



# Efecto de antígenos de epimastigota de *Trypanosoma cruzi* obtenidos a diferentes tiempos de incubación sobre anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*.

Effect of antigens of *Trypanosoma cruzi* epimastigote obtained at different times of incubation on antibodies produced in *Oryctolagus cuniculus*

Meily Mezarina-Sánchez<sup>1</sup>, Greicy Valdera-Torres<sup>1</sup>, Fernanda Vásquez-Miranda<sup>1</sup>, Nelida Velezmoro-Casanova<sup>1</sup>, Yolanda Vértiz-Vereau<sup>1</sup>, Hermes Escalante-Añorga<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escuela AP de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo (UNT), Trujillo, Perú.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, UNT.

## RESUMEN

La técnica de Western blot es usada para confirmar el diagnóstico de diversas enfermedades parasitarias y está siendo estandarizada para la Enfermedad de Chagas, por ello es necesario resolver algunas interrogantes que permitan su mejor aplicación. Una de ellas es, cuál es el efecto de antígenos de excreción-secreción de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa C1 aislada de *Triatoma infestans* de Arequipa (Perú) obtenidos a seis y 18 horas de incubación, sobre anticuerpos producidos en conejo, *Oryctolagus cuniculus*, mediante la técnica de Western blot. Para ello, se emplearon sueros de conejos inmunizados con preparaciones antigénicas obtenidas a las seis y 18 horas de incubación en medio mínimo esencial (MEM-Eagle Difco), analizándose su reactividad mediante la técnica de Western blot. Se evidenció la presencia de seis bandas reactivas cuando se usaron los antígenos obtenidos a las seis horas de incubación y 15, cuando se usaron los antígenos obtenidos a las 18 horas, estas últimas, además, muestran mejor reactividad. En conclusión, a menor tiempo de incubación se producen menor número de antígenos de excreción-secreción detectados por la técnica de Western blot.

**Palabras clave:** Western blot, epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, *Oryctolagus cuniculus*

## ABSTRACT

The Western blot is used to confirm the diagnosis of various parasitic diseases and is being standardized for Chagas disease, so it is necessary to resolve some questions that enable improved implementation. One is, what is the effect of excretory-secretory antigens of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* strain isolated from *Triatoma infestans* C1 of Arequipa (Peru) obtained six and 18 hours of incubation on antibody produced in rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, by Western blot technique. For this purpose, sera of rabbits immunized with antigenic preparations obtained at six and 18 hours of incubation in minimal essential medium (MEM-Eagle Difco), analyzed for reactivity by Western blot technique was used. The presence of six and 15 reactive bands were revealed when the antigens was obtained at six and 18 hours of incubation, respectively, the latter group of bands also show better reactivity. In conclusion, shorter incubation fewer excretory-secretory antigens detected by Western blot occur.

**Keywords:** Western blot, epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*, *Oryctolagus cuniculus*

## INTRODUCCIÓN

Endémica en 18 países de América Latina, la enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, que puede transmitirse por triatominos, transfusiones de sangre, accidentes de laboratorio, trasplante de órganos o de modo vertical<sup>1,2</sup>. En 2008, la Organización Mundial de la Salud La Salud (OMS) estimó que alrededor de ocho millones de personas fueron infectados de los cuales aproximadamente 11 000 mueren por año<sup>3</sup>. En el Perú, la mayoría de casos se presentan en la zona sur y nororiente, sin embargo, el parásito se encuentra distribuido en casi todos los departamentos<sup>4,5,6</sup>

A pesar de décadas de esfuerzos, todavía no existe una prueba gold standar para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y varias organizaciones internacionales han subrayado recientemente la necesidad de mejorar las pruebas de diagnóstico serológico<sup>7</sup>. Para este fin, muchos grupos de investigación han desarrollado una gama de ensayos serológicos utilizando como métodos, en la mayoría de casos, a la inmunofluorescencia indirecta (IFA), hemaglutinación indirecta (HAI) y ELISA; los antígenos utilizados en estos últimos ensayos han incluido parásitos completos, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes y antígenos de excreción-secreción de tripomastigotas (TESA), de los cuales los últimos han mostrado ser de promisoría eficacia cuando se usa la técnica de Western blot; desafortunadamente, la producción de antígeno TESA requiere de sofisticadas instalaciones para cultivos celulares o medios de cultivo no disponibles en la mayoría de laboratorios<sup>8,9,10,11</sup>.

Sin embargo, una alternativa es la obtención y uso de antígenos de los epimastigotas que, como se sabe, son formas evolutivas de *T. cruzi* que han sido clásicamente cultivados en medios a base de sangre con relativa sencillez, de modo que constituyen una buena fuente de anígenos; en efecto, estos han sido probados utilizando el ELISA<sup>12,13,14</sup>, pero no el de Westen blot que, a diferencia del anterior, es más específico.

La presente investigación estuvo orientada a determinar el efecto en la producción de anticuerpos en conejo, *Oryctolagus cuniculus*, inmunizados experimentalmente con proteínas de excreción-secreción de epimastigotas de la cepa C2 de *Trypanosoma cruzi* aisladas de *Triatoma infestans* en la ciudad de Arequipa, obtenidas a dos tiempos diferentes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Parásitos:

En el estudio se utilizó una población de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, denominada C1, obtenida de *Triatoma infestans* recolectada en el valle de Vitor (Arequipa Perú) y mantenida por cultivos sucesivos en medio 3N<sup>6</sup>

### Proteínas de excreción-secreción<sup>8,11</sup>

Las formas epimastigotes C1 de *T. cruzi* fueron cultivadas en 20 tubos de 25x150mm, estériles, con medio bifásico constituido por BHI, fase sólida (10mL), y PYLB fase líquida (7mL). La siembra se hizo a partir de dos tubos procedentes del mantenimiento de la cepa, a razón de 0.5 mL por tubo. Cumplidas 140 horas, se centrifugaron a 4000 rpm por 5 min y se descartaron los sobrenadantes. Posteriormente, fueron cultivados en Eagle's Minimum Essential Medium SIGMA® (MEM), luego, se centrifugaron nuevamente por 5 minutos. La biomasa de tripomastigotes reagrupados fueron traspasados a un solo tubo de 13x100mm, nuevo y estéril, provisto con tapón de jebes estéril, con Minimum Essential Medium Eagle (MEM) en proporción 1:3 y aditivado con Penicilina G sódica 1 000 000 UI (0.5 mL/100mL) y Gentamicina 160 mg (0.25mL/100mL), a 37°C, separadamente, por seis y 18 horas. Cumplido el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 4000 rpm por 5 min para separar los antígenos de excreción-secreción producidos, presentes en el sobrenadante, los cuales fueron almacenados en tubos Eppendorf a -20°C debidamente rotulados. Según disponibilidad, previamente se añadieron inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford

### Sueros

0.5 mL de las proteínas de excreción-secreción fueron inoculados, por la vía intramuescular, a ejemplares de conejo, *Oryctolagus cuniculus*, de raza neozelandesa, machos, de dos meses de edad en

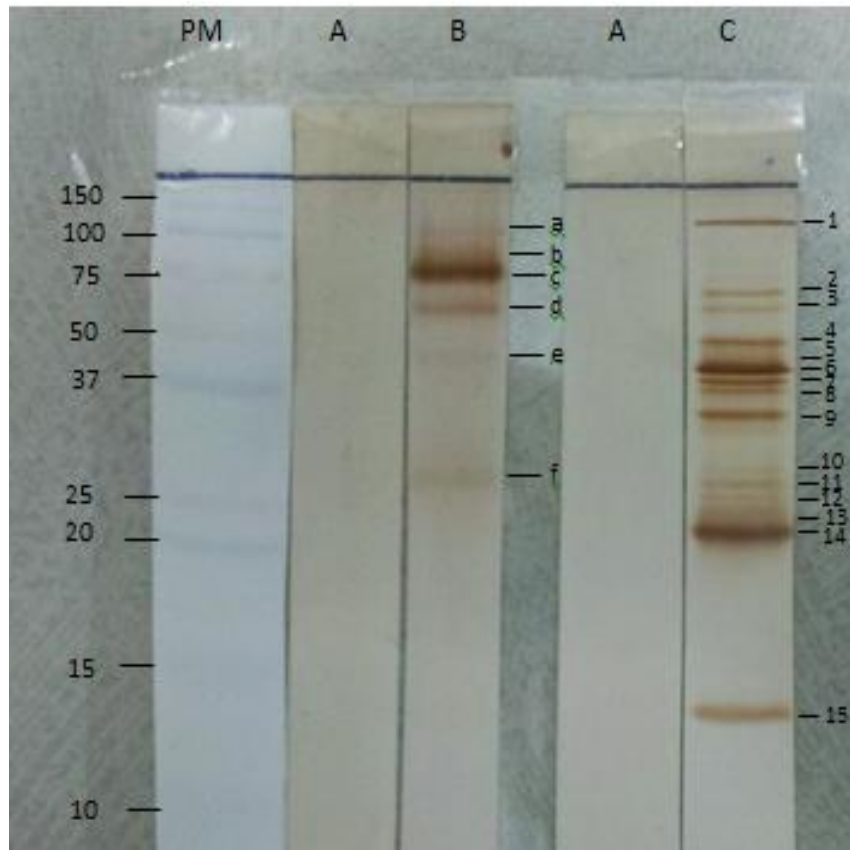
tres ocasiones, con intervalos de una semana: la primera mezclada con coadyuvante de Freud, completo, y las tres restantes con coadyuvante incompleto.

#### La técnica de Western blot<sup>8,11</sup>.

Se hizo siguiendo el protocolo establecido en trabajos previos, con las siguientes particularidades: cada suero fue preparado a la dilución 1/50 en PBSTWEEN®20, se conformó un “pool” de sueros de conejo, se colocaron 500uL de la solución bloqueadora preparada previamente y 10uL de los sueros previstos, en cada uno de los canales de ensayo. Las tiras de nitrocelulosa con los antígenos de excreción-secreción, fueron enumeradas en orden progresivo y colocadas en placas, las mismas que fueron incubadas durante 1 hora con agitación constante. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-TWEEN®20; a temperatura ambiente, todas durante 5 mins. y con agitación constante.

### RESULTADOS

Se evidenció mediante la observación de bandas antigénicas de diferentes pesos moleculares, la presencia de anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus* inducidos por los antígenos de excreción/secreción de epimastigota de *T. cruzi*, como se muestra en la Fig.1



**Fig. 1.** Antígenos de excreción/secreción obtenidos a 6 y 18 horas de incubación de epimastigota de *Trypanosoma cruzi* en Medio Mínimo Esencial reconocidos por anticuerpos en *Oryctolagus cuniculus* inmunizados experimentalmente. (PM) Peso molecular; (A) Suero pre-inmune; (B) Suero hiperinmune a seis horas: (a) 100kDa, (b) 70kDa, (c) 51kDa, (d) 38kDa, (e) 28kDa, (f) 13kDa; (C) Suero hiperinmune a 18 horas: (1) 100kDa, (2) 58kDa, (3) 51kDa, (4) 43kDa, (5) 38kDa, (6) 37kDa, (7) 34kDa, (8) 32kDa, (9) 26kDa, (10) 24kDa, (11) 22kDa, (12) 29kDa (13y14) 19kDa, (15) 13kDa.

## DISCUSIÓN

Los investigadores de la enfermedad de Chagas coinciden que ésta es una enfermedad silenciosa que, a diferencia de la mayoría de enfermedades infecciosas, compromete la salud del parasitado cuando han pasado muchos años de la interacción con el protozooario y los daños que éste, poco a poco, produce determinan la formación de un cuadro dramático e incurable puesto que los medicamentos disponibles no son efectivos<sup>15,16,17</sup>. Esto justifica la ejecución de investigaciones que permitan una rápida detección de los infectados a fin de que, en etapas tempranas de la infección, se proponga un esquema de tratamiento. Un de ellas es, la técnica de Western blot (Wb) que ha demostrado ser tan sensible como ELISA y específica como IFI<sup>7</sup>

Los resultados obtenidos mediante la técnica de Wb revelaron la presencia de 15 componentes antigénicos de epimastigota de *Trypanosoma cruzi* y a su vez las variaciones en el perfil antigénico entre los corridos, tanto en el número como en la intensidad de bandas, destacando que a mayor tiempo de incubación los antígenos son más específicos ya que son de menor o mediano peso molecular, porque a seis horas aparecen pocas bandas. Este fenómeno se produce porque, usualmente, el parásito tiene un metabolismo lento comparado con otros protozoarios, aspecto que se traduce en la excreción de poca cantidad de proteínas a las seis horas. Otras investigaciones en las que se aplica el Wb con los productos excretados secretados también mostraron tiempos de incubación apropiados entre 18 y 24 horas<sup>8,10,11,13</sup>. Sin embargo, esto tal vez podría revertirse utilizando mayor número de epimastigotes en el cultivo para compensar el poco tiempo de incubación en el medio mínimo esencial, porque, lógicamente un buen atributo de una eficaz técnica de diagnóstico es la rapidez en la obtención de sus componentes porque mejora su eficiencia y en su aplicación porque mejora su eficacia, y la técnica Wb carece de ello.

La similitud observada en el patrón antigénico reconocido por los diferentes tiempos de incubación especialmente dentro del rango comprendido entre 70 y 19 kDa, destacan los componentes de peso molecular de 70,37 y 19 kDa, representados en el Wb como bandas más intensas entre las 6 y 18 horas de incubación. Esto resulta bueno si las bandas reactivas que aparecen a las seis horas de incubación, sobre todo la de 38 kDa, serían reconocidas como bandas diagnósticas, porque significaría que la sola aparición de esta banda permite confirmar el diagnóstico, como ocurre con otras infecciones<sup>7,11</sup>; sin embargo, este aspecto requiere de mayores pruebas.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que es bueno obtener una técnica de Wb usando antígenos de excreción secreción de las formas de epimastigota de *T. cruzi*, ya que son mucho más fáciles de obtener in vitro, y en grandes poblaciones, que los de tripomastigotas que requieren una previa transformación (metaciclogenesis), aspecto que demanda mayor tiempo y un medio de cultivo adicional<sup>10,11</sup>, aun cuando el uso de antígenos de tripomastigotas es más plausible porque los estas formas son las patógenas<sup>18</sup>. Otro aspecto que debiera tomarse en cuenta es que el Wb, al ser más específico que otras técnicas serológicas, permite descartar la presencia de otras infecciones endémicas en el Perú, como la leishmaniasis<sup>19,20</sup>.

## CONCLUSIÓN

- Se evidenció la presencia de un mayor número de bandas antigénicas a las 18 que a las seis horas de incubación de epimastigota de *Trypanosoma cruzi* C1 aislada de *Triatoma infestans* de Arequipa (Perú) en MEM-Eagle reconocidos por anticuerpos en *Oryctolagus cuniculus* inmunizados experimentalmente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carod-Artal FJ, Gascon J. Chagas disease and stroke. *Lancet Neurol* 2010; 9:533-542
2. Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Dereloux M, et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:556-570
3. Nuns MPC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, et al. Chagas disease Nuns MPC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am College Cardiol* 2013; 2(9):767-776

4. Hunter GC, Barrini-Mayori K, Ancca-Juarez J, Castillo-Neyra R., et al. A field of alternative targeted screening strategies for Chagas disease in Arequipa, Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(1): e1468
5. Solís H, Huamán A, Ferrer A, Tarqui K, et al. Comunicación preliminar sobre la presencia de *Trypanosoma cruzi* en departamentos del norte y nororiente del Perú. *An Fac med* 2012; 73(1): 43-46
6. Vega CS, Náquira VC. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas). Inst Nac de Salud. Lima. Perú. 2006.
7. Luquetti AO, Schnmunis GA. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. En: Telleria & Tibayrenc (eds.), *American Trypanosomiasis, Chagas Disease: One hundred years of research*. Amsterdam: ELSEVIER, 2010; pp.744-792
8. Escalante H, Davalois A, Reyes W. Eficiencia de la técnica de electroinmunotransferencia o Western blot para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en el Perú. *Rev Biomédica*; 2011; 31: 209-421.
9. Kesper, N, De Almeida K, Stof A, Umezawa E. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. *J. Parasitol.* 2000; 86: 862-867
10. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Aché A, Lacouture S, Medina M, Ward B. Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:291-296.
11. Escalante H, Jara CA, Mayhuay R. Antígenos de excreción-secreción de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* detectados por Western Blot usando sueros de pacientes con parasitosis confirmada. *REBIOL* 2013; 33(2): 67-75
12. De Souza M, Amato Neto V. Discrepancies and consequences of indirect haemagglutination, indirect immunofluorescent and ELISA tests for the diagnosis of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2012; 54(3): 141-143
13. Zarate-Blades CR, Blades N, Nascimento MS, Silveira JF, et al. Diagnostic performance of tests based on *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens in an endemic area for Chagas disease in Bolivia. *Diag Microbiol Infec Dis* 2007; 57: 229-232.
14. Berrizbeitia M, Figueroa M, Ward BJ, Rodriguez J. et al. Development and application of an ELISA assay using excretion/secretion proteins from epimastigote forms of *T. cruzi* (ESEA antigens) for the diagnosis of Chagas disease. *J Trop Med* 2012; ID. 875909.
15. Moncayo A, Silveira AC. Current trends and future prospects for control of Chagas Disease. En: Telleria & Tibayrenc (eds.). *American Trypanosomiasis, Chagas Disease: One hundred years of research*. Amsterdam: ELSEVIER 2010; pp.55-82
16. Bayer AM, Hunter GC, Gilman RH, Cornejo del Carpio JG, et al. Chagas disease, migration and community settlement patterns in Arequipa, Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3(2): e567
17. Delgado S, Castillo-Neyra R, Quispe-Machaca VR, Ancca-Suarez J; et al. A history of Chagas disease transmission, control and reemergence in peri-rural La Joya, Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(2): e970
18. Frade AF, Luquetti AO, Prata A, Ferreira AW. Western blotting method (TESAcruzi) as a supplemental test for confirming the presence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in finger prick blood samples from children aged 0-5 years in Brazil. *Acta Tropica* 2011; 117: 10-13
19. Malchiodi L, Chiamonte M, Taranto N, Zwirner N, Margni R. 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 (Ag163B6). *Rev Clin Exp Immunol* 1994; 97(1): 417-423
20. Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, et al. Identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am J Trop Med & Hyg* 2012. 86(3):412-416.