obtención de antígenos de *Trypanosoma cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos: Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, fueron cultivados a 25 °C en un medio LIT modificado compuesto por: NaCl 4,0 grs; KCl 0,4 grs; Na₂HPO₄ 8,0 grs; triptosa 5,0 grs; extracto de hígado 5,0 grs; extracto de levadura 2,5 grs ajustada a 500 ml de agua y pH 7.2

Antígenos: (a) Antígeno completo autoclavado: Se utilizaron dos antígenos completos autoclavados; uno obtenido al inicio de la fase estacionaria (AAI) y el otro obtenido al alcanzar la fase estacionaria de crecimiento y someterlo a una condición de estrés de nutrientes, en medio DMEN durante 24 horas (AA). Luego, los parásitos se centrifugaron a 2000 x g durante 10 minutos, se lavaron 3 veces con PBS estéril pH 7.2. Después de ajustar la a 30x10⁶ parásitos/ml con PBS pH 7.2 estéril, se autoclavaron durante 10 minutos a 15 libras/120°C. (b) Antígeno completo sonificado: se realizó el mismo protocolo anterior con las siguientes modificaciones: el último lavado se realizó con PBS pH 7.2, con EDTA 0,2 mM, estéril y en lugar de autoclavar se procedió a sonificarlos (Sonifier Branson Modelo 250, Branson Ultrasonic Corporation, USA), utilizando 2 ciclos de 20 segundos cada uno (50 Watos), obteniéndose los antígenos sonificados en fase estacionaria inicial (ASI) y en fase estacionaria con estrés de nutrientes (AS).

Sueros: se utilizaron 30 sueros de individuos sanos, comprobados mediante serología convencional obtenidos del Banco Municipal de Sangre, 32 sueros de pacientes con enfermedad de Chagas, analizados por tres metodologías diferentes (ELISA, hemaglutinación indirecta, e inmunofluorescencia) realizado por el laboratorio de la

Dirección de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria, Maracay, MSDS. Para analizar la reactividad cruzada se emplearon un total de 142 sueros de pacientes clínica y parasitológicamente confirmados como enfermos de: Leishmaniasis Cutánea Americana (n=10), Leishmaniasis Visceral (n=10). Malaria (n=10),

ELISA: se sensibilizaron placas de 96 pozos fondo plano (Maxisorp, Nunc International Corporation) con 100 ul de antígeno y 100 ul de Buffer Carbonato (0.016 M Na₂CO₃, 0.034 M NaHCO₃ pH 9.6) y se incuban a 4°C durante toda la noche. Luego, se lavaron 3 veces con TBS-T 150 (150 mM NaCl, 50 Mm Tris Base, 0.01% Tween 20 pH 8) y se agregaron 100 ul/pozo de solución de bloqueo (5% leche descremada, 1% SFB en TBS-T 150) y se incubaron a 37°C por 1 hora. Se lavaron 3 veces con TBS-T 150 y se le agregaron, por duplicado, 100 ul/pozo de los sueros, diluidos 1:600 en solución TBS-T 0.75 (0.75 M NaCl, 50 Mm Tris Base, 0.01% Tween 20 pH 8), y se incubaron a 37°C por 1 hora. Se lavaron 3 veces con TBS-T 0.75, se agregaron 100 ul/pozo de anticuerpo secundario, anti-IgG marcada con fosfatasa alcalina (GIBCO BRL, USA) diluida 1:1000 con solución TBS-T 150 y se incubaron a 37°C por 1 hora. Se lavaron 3 veces con TBS-T 0.150 y se incubaron durante 30 minutos con 100 ul del sustrato (10 mg de PNPP en 10 ml de Buffer dietanolamida, PIERCE) a 37°C, en oscuridad. La lectura de las densidades opticas (D.O) fue realizada a 405 nm en un Multiskan EX (Termo Electrón Corporation, USA).

SDS-PAGE: Los diferentes antígenos se analizaron utilizando geles de poliacrilamida al 10% en condiciones disociantes, (SDS-PAGE), según la metodología descrita por Laemmli (1970). Se utilizó el sistema Mini Protean II (Bio-Rad), en cada gel preparativo se utilizaron 100 ug de proteína de cada antígeno. La electroforesis se llevó a cabo a corriente constante (20 mA) y a temperatura ambiente. Una vez finalizada la corrida, las bandas de proteínas se evidencian por tinción con Azul de Coomassie R-250 en metanol/ácido acético/agua 5:1:5 (v/v/v). En cada gel se colocó el marcador de referencia (Benchmark Prestained Protein Ladder, Invitrogen).

Western blot: Luego de realizar geles preparativos de poliacrilamida al 10% en condiciones disociantes, las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa con el sistema de transferencia continua NovaBlot de Pharmacia a 0.8 mA/cm² durante 1 hora. Las membranas de nitrocelulosa se dejaron en solución bloqueadora (5% leche descremada, 1% SFB en TBS-T 150 (150 mM NaCl, 50 Mm Tris Base, 0.01% Tween 20 pH 8)) toda la noche a 4°C, al día siguiente se realizaron los inmunoblot con la siguiente metodología: se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno, a todas las membranas con la solución TBS-T 150. Se agregaron los anticuerpos primarios: pool de sueros de humanos positivos y negativos para enfermedad de Chagas (dilución 1/1000) y de pacientes con leishmaniasis; y se dejaron durante 1 hora y 30 minutos en agitación, a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con solución de lavado TBS-T 150, por 10 minutos cada uno. Se agregó el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (1/1000) (Anti-IgG humano, Goat anti-human IgG (H+L) GIBCO – BRL) y se dejaron en agitación durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con la solución de lavado, por 10 minutos cada uno. En el último paso se agregó el sustrato (Sustrato 1-Step™ NBT/ BCIP. PIERCE), manteniéndose en agitación hasta que se observaron las bandas que se correspondieron a los antígenos. Se lavó con agua destilada y se procedió a fotografiar el inmunoblot.

Análisis de los resultados: Para realizar el análisis estadístico y los gráficos se utilizó el programa GraphPad InStat 3.02 (GraphPad software, San Diego, CA). El punto de corte se calculó multiplicando por dos la desviación estándar más el promedio de los negativos ($St \times 2 + \text{Prom. Negativos}$). La sensibilidad se determinó sobre la base del número de sueros verdaderos positivos (V_p) detectados por la prueba “patrón oro” entre la suma de los sueros V_p , con los falsos negativos (F_n) que se registraron para la prueba ($\text{sensibilidad} = V_p / (V_p + F_n)$). De igual manera con los sueros que resultaron negativos, se calcularon los niveles de especificidad a partir de los sueros evaluados en zonas endémicas ($\text{Esp} = V_n / (V_n + F_p)$).

Cuantificación de proteínas

Método del ácido bisincróico: Es un método cuantitativo colorimétrico que se fundamenta en la detección del Cu^{1+} , el cual se forma cuando el Cu^{2+} es reducido por las proteínas en medio alcalino. Su máximo de absorbancia es 562 nm, sin embargo, se puede leer desde 540-590nm. Se trabajó con Micro BCA™ Protein assay reagent kit (PIERCE), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La lectura de las absorbancias se realizó con una longitud de onda de 570 nm en el espectrofotómetro Bekman Du 640B.

Inmunofluorescencia

Un total de 1×10^6 parásitos, son lavados dos veces con PBS, luego se esuspendieron en 0.5 ml de paraformaldehído 4% en PBS, se mezclaron por inversión y se incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente, los parásitos se lavaron con PBS y se resuspendieron en 0.5 ml de buffer A (100 mM Na_2HPO_4 , 100 mM glicina, pH 7.2). Luego se lavaron con BSA 1% y se resuspendieron en 0.1 ml del anticuerpo primario (diluído 1:100 en BSA 1%), se incubaron 1 hora a 4°C y se lavaron dos veces en BSA 1%. Luego, se resuspendieron en 0.1 ml del anticuerpo secundario (diluído en BSA 1 %) y se incubaron 1 hora en oscuridad. Se agregaron 0.04 ml de 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 0.01 mM, se incubaron 5 min en oscuridad y se hicieron lavados con BSA 1% y agua. Finalmente, se tomaron 0.05 ml de la suspensión de parásitos y se distribuyeron en un portaobjeto, se dejó secar y se le agregó glicerol 10%.

Las láminas se examinaron con el Microscopio Invertido TE2000 (Nikon) y los resultados analizados con el software E2-C1 Confocal Microscopy C1.

RESULTADOS / DISCUSIÓN

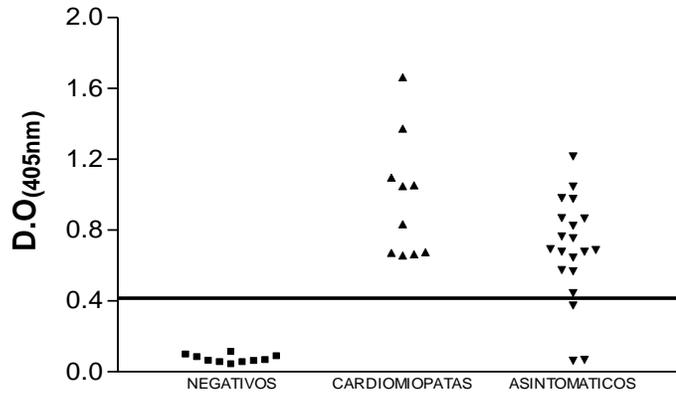
En primer término, se evaluó el efecto que tiene el tratamiento de ruptura sobre la preparación de antígenos crudos de *Trypanosoma cruzi*. Para ello, epimastigotes de *T. cruzi* cultivados en medio rico en nutrientes hasta alcanzar el inicio de la fase estacionaria de crecimiento, fueron autoclavados y sonicados (AAI y ASI respectivamente). Estos antígenos, se enfrentaron a sueros de individuos sanos, pacientes asintomáticos y pacientes con cardiomiopatía utilizando la técnica de ELISA. Los resultados muestran que los antígenos completos en fase estacionaria autoclavados (AAI) reconocen 27 de 30 sueros positivos (27/30), lo que representa 90.9% de sensibilidad y reconocen 10 de 10 (10/10) sueros negativos, lo que significa una especificidad de 100%, tal como se muestra en la Figura 1A. Mientras que los antígenos completos sonicados (ASI) tienen una sensibilidad

de 96.77% (29/30) y una especificidad de 100% (10/10), tal como se evidencia en la Figura 1B.

Figura 1A.

Antígeno Completo obtenido a partir de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*, autoclavados, AAI.

A

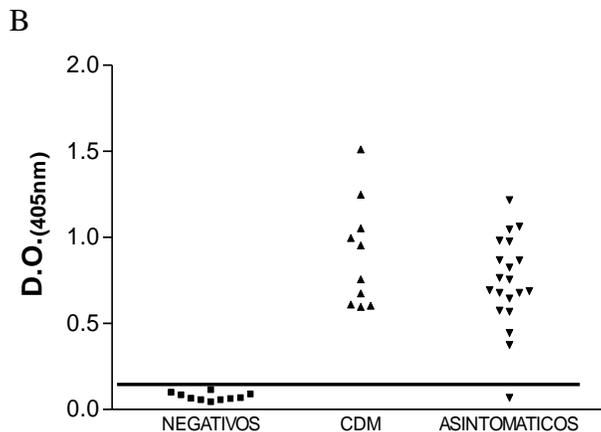


Mientras que los antígenos completos sonicados (ASI) tienen una sensibilidad de 96.77% (29/30) y una especificidad de 100% (10/10), tal como se evidencia en la Figura 1B.

Estos resultados sugieren que ambas preparaciones antigénicas tienen la capacidad de detectar los verdaderos negativos (100 %), lo que sugiere que el procedimiento de obtención de los antígenos crudos no afecta este parámetro. Sin embargo, al evaluar la capacidad de discriminar los verdaderos positivos, el antígeno sonicado presenta una especificidad mayor que el antígeno autoclavado, lo cual sugiere que este parámetro si ve afectado por el tratamiento empleado.

Figura 1B

Antígeno Completo obtenido a partir de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* sonicados, ASI



Fuente: Elaboración propia, (2019).

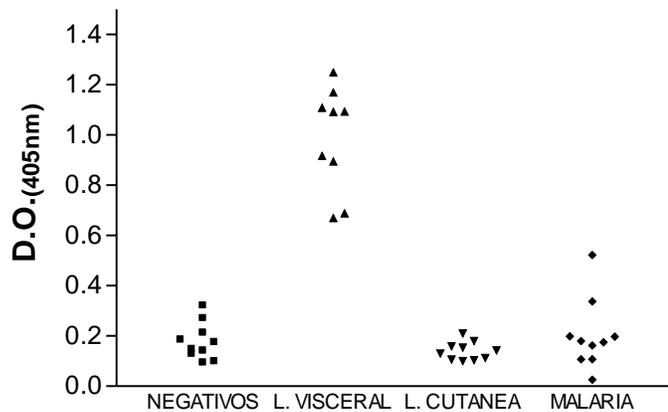
Estos resultados sugieren que ambas preparaciones antigénicas tienen la capacidad de detectar los verdaderos negativos (100 %), lo que sugiere que el procedimiento de obtención de los antígenos crudos no afecta este parámetro. Sin embargo, al evaluar la capacidad de discriminar los verdaderos positivos, el antígeno sonicado presenta una especificidad mayor que el antígeno autoclavado, lo cual sugiere que este parámetro si se ve afectado por el tratamiento empleado.

Uno de los principales problemas de los antígenos utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, es la reactividad cruzada que estos pueden presentar con otras parasitosis, con las cuales estos parásitos comparten epitopes antigénicos, tales como leishmaniasis, toxoplasmosis, esquistosomiasis y malaria, entre otros. Es por ello, que cualquier antígeno que se evalúe con fines diagnósticos debe ser enfrentado con sueros de otras parasitosis. En este sentido, se evaluaron los antígenos de *T. cruzi*, sonicados (ASI) y autoclavados (AAI) con sueros de pacientes con leishmaniasis visceral, leishmaniasis cutánea y malaria. Observamos que AAI reconoce como falsos positivos 10 de 10 sueros con leishmaniasis visceral (10/10), lo que representa una reactividad cruzada de 100% y 2 de 10 (2/10) sueros de pacientes con malaria (20% de reactividad cruzada) (Figura. 2A). Por otro lado ASI, reconoce como falsos positivos a 9 de 10 sueros de pacientes con leishmaniasis visceral (90% de reactividad cruzada) y dos sueros de pacientes de malaria se ubican en el “border line”, por lo que serían considerados como “dudosos” (Figura. 2 B).

Figura 2. Evaluación de la reactividad cruzada de antígenos de *T. cruzi* al inicio de la fase estacionaria. Se realizaron pruebas de ELISA con 10 sueros de pacientes con leishmaniasis visceral (L.VISCERAL), 10 sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea (L.CUTANEA) y 10 sueros de pacientes con Malaria. (A) Antígeno Completo autoclavado. (B) Antígeno Completo sonicado.

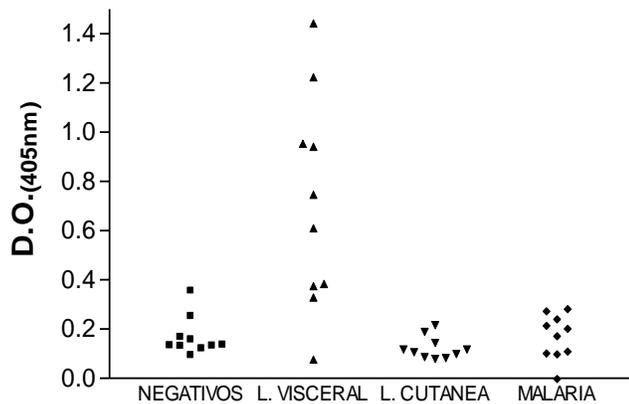
Figura 2A

Antígeno Completo autoclavado.



Fuente: Elaboración propia (2019)

Figura 2B
Antígeno Completo sonicado. B



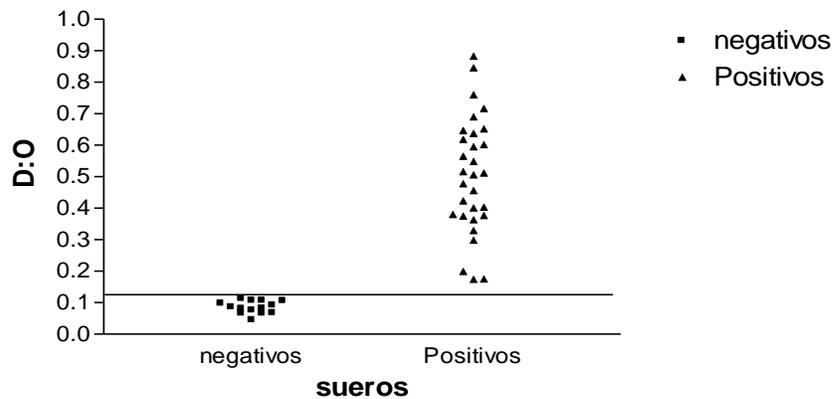
Fuente: Elaboración propia (2019).

Estos resultados sugieren que los antígenos completos obtenidos de epimastigotes al inicio de la fase estacionaria, tanto sonicados, como autoclavados comparten epitopes antigénicos con otros parásitos originando una elevada reactividad cruzada, razón por la cual no pueden ser utilizados con fines diagnósticos.

En segundo término se procedió a evaluar el efecto de someter el cultivo a un estrés de nutrientes una vez alcanzada la fase estacionaria, y determinar si esto tiene alguna influencia en la sensibilidad y especificidad de las preparaciones. Para ello, se obtuvieron los antígenos completos autoclavados de epimastigotes sometidos a estrés (AA) y antígenos completos sonicados de epimastigotes sometidos a estrés (AS), como se describe en materiales y métodos. Podemos observar, que AA reconoce como verdaderos positivos 30 de 30 sueros (30/30) lo que representa 100 % de sensibilidad y reconoce 14/14 sueros como verdaderos negativos, es decir 100% especificidad (Figura 3^a). Por otro lado, si bien es cierto que AS reconoce 30/30 positivos, 100% de sensibilidad, su capacidad de discriminar los verdaderos negativos (especificidad) es de 66% (7/14) (Figura 3 B).

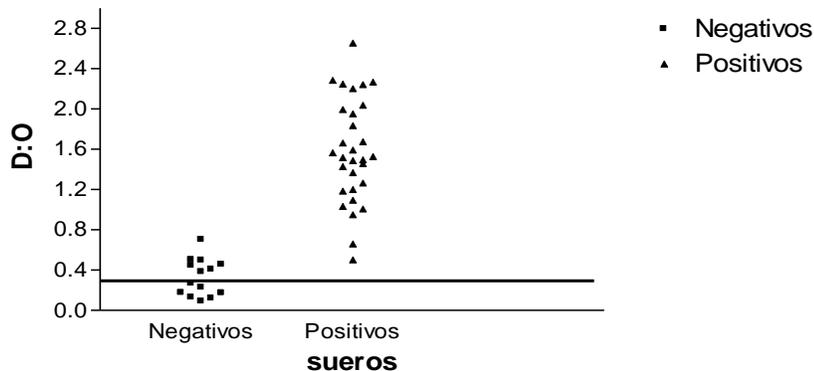
Figura 3. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de antígenos obtenidos a partir epimastigotes de *T. cruzi* sometidos a estrés de nutrientes. Los diferentes antígenos son utilizados en pruebas de ELISA frente a 14 sueros controles, 30 sueros de pacientes con enfermedad de Chagas (A) Antígeno autoclavado (B) Antígeno Completo obtenido sonicado

Figura 3A
Antígeno autoclavado



Fuente: Elaboración propia (2019).

Figura 3B
Antígeno Completo obtenido sonicado



Fuente: Elaboración propia (2019).

Estos resultados sugieren que colocar los parásitos en un medio mínimo por 16 horas (estrés nutricional) origina modificaciones importantes en la antigenicidad de las preparaciones, logrando aumentar la sensibilidad de AA (100%) con respecto a AAI (90.9%) y manteniendo la especificidad en 100%. Por el contrario, el tratamiento de estrés nutricional empleado, si bien es cierto que logró aumentar la sensibilidad de 96.97% en ASI a 100% en AS, no fue capaz de mantener la especificidad en 100%, sino que por el

contrario disminuyo en AS a 66%. Estos resultados sugieren que someter los cultivos a estrés nutricional y luego autoclavarlos (AA), es el tratamiento que permite obtener una preparación antigénica con un mayor potencial diagnóstico.

Los resultados discutidos anteriormente, sugieren que autoclavar epimastigotes de *T. cruzi* en fase estacionaria, después de ser sometidos a condiciones de estrés de nutrientes, puede ser de utilidad para la obtención de un antígeno con potencial para el diagnóstico de esta parasitosis, a diferencia de lo observado con los otros antígenos evaluados. Para determinar las características de reconocimiento antígeno-anticuerpo, en el antígeno completo (AA), se utilizó la técnica de inmunoblot, frente a sueros de pacientes asintomáticos, con cardiomiopatía y leishmaniasis.

En la Figura 4, observamos una serie de bandas de diferentes pesos moleculares aparentes, que representan la reacción de reconocimiento antígeno-anticuerpo, de los sueros empleados, frente a la preparación antigénica de *T. cruzi*, en fase estacionaria sometida a estrés de nutrientes y autoclavados. A diferencia de lo descrito en secciones anteriores, cuando se usa esta preparación, no se observa ningún reconocimiento al usar los sueros de pacientes con leishmaniasis, desapareciendo la reactividad cruzada frente a los sueros de pacientes con esta enfermedad (Figura 4), tal como se vio reflejado mediante la técnica de ELISA.

Figura 4.

Antígenos de *T. cruzi* en fase estacionaria sometidos a estrés autoclavados. 1-10 Sueros de pacientes con enfermedad de Chagas. 11-15 Sueros de pacientes con leishmaniasis. 16-18 pool de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas; 19 Pool de sueros de individuos sanos. Se indica el marcador de peso molecular: 176.5 KDa, 113.7 KDa, 80.9 KDa, 63.8 KDa, 49.5 KDa, 37.4 KDa, 26.0 KDa, 19.6 KDa, y 14.9 KDa



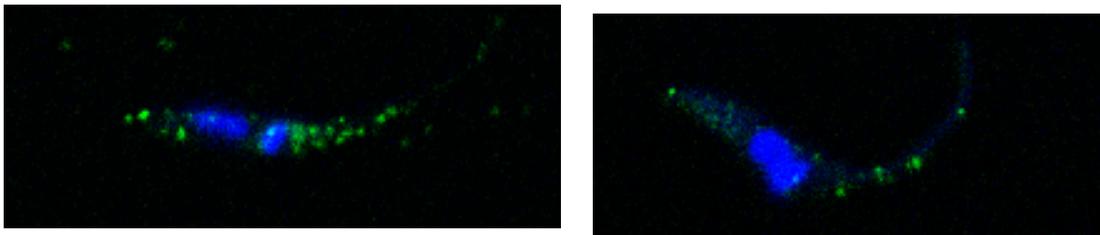
Fuente: Elaboración propia (2019).

Estos resultados indican que esta preparación de antígeno completo de *T. cruzi* autoclavado, en fase estacionaria y sometido a condiciones de estrés, favorece la presencia de antígenos específicos para *T. cruzi* y disminuye la de antígenos compartidos con otros parásitos sin afectar la sensibilidad, y mejorando significativamente su especificidad.

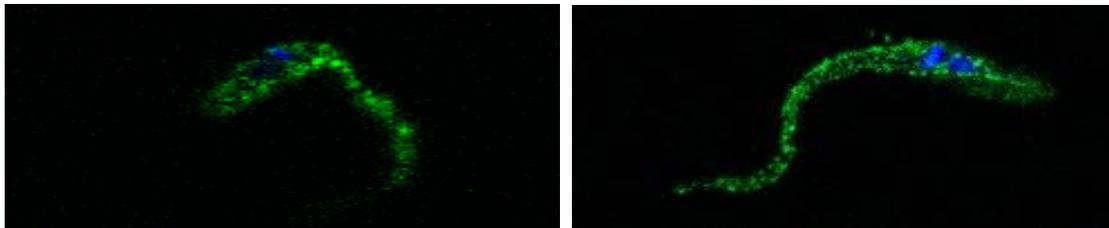
Si bien es cierto que los resultados indican cambios en el perfil de reconocimiento de los epitopes contenidos en AA se quiso evaluar el perfil de reconocimiento de sueros de ratones con infección crónica en parásitos completos, mediante la técnica de inmunofluorescencia, tal como se describe en materiales y métodos. Los resultados muestran que el perfil de reconocimiento antigénico de estos sueros es completamente diferente entre los parásitos controles y los sometidos a estrés durante 24 horas, lo cual nuevamente está indicando que esta condición es determinante en la expresión de los epitopes que son reconocidos por los sueros utilizados y que como hemos visto en secciones anteriores esto parece estar contribuyendo para mejorar la sensibilidad y especificidad del antígeno obtenido bajo estas condiciones.

Figura 5. Inmunofluorescencia de *T. cruzi* frente a sueros de ratones con infección crónica. (A) *T. cruzi* cultivados en medio rico nutrientes. (B) *T. cruzi* cultivados en medio mínimo (condición de estrés). Color azul: núcleo y Kinetoplasto teñidos con DAPI; Verde: reactividad del suero de ratón crónico con FICT.

A



B



CONCLUSIONES / RECOMENDACIONES.

En síntesis, los resultados presentados sugieren que, el autoclavar epimastigotes de *T. cruzi* en fase estacionaria de crecimiento y sometidos a condiciones de estrés de nutrientes, permite obtener un antígeno sensible, específico, de fácil obtención y bajo costo. Sin embargo, es necesario realizar evaluaciones con un mayor número de muestras para validar estadísticamente este antígeno, de tal forma que pueda ser utilizado como antígeno alternativo para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas.

Por otro lado, estos resultados demuestran que la investigación básica que se lleva a cabo en las Universidades puede ser llevada a la práctica clínica.

REFERENCIAS.

1. WHO.2014. <http://www.paho.org/world-health-day-2014>
2. Guzmán-Gómez D, López-Monteon A, de la Soledad Lagunes-Castro M, Álvarez-Martínez C, Hernández-Lutzon MJ, Dumonteil E, Ramos-Ligonio A. (2015). Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: role of the antigen used for diagnostic. *Parasit Vectors* 8:466.
3. Pan American Health Organization, Joint Meeting of Southern Cone, Central American, Andean, Amazon and Mexican Subregional Initiatives for the Prevention and Control of Chagas' disease PAHO, Belem do Pará, Brazil, 2009
4. Carvalho M, Krieger M, Almeida E. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion*. 1993. 33: 830-834.
5. Picka, M.C., Meira, D.A., de Carvalho, T.B., Peresi, E., and Marcondes-Machado, J. 2007. Definition of a diagnostic routine in individuals with inconclusive serology for Chagas disease. *Braz J Infect Dis* 11:226-233..
6. Añez, N., Crisante, G., and Rojas, A. 2004. Update on Chagas disease in Venezuela--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:781-787
7. Zarate-Blades, C.R., Blades, N., Nascimento, M.S., da Silveira, J.F., and Umezawa, E.S. 2007. Diagnostic performance of tests based on *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens in an endemic area for Chagas' disease in Bolivia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:229-232.
8. 31. Vercosa, A.F., Lorena, V.M., Carvalho, C.L., Melo, M.F., Cavalcanti, M.G., Silva, E.D., Ferreira, A.G., Pereira, V.R., Souza, W.V., and Gomes, Y.M. 2007. Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic Chagasic patients. *J Clin Lab Anal* 21:271-276.
9. 32. Cheng, K.Y., Chang, C.D., Salbilla, V.A., Kirchoff, L.V., Leiby, D.A., Schochetman, G., and Shah, D.O. 2007. Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Clin Vaccine Immunol* 14:355-361.
10. 33. Marcipar, I.S., Roodveldt, C., Corradi, G., Cabeza, M.L., Brito, M.E., Winter, L.M., Marcipar, A.J., and Silber, A.M. 2005. Use of full-length recombinant calflagin and its c fragment for improvement of diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Clin Microbiol* 43:5498-5503.

11. Umezawa, E.S., Bastos, S.F., Coura, J.R., Levin, M.J., Gonzalez, A., Rangel-Aldao, R., Zingales, B., Luquetti, A.O., and da Silveira, J.F. 2003. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion* 43:91-97.
12. Lorca, M., Gonzalez, A., Reyes, V., Veloso, C., Vergara, U., and Frasc, C. 1993. [The diagnosis of chronic Chagas disease using recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*]. *Rev Med Chil* 121:363-368.
13. Briceño-Zoppi, L. 2004. Alternativas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Tesis Doctoral, Universidad Central de Venezuela.
14. Mosca, W., Navarro, N., Campos, Y., and Briceno, L. 2006. Proliferation and bystander suppression induced by antigens of *Trypanosoma cruzi*. Evaluation with a modification of the T cell blot technique. *Invest Clin* 47:265-282.
15. Mosca, W., Briceno, L., and Hernandez, M.I. 1991. Cell mediated immunity in Chagas' disease. *Trypanosoma cruzi* antigens induce suppression of the in vitro proliferative response of mononuclear cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86:147-152.
16. Mosca, W., and Briceno, L. 1993. Cell mediated immune response in patients with Chagas. Correlation with the presence of Chagasic cardiomyopathy. *Biol Res* 26:225-231.
17. Briceno, L., and Mosca, W. 1996. Defective production of interleukin 2 in patients with Chagas' disease. Purified IL-2 augments in vitro response in patients with chagasic cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91:601-607.