

Efecto de las condiciones de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* sobre la calidad de los antígenos para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas.

Ana Rita De Lima^(1,2), Patricia Arévalo⁽¹⁾, Valentina Bastidas⁽¹⁾, María Luisa Bolívar⁽¹⁾, María Consuelo Navarro⁽¹⁾, Victor Contreras^(1,2)

RESUMEN

Para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas se emplea principalmente extractos proteicos totales de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cuya obtención masiva implica el cultivo en medio axénico. Previamente demostramos cambios en los perfiles peptídico y glicopeptídico en un mismo aislado del parásito cuando es mantenido mediante cultivo prolongado en medio axénico LITB (condición cultivo) o mediante pases alternos entre triatomino y vertebrado (condición triatomino). En este trabajo se determinó la variación en la oferta antigénica de *T. cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas cuando el parásito es mantenido bajo diferentes esquemas en el laboratorio. Para ello se obtuvieron fracciones proteicas y glicoproteicas de epimastigotas de *T. cruzi* (cepa EP) mantenidos bajo las condiciones triatomino y cultivo, las cuales se caracterizaron mediante electroforesis (SDS-PAGE) y coloraciones específicas. El análisis antigénico se realizó mediante inmunoblotting empleando sueros de pacientes con enfermedad de Chagas, leishmaniasis, lupus eritematoso sistémico ó LES, sífilis, toxoplasmosis e individuos aparentemente sanos (IAS). Nuestros resultados mostraron cambios en los perfiles peptídico y glicopeptídico de parásitos mantenidos en diferentes condiciones de mantenimiento. Los sueros chagásicos mostraron reconocimiento de mayor número de antígenos procedentes de la condición cultivo, sin embargo éstos presentaron mayor índice de reacciones cruzadas con leishmaniasis y LES. El patrón de bandas reconocidas por los diferentes sueros chagásicos mostró una mayor heterogeneidad en antígenos de la condición triatomino, mientras que los procedentes de la condición cultivo mostraron una tendencia hacia un perfil antigénico común. No se observó reconocimiento de antígenos de las condiciones triatomino y cultivo en IAS, pacientes con sífilis y toxoplasmosis. Estos resultados indican la necesidad de estandarizar variables para la obtención de antígenos de *T. cruzi* con fines diagnósticos, a fin de garantizar la sensibilidad y especificidad de los resultados obtenidos.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, inmunoblotting, antígenos.

ABSTRACT

Effect of *Trypanosoma cruzi*'s maintenance condition on antigen quality for Chagas disease serological diagnosis.

In the serological diagnosis of Chagas disease total protein

(1) Laboratorio de Protozoología. Centro de Biología Molecular de Parásitos. (2) Departamento de Morfopsiopatología. Escuela de Bioanálisis. Facultad Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo.

Correspondencia: Ana Rita De Lima. E-mail: adelima@uc.edu.ve

Financiamiento: del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) a través del proyecto S1-2001000683; del Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico (CDCH-UC) a través de los proyectos FCS-97018, FCS-2003005 y FCS-2006006.

extract is mainly used from *Trypanosoma cruzi*'s epimastigotes, massive production of which involves culturing the parasite in an axenic medium. Previously, we showed changes in protein and glycoprotein profiles in the same parasite isolate when it is maintained in axenic medium LITB (culture condition) or by alternate triatomine and vertebrate passages (triatomine condition). In this work we determined the variation in the *T. cruzi* antigen composition for Chagas disease diagnosis when the parasite is maintained in the laboratory under different schemata. By electrophoresis (SDS-PAGE), the peptide and glycopeptide profiles of *T. cruzi*'s epimastigotes (EP strain) maintained under triatomine and culture conditions were characterized. Antigenic analysis with Western blot used serum from patients with Chagas disease, leishmaniasis, systemic lupus erythematosus (SLE), syphilis, toxoplasmosis and seemingly-healthy individuals. Results showed changes in protein and glycoprotein profiles from parasites maintained under different conditions. Chagasic sera recognized a greater number of antigens from culture condition; nevertheless, these antigens presented more cross reactions with leishmaniasis and SLE. The band profiles recognized by chagasic sera showed a greater heterogeneity in antigens from triatomine condition, while the antigens from culture condition showed a tendency toward a common antigen profile. Sera from patients with syphilis, toxoplasmosis and healthy individuals did not recognize antigens in any of the two maintenance conditions. These results stress the need to standardize variables for obtaining *T. cruzi* antigens for diagnostic purposes in order to ensure sensitivity and accuracy of results.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, western blot, antigens.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por un parásito protozooario denominado *Trypanosoma cruzi* y constituye un grave problema de Salud Pública en Centro y Sudamérica. Se estima entre 16 y 18 millones la población infectada y alrededor de 100 millones la población expuestas al riesgo de contraer la enfermedad (1). *T. cruzi* cumple su ciclo en la naturaleza entre dos hospedadores diferentes; un hospedador invertebrado, representado por insectos reduvídeos de la sub-Familia *Triatominae* y un hospedador vertebrado representado por mamíferos como el hombre, animales domésticos y silvestres. El parásito presenta cuatro estadios con propiedades biológicas y morfologías diferentes identificadas como epimastigotas y metacíclicos (en el triatomino), así como tripomastigotas y amastigotas (en el mamífero) (2).

Para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se utilizan métodos parasitológicos, entre los cuales los más utilizados en el laboratorio clínico son el examen de sangre al fresco, gota gruesa y extendido coloreado. A pesar de que son altamente específicos, sólo son útiles en la fase aguda de la enfermedad donde la parasitemia es elevada. En las fases indeterminada y crónica el diagnóstico suele realizarse mediante la búsqueda de anticuerpos contra el parásito. Para ello se utilizan pruebas serológicas como Reacción de Fijación del complemento, Hemaglutinación Pasiva, Reacción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes (RIAF) y ELISA.

Aún cuando se ha demostrado que las proteínas procedentes de tripomastigotas y amastigotas muestran ser mejores antígenos para la detección de anticuerpos contra el parásito (3, 4), los antígenos más comúnmente empleados para las pruebas inmunológicas son extractos proteicos totales de epimastigotas de *T. cruzi* (5, 6). Esto se debe a la mayor facilidad de obtención en el laboratorio, a un menor costo y a la presencia de antígenos de superficie comunes con los tripomastigotas (7). Sin embargo, se han obtenido resultados contradictorios mediante el empleo de antígenos totales de epimastigotas utilizando diferentes técnicas serológicas (8) y aún con una misma técnica en diferentes laboratorios, probablemente debido al uso de diferentes aislados y/o fracciones antigénicas del parásito, causando variaciones en la sensibilidad y especificidad (9). Uno de los mayores inconvenientes es la presencia de epítopes comunes entre varias especies de *Leishmania sp.* y *Trypanosoma rangeli* originando reacciones cruzadas que dificultan el diagnóstico (10, 11). Para solventar esta situación se ha propuesto el empleo de antígenos purificados (12, 13) o recombinantes (14, 15, 16) con el inconveniente de aumentar los costos de producción e incrementar la especificidad a expensas de una menor sensibilidad, ya que se reduce la oferta antigénica frente a sueros de pacientes que muestran un repertorio heterogéneo de anticuerpos contra el parásito.

Para la obtención masiva de epimastigotas como fuente de antígeno se dispone de medios de cultivo axénico que simulan las condiciones presentes en el estómago del insecto, donde el más ampliamente utilizado está representado por el medio LIT (17). Existen tres esquemas de mantenimiento de *T. cruzi* en el laboratorio: a) condición vertebrado/invertebrado, que simula el ciclo del parásito en la naturaleza; b) condición vertebrado, que elimina el paso del parásito a través del vector; y c) condición cultivo o artificial en medio axénico que obvia el pasaje del parásito de sus hospedadores (18, 19, 20). Se han demostrado cambios en la virulencia (20) y expresión génica (21) en un mismo aislado de *T. cruzi* mantenido bajo diferentes esquemas en el laboratorio.

Habiéndose demostrado que el cultivo prolongado de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico provoca cambios en los perfiles peptídico y glicopeptídico de *Trypanosoma cruzi* (22), y a la existencia de resultados discordantes entre diferentes laboratorios aún usando un mismo aislado, en el presente trabajo se compara la calidad antigénica de un misma cepa del parásito mantenida bajo esquemas diferentes en el laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos y condiciones de mantenimiento: se empleó la cepa humana Elpidio Padrón (EP) aislada de un paciente en fase aguda de la enfermedad de Chagas. Este aislado se ha mantenido en el laboratorio durante 23 años mediante pases alternos trimestrales entre triatomino y ratón albino (condición triatomino) o durante repiques semanales continuos durante 15 años en medio LITB sin pases por vector ni vertebrado (condición cultivo) (20, 23). Para la producción masiva de epimastigotas, los parásitos de la condición triatomino tenían no más de dos meses de cultivo en medio LITB.

Sueros de pacientes; se dividieron en cuatro grupos:

Grupo I: compuesto por 24 muestras de sueros de pacientes chagásicos crónicos provenientes del Laboratorio Regional de Apoyo Epidemiológico del Estado Cojedes y ocho (8) muestras procedentes del Banco de Sangre Dr. Lorenzo Hands del

Municipio Valencia (Estado Carabobo). Todas las muestras fueron consideradas positivas mediante las técnicas serológicas RIAF y ELISA.

Grupo II: compuesto por 12 muestras de suero de pacientes con leishmaniasis visceral y ocho (8) muestras con leishmaniasis cutánea, todas confirmadas mediante la técnica de ELISA e inmunobloting. Estos sueros fueron donados por el Departamento de Parasitología-Valencia y el Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED) de la Universidad de Carabobo.

Grupo III: compuesto por muestras confirmadas mediante serología de 12 pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), tres pacientes con toxoplasmosis y tres pacientes con sífilis que asistieron a la Unidad Regional de Inmunología Clínica de la Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera.

Grupo IV: constituido por 15 muestras de individuos aparentemente sanos procedentes de áreas no endémicas para la enfermedad de Chagas y que resultaron negativos a pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (RIAF y ELISA).

Obtención de extractos proteicos totales de epimastigotas de *T. cruzi*: Formas epimastigotas de *T. cruzi* mantenidas bajo las condiciones triatomino y cultivo crecidos en medio LITB se sedimentaron (12.000 xg, 4° C, 3 min) y lavaron dos veces con PBS. Se estimaron las masas en tubos Eppendorf previamente pesados y se conservaron a -70° C hasta su uso. Masas húmedas de peso conocido fueron sometidas a lisis hipotónica en agua suplementada con una mezcla de inhibidores de proteasas [*trans*-epoxy succinil-L-leucilamido-4-guanidino-butano (E-64) 10 µM, Nα-p-tosil-L-cloro lisina-metil cetona (TLCK) 100 µM, N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) 100 µM, antipaina 50 mg/dl] en una relación de 200 mg parásitos/ml solución de lisis. Las masas resuspendidas se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación (-20° C/37° C), alternando con agitación en vortex de 3 min a temperatura ambiente. Los lisados se sedimentaron a 12.000 xg durante 10 min a 4° C, los sobrenadantes se suplementaron a 150 mM NaCl (4). La concentración proteica se determinó mediante Coomassie Plus-200 (Pierce, Rockford) respecto a patrones de seroalbúmina bovina, según protocolo del fabricante.

Análisis electroforético de las proteínas y glicoproteínas: se analizaron mediante electroforesis desnaturante en geles SDS-poliacrilamida al 10% (24) colocando 10 y 8 µg de proteínas y glicoproteínas, respectivamente. La movilidad relativa de los polipéptidos se estimó respecto a estándares proteicos (Sigma, M4038) colocados en el mismo gel. Adicionalmente, en el gel de glicoproteínas se incluyó un "pool" de marcadores de referencia para carbohidratos, conformado por 1 µg de las siguientes glicoproteínas purificadas: condroitín sulfato (Sigma, C-4384), mucina (Sigma, M-3895), α₁-glicoproteína (Sigma, G-2882) y fetuína (Sigma, F-3004). La electroforesis se desarrolló a corriente constante (10 mAmp) y los geles fueron revelados con Coomassie-Plata para proteínas (25) ó Acido periódico-Alcian Blue-Glutaraldehído-Plata (APABGP) para glicoproteínas (4).

Análisis antigénico mediante inmunobloting. Proteínas procedentes de epimastigotas (condiciones triatomino y cultivo) se separaron mediante electroforesis bajo condiciones reductoras en mini-geles de poliacrilamida al 10% con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) (24), empleando un peine

preparativo con un solo canal y colocando 64 μ g por gel. Seguidamente se hizo electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (26), las cuales fueron bloqueadas con leche descremada y se incubaron toda la noche a 4° C en un aparato multiscreen (BIORAD) con sueros de pacientes chagásicos (grupo I), pacientes con leishmaniasis (grupo II), con otras patologías (grupo III) o individuos aparentemente sanos (grupo IV) (diluciones 1/250 a 1/1000). Se usó como anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugada a peroxidasa (dilución 1/2000). Los inmunocomplejos fueron revelados mediante quimioluminiscencia empleando como sustrato luminol (Super Signal, Pierce) según indicaciones del fabricante.

RESULTADOS

Perfiles peptídico y glicopeptídico de epimastigotas de *T. cruzi* mantenido bajo diferentes condiciones de mantenimiento: con el propósito de analizar la oferta antigénica de los epimastigotas utilizados en el ensayo de inmunoblotting, la Figura 1A muestra el perfil peptídico de los epimastigotas del aislado humano EP mantenido en el laboratorio bajo las condiciones triatomino (canal T) y cultivo (canal C). Los parásitos de la condición triatomino se caracterizan por un perfil peptídico complejo, constituido por múltiples bandas, 19 de ellas ubicadas entre los marcadores de 14.2 y 205 kDa. Se destacan seis bandas de gran intensidad (56, 49, 35 y la tripleta 22/19/15 kDa), cuatro de mediana intensidad (64, 57, 29 y 23 kDa) y 10 de ellas débilmente coloreadas (205, 127, 105, 62, 61, 59, 51, 41, 32 y 26 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal T). Cuando este perfil se compara con el obtenido para los parásitos de la condición cultivo, se aprecia una alta similitud, siendo las diferencias más relevantes la presencia de tres bandas (66, 37 y 35 kDa, triángulos claros a la izquierda del canal C) ausente en la condición triatomino, así como la presencia de una banda de 51 kDa (triángulo claro a la derecha del canal T) ausente en la condición cultivo.

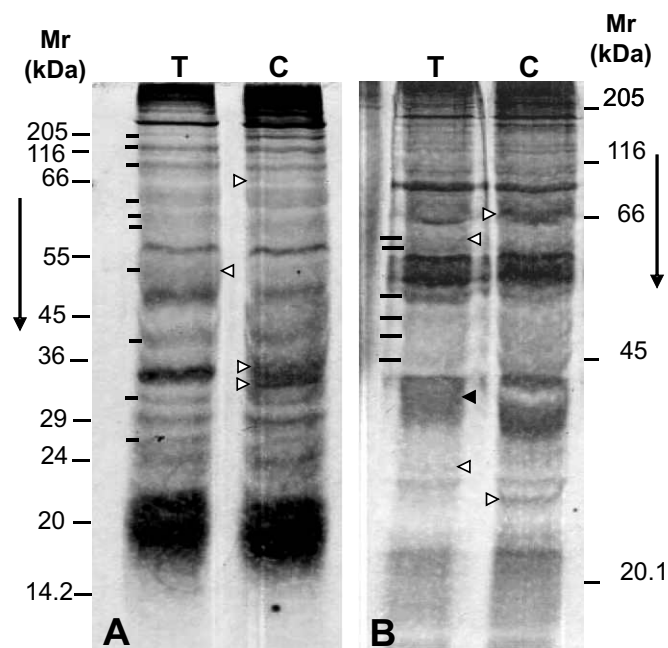


Figura 1: Perfil peptídico (panel A) y glicopeptídico (panel B) en gel SDS-poliacrilamida al 10% de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (EP). Los canales T y C corresponden a parásitos mantenidos bajo las condiciones triatomino y cultivo, respectivamente. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en Kilodaltons (kDa).

Cuando se analizó el perfil glicopeptídico bajo las mismas condiciones se identificaron al menos 25 bandas. En la condición triatomino destacan seis de ellas dominantes (tripleto 60/58/56 y 38/36/34 kDa), así como otras de mediana intensidad (63, 61, 53, 51, 48 y 46 kDa) (trazos cortos a la izquierda del canal T, Figura 1B). Cuando se comparan con los parásitos mantenidos en la condición cultivo (canal C) se aprecia una alta similitud, siendo las diferencias más relevantes la presencia de dos glicopéptidos (66 y 25 kDa, triángulos claros a la izquierda del canal C) ausente en la condición triatomino. Así como la presencia de dos glicopéptidos (63 y 35 kDa, triángulos claros a la derecha del canal T) ausente en la condición cultivo. Es de destacar la ausencia del glicopéptido dominante de 36 kDa (triángulo oscuro, a la derecha del canal T) en los epimastigotas procedentes de parásitos mantenidos en cultivo.

Detección inmunológica de antígenos de un mismo aislado de *T. cruzi* mantenido bajo diferentes condiciones de mantenimiento empleando sueros de pacientes chagásicos: la Figura 2A muestra a manera de ilustración algunos de los resultados obtenidos con sueros de pacientes chagásicos cuando fueron analizados mediante inmunoblotting empleando antígenos de parásitos procedentes de la condición cultivo. Se aprecia una alta heterogeneidad en el patrón de reconocimiento exhibido por los diferentes pacientes, donde sólo 8 de los 14 sueros mostrados fueron capaces de reconocer antígenos de *T. cruzi*. El perfil más complejo lo mostró el canal 1, el cual está caracterizado por al menos 18 antígenos; 11 de mayor intensidad (dupleta 66/64, 55, 51, 49, 45, dupleta 37/35, dupleta 33/32 y 26 kDa) (Figura 2A), cinco de menor intensidad (205, 195, 140, 136 y 100 kDa) y dos bandas muy tenues (20 y 18 kDa, panel A). El patrón antigénico más simple corresponde a los canales 7 y 9 en los cuales se identifican apenas dos antígenos, uno común de 32 kDa (triángulos claros a la izquierda de ambos canales) y dos de diferentes masas moleculares de 26 kDa (trazos cortos a la izquierda del canal 7) y de 20 kDa (trazos cortos a la izquierda del canal 9). Los sueros de los canales 6, 8 y 13 (diluídos 1/500), así como los canales 2, 4 y 14 (diluídos 1/250) no reaccionaron con los antígenos ofrecidos por parásitos de la condición triatomino.

Cuando los mismos sueros y a las mismas diluciones se pusieron en contacto con antígenos procedentes de la condición cultivo, se observa un mayor reconocimiento de antígenos y aún cuando existe diferencias entre los perfiles antigénicos de los diferentes pacientes, éstos tienden a mostrar un mayor porcentaje de similitud respecto a la condición triatomino (Figura 2B). El perfil antigénico más complejo corresponde al canal 3, con al menos 16 bandas antigénicas; ocho de ellas con mayor intensidad (195, 170, 140, 124, 110, 90, 66 y 64 kDa) y las ocho bandas restantes como antígenos de diferentes intensidades (55, 51, 39, 33, 30, 29, 26 y 22 kDa). El perfil antigénico más simple corresponde nuevamente al canal 7 presentando una banda única de 64 kDa (triángulo claro a la derecha del canal 7).

Cuando se compararon parásitos mantenidos por pases alternos chipo-ratón (triatomino) respecto a los mantenidos sólo en medio axénico (cultivo) como oferta antigénica a ser revelada por los mismos sueros de pacientes chagásicos (paneles A y B) no se encontró identidad entre los perfiles antigénicos revelados por cada suero mostrando algunos antígenos comunes a ambos parásitos (35, 33 y 26 kDa) y antígenos diferentes representados por bandas de diferente movilidad e intensidad. En algunos pacientes, la dilución de los

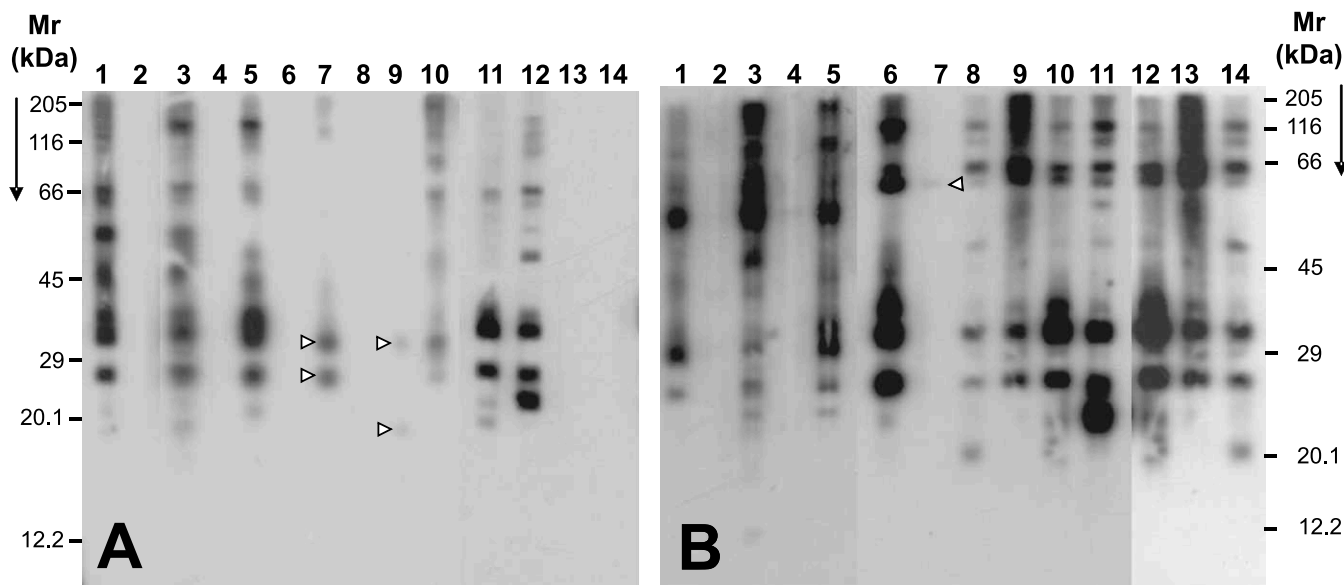


Figura 2. Análisis mediante inmunoblotting de sueros de pacientes chagásicos crónicos empleando antígenos de epimastigotas de *T. cruzi* (EP) mantenidos bajo las condiciones triatomino (**panel A**) y cultivo (**panel B**) revelados mediante luminografía empleando anti-IgG humano conjugado a peroxidasa. Las diluciones de los sueros corresponden a 1/250 (canales 2, 4, 9 y 14) y 1/500 (canales 1, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 y 13). Mr indica la Movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en Kilodaltons (kDa).

sueros afectó la capacidad discriminante (resultados no mostrados). Los sueros de los canales 2 y 4 no reconocieron antígenos en las condiciones triatomino y cultivo aún a una dilución de 1/250 (paneles A y B). En contraste, los sueros de los canales 6, 8, 13 y 14 que no habían reconocido antígenos en la condición triatomino, fueron capaces de reaccionar con antígenos de la condición cultivo a las mismas diluciones empleadas previamente.

Detección inmunológica de antígenos de *T. cruzi* mantenido bajo las condiciones triatomino y cultivo empleando sueros de individuos aparentemente sanos pacientes y con otras patologías: para determinar la especificidad de los antígenos empleados en el presente estudio, se ensayaron los antígenos de ambas condiciones empleando sueros de individuos aparentemente sanos, así como de pacientes con enfermedades infecciosas y otras patologías que suelen dar reacciones cruzadas con la enfermedad de Chagas. En el caso de individuos aparentemente sanos no se detectaron bandas con antígenos de las condiciones triatomino y cultivo. Así como en el caso de pacientes con toxoplasmosis y sífilis (resultados no mostrados). Empleando antígenos de la condición triatomino, se observó que cinco de los 20 pacientes con leishmaniasis mostraron reconocimiento de antígenos, con identificación de 16 bandas (145, 127, 105, 95, 66, 60, 59, 57, 54, 47, 41, 37, 32, 29, 26 y 24 kDa). En el caso de LES, sólo dos de los 12 pacientes mostraron reconocimiento de los antígenos de 18 kDa, 180 y 160 kDa (resultados no mostrados).

Cuando estos mismos sueros se analizaron empleando proteínas procedentes de la condición cultivo, se observa reconocimiento de antígenos en todos los casos, especialmente los pacientes con leishmaniasis que muestran un perfil comparable a pacientes chagásicos, con reconocimiento de las bandas de 127, 66, 64, 61, 54, 46, 45, 39, 32 y 28 kDa. De la misma forma, cuatro de los cinco pacientes con LES revelaron antígenos de diferentes movilidades ubicados entre los marcadores de 205 y 14.2 kDa (resultados no mostrados), con detección de 6 bandas (97, 64, 57, 47, 41, 39 y 20 kDa).

Tabla I: Porcentaje de reconocimiento mediante inmunoblotting de antígenos inmunodominantes de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* mantenidos en el laboratorio bajo las condiciones triatomino (T) y cultivo (C) empleando sueros de los grupos I, II y III.

Antígeno (kDa)	Grupo I ⁽¹⁾		Grupo II ⁽²⁾		Grupo III ⁽³⁾	
	T ⁽⁴⁾ (%)	C ⁽⁵⁾ (%)	T ⁽⁴⁾ (%)	C ⁽⁵⁾ (%)	T ⁽⁴⁾ (%)	C ⁽⁵⁾ (%)
205	15,6	53,1	0,00	0,00	0,00	0,00
195	31,3	40,6	0,00	0,00	0,00	0,00
170	28,1	56,3	0,00	0,00	8,3	0,00
140	37,5	50,0	0,00	0,00	0,00	8,3
127	0,00	34,4	40,0	40,0	0,00	0,00
122	6,3	46,9	0,00	20,0	0,00	0,00
110	15,6	62,5	0,00	0,00	0,00	0,00
90	12,5	56,3	20,0	0,00	0,00	0,00
66	46,9	81,3	20,0	40,0	0,00	0,00
64	46,9	71,9	0,00	60,0	0,00	33,3
61	0,00	18,8	0,00	60,0	0,00	8,3
55	31,3	37,5	0,00	0,00	0,00	8,3
54	0,00	0,00	40,0	40,0	0,00	8,3
51	15,6	53,1	0,00	20,0	0,00	0,00
49	21,9	37,5	0,00	0,00	0,00	0,00
47	0,00	0,00	40,0	0,00	0,00	16,7
46	0,00	0,00	0,00	80,0	0,00	0,00
45	43,8	56,3	0,00	60,0	0,00	0,00
41	37,5	43,8	20,0	0,00	0,00	10
39	0,00	28,1	0,00	60,0	0,00	16,7
37	43,8	37,5	20,0	0,00	0,00	0,00
35	59,4	56,3	0,00	0,00	0,00	0,00
33	59,4	59,4	0,00	0,00	0,00	0,00
32	68,8	68,8	20,0	100,0	0,00	75,0
30	12,5	59,4	0,00	0,00	0,00	0,00
29	34,4	65,6	20,0	0,00	0,00	0,00
28	37,5	28,1	20,0	60,0	0,00	33,3
26	53,1	62,5	20,0	0,00	0,00	8,3
20	9,4	0,00	0,00	60,0	0,00	58,3
18	0,00	0,00	0,00	0,00	8,3	41,7
17	0,00	0,00	0,00	40,0	0,00	0,00
16	0,00	0,00	20,0	60,0	0,00	33,3

(1) Pacientes chagásicos crónicos; (2) Pacientes con leishmaniasis cutánea y visceral; (3) pacientes con LES; (4) Parásitos mantenidos mediante pases alternos triatomino/ratón; (5) Parásitos mantenidos mediante cultivo prolongado en medio LITB.

Comparación de los antígenos procedentes de las condiciones triatomino y cultivo: los sueros de pacientes chagásicos reconocieron 32 antígenos, 26 de ellos comunes a las condiciones triatomino y cultivo (205, 195, 170, 140, 122, 110, 90, 66, 64, 55, 51, 49, 45, 41, 37, 35, 33, 32, 30, 29, 28, 26, 23, 22, 21 y 19 kDa), dos presentes sólo en la condición cultivo (24 y 20 kDa) y cuatro específicos de la condición triatomino (127, 61, 39 y 15 kDa).

La Tabla I muestra los resultados obtenidos con los antígenos que presentaron mayores porcentajes de reconocimiento mediante la técnica de inmunobloting con la totalidad de las muestras de suero (grupos I, II, III) empleando antígenos procedentes de ambas condiciones de mantenimiento. En sueros de pacientes chagásicos (grupo I) existe un mayor porcentaje de reconocimiento de un mismo antígeno expresado por parásitos de la condición cultivo respecto a triatomino. No obstante, en antígenos de la condición cultivo se detecta un mayor porcentaje de reconocimiento con sueros de pacientes con patologías que muestran reacciones cruzadas con Enfermedad de Chagas (grupos II y III). En efecto, se pueden identificar ocho antígenos de la condición cultivo que muestran reacciones cruzadas tanto con leishmaniasis (127, 66, 64, 61, 45, 39, 32 y 28 kDa) como LES (140, 64, 61, 55, 41, 39, 32 y 28 kDa). Por otra parte, se identificaron antígenos que mostraron un alto porcentaje de reconocimiento por parte de sueros de pacientes chagásicos indistintamente de la condición de mantenimiento, pero sin mostrar reacciones cruzadas con otras patologías (195, 49, 35 y 33 kDa).

DISCUSIÓN

En este trabajo se muestran evidencias en las cuales se indican que las condiciones de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* en el laboratorio modifican los perfiles peptídico, glicopeptídico y antigénico del parásito, con importantes consecuencias en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas.

El análisis de la composición de proteínas y glicoproteínas mostró diferencias tanto cualitativas como cuantitativas, resaltando la importancia del esquema de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* en la obtención de proteínas del parásito para estudios bioquímicos, enzimáticos y diagnósticos. Esto se explica por el hecho de que *T. cruzi* circula en la naturaleza como una mezcla de subpoblaciones y donde el cultivo del parásito actúa como un filtro biológico, permitiendo el enriquecimiento de una determinada población que expresa un determinado fenotipo (27). Sin embargo, también se ha observado cambios en los perfiles peptídico y glicopeptídico asociado a las condiciones de mantenimiento en parásitos que son genéticamente homogéneos como el clon Dm30L (22), sugiriendo que la condición de mantenimiento es capaz de afectar la expresión génica del parásito, con posibles implicaciones en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Nuestros resultados indican que los sueros de pacientes chagásicos reconocieron perfiles antigénicos diferentes en parásitos mantenidos bajo una misma condición, particularmente en la condición triatomino (Figura 2A). Esto puede ser consecuencia de la constitución antigénica del aislado de *T. cruzi* y de la respuesta inmune del individuo frente a una misma oferta antigénica (28, 29). Sin embargo, al comparar los resultados del inmunobloting de una misma muestra de suero frente a antígenos procedentes de ambas condiciones de mantenimiento, se observó reconocimiento de mayor número de bandas, así como mayor intensidad de aquellas comunes cuando el antígeno procedía de parásitos

mantenidos bajo la condición cultivo. La mayor intensidad en el reconocimiento de antígenos con igual peso molecular podría explicarse en base a una mayor cantidad de epítopes en péptidos de la condición cultivo que permitirían el enlace de un mayor número de anticuerpos.

Previamente demostramos cambios en el perfil antigénico reconocido por un "pool" o mezcla de sueros de pacientes chagásicos empleando diferentes aislados de *T. cruzi* mantenido bajo las condiciones triatomino y cultivo. Mientras que pudo identificarse diferentes perfiles en la condición triatomino entre ambos aislados, en la condición cultivo no sólo hubo un mayor reconocimiento, sino también un perfil antigénico común independientemente del aislado empleado (manuscrito en preparación). Esto sugiere que el mantenimiento prolongado de *Trypanosoma cruzi* en medio LITB conduce a una homogeneidad en el mosaico antigénico ofrecido en técnicas diagnósticas, obviando diferencias asociadas a la procedencia del parásito.

En este trabajo se demuestra que sueros de pacientes con otras patologías también presentaron mayor reconocimiento de antígenos procedentes de la condición cultivo. Los sueros de pacientes con leishmaniasis presentaron reconocimiento de 16 bandas comunes a sueros de pacientes chagásicos (127, 122, 90, 66, 64, 61, 51, 45, 41, 39, 37, 32, 29, 28, 26 y 20 kDa) en su mayoría presentes antígenos de la condición cultivo. Estos resultados coinciden con evidencias previas mostrando la existencia de antígenos comunes (124, 107, 92, 65-60, 59 y 32 kDa) entre *Leishmania sp.* y *T. cruzi* (30, 31). Esto se explica en base a la existencia de epítopes comunes entre *T. cruzi* y *Leishmania sp.*

La existencia de un mayor porcentaje de reconocimiento de antígenos de reacción cruzada (127, 66, 64, 45 y 32 kDa) en parásitos de la condición cultivo respecto a la condición triatomino (Tabla I, grupos II y III) hacen de ésta última condición una fuente de antígenos de mejor calidad con fines diagnósticos de la enfermedad de Chagas. Dentro de las bandas que fueron reconocidas en forma específica por sueros de pacientes chagásicos figuran las de 205, 195, 170, 140, 110, 55, 49, 35, 33 y 30 kDa, en su mayoría presentes en tanto en las condiciones triatomino como cultivo. Tomando en cuenta lo anteriormente expresado, el suero del paciente 7 (canal 7, Figuras 2A y 2B) previamente clasificado como chagásico mediante la ejecución de técnicas serológicas como RIAF y ELISA (resultados no mostrados) corresponden a un paciente falso positivo, ya que las bandas de 64, 32 y 26 kDa corresponden a reacciones cruzadas con leishmaniasis. Por su parte, el suero del paciente 9, que sólo reconoció dos antígenos inespecíficos en la condición triatomino (canal 9, Figura 2A) podría considerarse erróneamente como un falso positivo, ya que reconoció ocho bandas en la condición cultivo (205, 116, 127, 66, 64, 61, 32 y 26 kDa) las cuales también comparten reacciones cruzadas con leishmaniasis.

Puede apreciarse que los sueros de pacientes con LES mostraron un 75% de reconocimiento de una banda de 32 kDa (Tabla I, grupo III) en antígenos procedentes de parásitos mantenidos en cultivo. Esta reacción cruzada con sueros de pacientes chagásicos (Tabla I, Grupo I) obedece a la existencia de anticuerpos dirigidos contra el extremo C-terminal de la proteína ribosomal ácida de *T. cruzi* (32). Esta proteína del parásito comparte un 90% de similitud en la secuencia de aminoácidos con su homóloga en humanos, siendo ésta última el principal blanco de los auto anticuerpos producidos en individuos con LES (33). Estos hechos confirman la eficacia de

la técnica de inmunobloting no sólo como prueba confirmatoria, sino también de utilidad en la evaluación de antígenos a ser empleados en otras técnicas serológicas.

Es conocido que la gran mayoría de los laboratorios no disponen de la infraestructura necesaria para simular la condición natural del ciclo vital de *T. cruzi* en la naturaleza, y la mayoría de los antígenos totales y purificados utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas proceden de epimastigotas cultivados en forma artificial en el laboratorio. Si bien los antígenos de la condición cultivo muestran una mayor sensibilidad y homogeneidad entre parásitos de diferentes cepas, en este trabajo se demuestra por primera vez que los antígenos de parásitos mantenidos por largo tiempo en cultivo tienen mayor posibilidad de reacciones cruzadas con otras patologías. Adicionalmente estos resultados indican que la condición de mantenimiento triatomino preserva la composición antigénica propia del parásito. El hecho de que antígenos procedentes de la condición triatomino sean reconocidos como específicos e inmunodominantes hacen de ellos una mejor oferta para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Todos estos hallazgos resaltan la importancia de evaluar parámetros como condición de mantenimiento, composición del medio de cultivo, entre otros, a la hora de seleccionar antígenos útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elizabeth Ferrer (BIOMED) y Lic. Carolina Cannova (Departamento de Parasitología) por el suministro de los sueros de pacientes con leishmaniasis. A la TSU Rosa Yanet Arteaga por el cultivo de los parásitos. Se destaca el apoyo técnico del Sr. Willmer Pineda, Johny Albanesse y el apoyo administrativo del Lic. Gregorio Flores.

BIBLIOGRAFÍA

- Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol* 2006; 100:663-677.
- Tyler K, Engman D. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001; 131:472-481.
- Primavera KS, Umezawa E, Pérez BA, Camargo ME, Hoshino-Shimizu S. Chaga's disease: IgA, IgM and IgG antibodies to *Trypanosoma cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1990; 32:172-180.
- De Lima AR, Farías MN, Tortolero E, Navarro MC, Contreras VT. Purificación parcial y empleo de fracciones glicosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Acta Cientif Venezol* 2001; 52:235-247.
- Bucio MI, Cabrera M, Segura EL, Zenteno E, Salazar-Schettino M. Identification of immunodominant antigens in Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Invest* 1999; 28:257-268.
- Sánchez B, Monteón V, Reyes PA, Espinoza B. Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western Blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from mexican strains as antigens. *Arch Med Res* 2001; 32:382-388
- Kloetzel J, Camargo ME, Giovannini VL. Antigenic differences among epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool* 1975; 22:259-261.
- Schechter M, Nogueira N. Variations induced by different methodologies in *Trypanosoma cruzi* surface antigen profiles. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 29:37-46.
- Sáez-Alquezar A, Luquetti AO, Borges-Pereira J, Moreira EF, Gadahela M, Garcia Zapata MT, Strugo Arruda AH. Estudio multicéntrico: validação do desempenho de conjuntos diagnósticos de hemaglutinação indirecta disponíveis no Brasil para diagnóstico serológico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Patol Trop* 1997; 26:343-374.
- Saldana A, Souza OE. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol* 1996; 82:363-366.
- Vexenat AC, Santana JM, Teixeira ARL. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Inst Med Trop São Paulo* 1996; 38:177-185.
- Solana ME, Katzin AM, Umezawa ES, Miatello CS. High specificity of *Trypanosoma cruzi* epimastigote ribonucleoprotein as antigen in serodiagnosis of Chagas disease. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1456-1460.
- Marcipar IS, Welchen E, Roodveldt C, Marcipar J, Silber AM. 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 Microbiol Lett* 2003; 220:149-154.
- Umezawa ES, Bastos S, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1554-1560.
- Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, Gonzalez A, Rangel-Aldao R, et al. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion* 2003; 43:91-97.
- Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* 2001; 17:286-291.
- Castellani O, Riveiro L, Fernandes J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J Protozool* 1967; 14:447-451.
- García ES, Vieira E, Gonçalves AM, Morel CM. A strain of *Trypanosoma cruzi* and its biochemical characterization after passage through different invertebrate hosts. *Ann Trop Med Parasitol* 1986; 80:361-363.
- Carneiro M, Chiari E, Goncalves AM, da Silva Pereira AA, Morel CM, Romanha AJ. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Tropica* 1990; 47:35-45.
- Contreras VT, Araque W, Delgado V. *Trypanosoma cruzi*: metacyclogenesis in vitro. I. Changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89:253-259.
- Contreras VT, De Lima AR, Zorrilla G. *Trypanosoma cruzi*: Maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93:753-760.

22. Araque W, De Lima AR, Flores G, Garboza R, Arteaga R, Delgado V, et al. Efecto del cultivo axénico sobre las glicoproteínas de *Trypanosoma cruzi*. Acta Cientif Venezol 1996; 47:211.
23. Goitia-Aular M, Boiso JF. Cultivo de *Trypanosoma cruzi* (cepa Elpidio Padrón) en un medio semidefinido. Efecto de algunas variaciones en la composición y condiciones del mismo. Acta Cientif Venezol 1982; 33:488-496.
24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227:680-685.
25. De Moreno MR, Smith JF, Smith RV. Silver staining of proteins in polyacrilamide gels: increased sensitivity through a combined blue-silver stain procedure. Anal Biochem 1985; 151:466-470.
26. Towbin H, Stachelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 79:4350-4354.
27. Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98:1-12.
28. Gazzinelli RT, Leme VM, Cancado JR, Gazzinelli G, Scharfstein J. Identification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T cells and immune sera from patients with Chagas' disease. Infect Immun 1990; 58:1437-1444.
29. O'Daly JA, Carrasco H, Fernandez V, Rodríguez MB. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Acta Tropica 1994; 56:265-87.
30. Malchiodi EL, Chiaramonte MG, Taranto NJ, Zwirner NW, Margni RA. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp*; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen. Clin Exp Immunol 1994; 97:417-423.
31. Chiaramonte MG, Zwirner NW, Caropresi SL, Taranto NJ, Machioldi EL. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp* human mixed infection. Am J Trop Med Hyg 1996; 54:271-273.
32. Levin M, Mesri E, Benarous R, Levitus G, Schijman A, Levy-Yeyati P, et al. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas hearth disease. Am J Trop Med Hyg 1989; 41:530-538.
33. Mahler M, Kessenbrock K, Raats J, Williams R, Fritzler MJ, Blüthner M. Characterization of the human autoimmune response to the major C-terminal epitope of the ribosomal P proteins. J Mol Med 2003; 81:194-204.