

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE ENZIMOLOGIA DE PARÁSITOS

USO DE INMUNOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS EN EL
DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

www.bdigital.ula.ve

Trabajo especial de grado presentado por
Lizt Selene Sibila Osorio Pando
Como requisito parcial para optar al título de
Licenciada en Biología
Tutor Dr. Juan Luis Concepción

Mérida, Junio 2015

Para mis padres, quienes a su manera me incentivaron a buscar el porqué de las cosas

A todas aquellas personas que padecen la enfermedad de Chagas y otras enfermedades, para que esta nueva herramienta posibilite en un futuro próximo, un mejor diagnóstico.

Y muchas gracias a todas aquellas personas que permitieron la realización de este trabajo tanto de forma académica como emocional.

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

Uno de los principales problemas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas es que los kits comercialmente disponibles son ineficientes en la detección directa/indirecta del parásito *Trypanosoma cruzi*. Las metodologías utilizadas convencionalmente en centros de diagnóstico y de salud pública se basan en la detección de anticuerpos específicos (IgG e IgM) α -*T. cruzi*, teniendo como consecuencia que personas seropositivas no necesariamente tienen el. Es obvio que se requiere de herramientas de diagnóstico para la enfermedad de Chagas que determinen si la persona es positiva o negativa para el parásito y no de seropositivas. En nanotecnología de punta existe una nueva herramienta que permitiría detectar directamente parásitos o indirectamente proteínas de secreción/excreción del parásito en muestras de sangre/suero, esta es utilizando partículas magnéticas acopladas a anticuerpos específicos. En este trabajo se utilizaron partículas superparamagnéticas (BcMag™ Epoxi-activadas FC-106) conjugadas a IgG específicas contra varios antígenos de *T. cruzi*, contra la fracción microsomal de epimastigotes (FM), enolasa, PPDk y Pgr24, además de las IgG totales del suero de un paciente chagásico en fase crónica. Las IgG se unieron a las partículas de forma covalente (como indica la casa comercial) y mantuvieron la afinidad por los antígenos después de 5 meses de almacenadas. Partículas conjugadas a IgG (α -ENO, α -Pgr24, α -PPDK y α -FM) capturaron epimastigotes, uniéndose principalmente a la bolsa flagelar del parásito, sin embargo con α -ENO y α -FM se localizaron también en otras zonas de la membrana plasmática, esto era de esperarse, ya la enolasa se encuentra distribuida en zonas discretas de la membrana plasmática; la visualización de las partículas unidas a parásitos se hizo por microscopía de luz, electrónica de barrido y transmisión. También se intentó capturar tripomastigotes sanguíneos con partículas conjugadas a IgG (ENO, FM y las IgG), sin embargo la eficiencia fue muy pobre debido a la gran hidrodinámica del parásito. Además, las partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK capturaron vesículas extracelulares de secreción/excreción liberadas por la forma tripomastigote sanguínea en el suero de un ratón infectado con la cepa YBM de *T. cruzi*, lo que fue comprobado por SDS-PAGE, Western blot y microscopía electrónica de transmisión. Este es el primer reporte de PPDk en vesículas extracelulares a partir de la forma sanguínea y que la PPDk se encuentra en la cara externa de las vesículas. Además, es una evidencia física y contundente de la presencia de *T. cruzi* en el hospedador, ya que nosotros no tenemos a la proteína PPDk, siendo una proteína principalmente de plantas, por lo que con este sistema se podrían mejorar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

LISTA DE ABREVIATURAS

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amonio
ABs	Cuerpos apoptóticos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albumina de suero bovino
$\text{CCl}_3\cdot\text{CH}(\text{OH})_2$	Tricloroacetaldehido
CoCl_2	Cloruro de Cobalto II
CoML	Prueba de lisis mediada por el complemento
DAB	Diaminobenzidina
DEAE	Dietilaminoetil
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EGTA	Etilen glicol del ácido tetracético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ENO	Enolasa
ESCRT	Complejos de clasificación endosomal requeridos para el transporte
Fab	Fragmento de unión al antígeno en las IgG
Fc	Fragmento cristizable en las IgG
FCaBP	Proteína flagelar de unión a calcio
FGG	Fracción granular gruesa
FITC	Fluoresceína
FM	Fracción microsomal
FN	Fracción nuclear
FRG	Fracción rica en glicosomas
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
H_2O_d	Agua desionizada
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido N-(2-Hidroxi-etil)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M

IHA	Reacción de Hemoaglutinación Indirecta
ILV	Vesículas intraluminales
IMAC	Cromatografía de Afinidad por el Ion Metal Inmovilizado
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodalton
KF	Fluoruro de potasio
KH_2PO_4	Fosfato de potasio monobásico
LIT	Infusión de hígado triptosa
MABA	Ensayo de unión de múltiples antígenos
mAmp	Miliamperios
MgCl_2	Cloruro de magnesio
MVBs	Cuerpos multivesiculares
Na_2HPO_4	Fosfato de sodio dibásico
Na_3PO_4	Fosfato de sodio tribásico
NaCl	Cloruro de sodio
NaF	Fluoruro sódico
NaH_2PO_4	Fosfato de sodio monobásico
NaOH	Hidróxido de sodio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pgr24	Proteína glicosomal recombinante de 2r4 kDa
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
PPDK	Piruvato fosfato dikinasa
PPi	Pirofosfato
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RFC	Reacción de Fijación de Complemento
SDS	Lauril sulfato de sodio
SDS-PAGE	Geles de poliacrilamida con SDS
SiO_2	Dióxido de sílice
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TLCK	Tosyl-leucin-clorometil cetona
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano, forma básica
VEs	Vesículas extracelulares
α -	IgG contra-

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
ENFERMEDAD DE CHAGAS	1
TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS DE <i>T. CRUZI</i>	1
FASES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN HUMANOS.....	3
DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	4
PROBLEMAS ASOCIADOS A LOS SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO PARA CHAGAS	6
VESÍCULAS EXTRACELULARES (VES): UNA NUEVA FUENTE DE BIOMARCADORES DE ENFERMEDADES ...	7
AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE VES	9
INMUNOCAPTURA CON PARTÍCULAS PARAMAGNÉTICAS	10
II. HIPÓTESIS	14
III. OBJETIVOS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA	15
1. MATERIALES	15
1.1 Parásitos	15
1.1.1 Epimastigotes	15
1.1.2 Tripomastigotes	15
1.2 Sueros y anticuerpos	15
1.2.1 Sueros	15
1.2.2 Anticuerpos	16
1.3 Material magnético	16
1.3.1 Partículas	16
1.3.2 Soporte magnético.....	17
1.4 Medios de cultivo y tampones	17
2 METODOLOGÍA.....	19
2.1 Determinación de la concentración de proteínas	19
2.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	19
2.3 Purificación de proteínas recombinantes	20
2.4 Inmunoblots	20

2.4.1	Western blot	20
2.4.2	Método de detección de múltiples antígenos (MABA).....	21
2.4.3	Dot blot.....	21
2.5	Obtención de anticuerpos policlonales α - FM de <i>T. cruzi</i> en conejos	22
2.5.1	Aislamiento de la FM de <i>T. cruzi</i> por centrifugación diferencial	22
2.5.2	Inmunizaciones.....	22
2.5.3	Titulación del suero.....	23
2.5.4	Obtención de los sueros hiperinmunizados	23
2.6	Purificación de inmunoglobulinas G.....	23
2.7	Conjugación de IgG a partículas superparamagnéticas BcMag™ Epoxi-Activadas.....	24
2.7.1	Concentración de las IgG	24
2.7.2	Conjugación	25
2.7.3	Reconocimiento antígeno-anticuerpo.....	25
2.7.4	Rendimiento de conjugación	25
2.8	Partículas paramagnéticas conjugadas a IgG	26
2.8.1	Detección de IgG conjugadas a las partículas paramagnéticas	26
2.8.2	Determinación del tipo de interacción entre las partículas paramagnéticas y las IgG.....	27
2.8.3	Captura de antígenos recombinantes con IgG conjugadas a partículas paramagnéticas... 27	
	Método A.....	27
	Método B	28
2.8.4	Captura de antígenos naturales con IgG conjugadas a partículas paramagnéticas.....	29
2.8.4.1	Captura de antígenos en condiciones solubles.....	29
2.8.4.2	Captura de la proteína PPDK secretada/excretada por <i>T. cruzi</i> con partículas paramagnéticas conjugadas a IgG	29
	Medio condicionado.....	29
	Sueros.....	30
2.8.4.3	Captura de parásitos de <i>T. cruzi</i> con partículas conjugadas a IgG mediante antígenos asociados a la membrana plasmática	30
	Captura de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	30
	Captura de tripomastigotes sanguíneos de <i>T. cruzi</i>	31
2.8.5	Microcopía.....	31
2.8.5.1	Inmunofluorescencia indirecta de epimastigotes capturados con partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24	31

2.8.5.2	Microscopía electrónica de barrido y transmisión de epimastigotes capturados con partículas conjugadas a α -PPDK	32
2.8.5.3	Microscopía electrónica de transmisión de vesículas extracelulares (VEs) capturadas con partículas conjugadas a α -PPDK.....	32
2.8.6	Estabilidad en el tiempo de las IgG conjugadas.....	33
V.	RESULTADOS	34
1.	OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI- FRACCIÓN MICROSOMAL DE <i>T. CRUZI</i>	34
2.	PURIFICACIÓN DE IgG	34
3.	CONJUGACIÓN DE IgG A PARTÍCULAS PARAMAGNÉTICAS	37
3.1.	Rendimiento de conjugación.....	39
4.	PARTÍCULAS PARAMAGNÉTICAS CONJUGADAS A IgG.....	40
4.1	Detección de IgG conjugadas a las partículas paramagnéticas.....	40
4.2	Determinación del tipo de interacción entre las partículas paramagnéticas y las IgG.....	41
4.3	Captura de antígenos recombinantes con IgG conjugadas a partículas paramagnéticas	42
	Método A.....	42
	Método B.....	44
4.4	Captura de antígenos naturales con IgG conjugadas a partículas paramagnéticas	47
4.4.1	Captura de la Piruvato Fosfato Dikinasa (PPDK) soluble con partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK.....	47
4.4.2	Captura de la proteína PPDK secretada/excretada por <i>T. cruzi</i> con partículas paramagnéticas conjugadas a IgG	48
	Medio condicionado	48
	Sueros	49
4.4.3	Captura de parásitos de <i>T. cruzi</i> con partículas conjugadas a IgG mediante antígenos asociados a la membrana plasmática.....	51
	Captura de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	51
	Captura de tripomastigotes sanguíneos de <i>T. cruzi</i>	55
4.5	Microscopía.....	56
4.5.1	Inmunofluorescencia indirecta de epimastigotes capturados con partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24.....	56
4.5.2	Microscopía electrónica de barrido y transmisión de epimastigotes capturados con conjugados α -PPDK	58

4.5.3	Microscopía electrónica de transmisión de vesículas extracelulares (VEs) capturadas con partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK.....	60
4.6	Estabilidad de las IgG conjugadas a partículas paramagnéticas	61
VI.	DISCUSIÓN	63
VII.	CONCLUSIONES	70
VIII.	PERSPECTIVAS	71
IX.	BIBLIOGRAFÍA	72

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	2
FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS ESTADIOS MORFOLÓGICOS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> . 3	
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA LIBERACIÓN DE VES EN EL ESPACIO EXTRACELULAR. 9	
FIGURA 4. ESQUEMA DE INMUNOCATURA EN <i>BATH</i> CON PARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	11
FIGURA 5. PARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA INMUNOCAPTURA	13
FIGURA 6. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-FM.....	34
FIGURA 7. PURIFICACIÓN DE IGG.	35
FIGURA 8. PURIFICACIÓN DE ENOLASA RECOMBINANTE DE <i>T. CRUZI</i>	36
FIGURA 9. INMUNOBLOTS DE LOS PRODUCTOS DE PURIFICACIÓN.....	37
FIGURA 10. MILIGRAMOS DE IGG CONJUGADOS POR MG DE PARTÍCULAS.....	38
FIGURA 11. INMUNOBLOTS DE LAS IGG NO CONJUGADAS.....	39
FIGURA 12. . EFICIENCIA DE CONJUGACIÓN DE IGG ANTI-ENO DE <i>T. CRUZI</i> A PARTÍCULAS PARAMAGNÉTICAS BAJO DOS CONDICIONES DE PH.....	40
FIGURA 13. INMUNOENSAYO DE LA PRESENCIA DE IGG SOBRE LAS PARTÍCULAS.....	41
FIGURA 14. DETERMINACIÓN DEL TIPO DE INTERACCIÓN ENTRE LAS PARTÍCULAS PARAMAGNÉTICAS Y LAS IGG..	42
FIGURA 15. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ENOLASA Y PGR24.....	43
FIGURA 16. RECONOCIMIENTO DE ANTÍGENOS POR PARTE DE LAS IGG CONJUGADAS A PARTÍCULAS..	43
FIGURA 17. RECONOCIMIENTO DEL ANTÍGENO ENOLASA POR PARTE DE IGG/ANTI-ENO CONJUGADAS A PARTÍCULAS.	44
FIGURA 18. RECONOCIMIENTO DEL ANTÍGENO PGR24 POR PARTE DE IGG/ANTI-PGR24 CONJUGADAS A PARTÍCULAS	45
FIGURA 19. RECONOCIMIENTO DEL ANTÍGENO PPDK POR PARTE DE IGG/ANTI-PPDK CONJUGADAS A PARTÍCULAS.....	45
FIGURA 20. DISTRIBUCIÓN DE LOS DATOS (RECONOCIMIENTO DEL ANTÍGENO PGR24 POR PARTE DE IGG/ANTI-PGR24 CONJUGADAS A PARTÍCULAS) TRATAMIENTO AY B.....	46
FIGURA 21. CAPTURA DE LA PROTEÍNA PPDK NATURAL DE <i>T. CRUZI</i> CON PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG/ANTI-PPDK.....	47
FIGURA 22. CAPTURA DE PPDK SECRETADA/EXCRETADA POR <i>T. CRUZI</i> EN MEDIO CONDICIONADO, CON PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG ANTI-PPDK.....	48

FIGURA 23. CAPTURA DE EXOANTÍGENOS DE SECRECIÓN/EXCRECIÓN DE <i>T. CRUZI</i> EN SUEROS, MEDIANTE PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG/ANTI-PPDK.....	50
FIGURA 24. INCUBACIÓN DE PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG/ANTI-PPDK CON DIFERENTES TIPOS DE SUERO	51
FIGURA 25. CAPTURA DE EPIMASTIGOTES CON PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG/ANTI-ENO	52
FIGURA 26. CAPTURA DE EPIMASTIGOTES CON PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG/ANTI-PGR24.....	53
FIGURA 27. CAPTURA DE EPIMASTIGOTES CON PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG/ANTI-PPDK	54
FIGURA 28. CAPTURA DE EPIMASTIGOTES CON PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG/ANTI-FM.....	55
FIGURA 29. CAPTURA DE TRIPOMASTIGOTES SANGUÍNEOS DE <i>T. CRUZI</i> CON PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG DE SUERO CRÓNICO.....	56
FIGURA 30. CAPTURA DE EPIMASTIGOTES CON PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG/ANTI-PGR24.....	57
FIGURA 31. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EPIMASTIGOTES CAPTURADOS CON PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG/ANTI-PPDK.....	59
FIGURA 32. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE EPIMASTIGOTES CAPTURADOS CON PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG/ANTI-PPDK.....	60
FIGURA 33. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES (VES) CAPTURADAS CON PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG/ANTI-PPDK	61
FIGURA 34. ESTABILIDAD DE LA IGG (ANTI-PGR24) CONJUGADA A PARTÍCULAS	62
FIGURA 35. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA FORMACIÓN DEL ENLACE COVALENTE ENTRE EL GRUPO EPOXI Y UNA ÁTOMO DE OXÍGENO.	65

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ESPECIFICACIONES DE LAS PARTÍCULAS	17
TABLA 2. MEDIOS DE CULTIVO.	17
TABLA 3. SOLUCIONES Y TAMPONES	18
TABLA 4. CONJUGACIÓN DE IGG A PARTÍCULAS PARAMAGNÉTICAS	38
TABLA 5. ESTADÍSTICOS- PRUEBA DE KRUSKAL- WALLIS	41
TABLA 6. ESTADÍSTICOS- PRUEBA DE KRUSKAL- WALLIS ENTRE TRATAMIENTOS A Y B CON PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG/ ANTI-PGR24.....	46
TABLA 7. PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES T2 DE TAMHANE ENTRE TRATAMIENTOS A Y B CON PARTÍCULAS CONJUGADAS A IGG/ A-PGR24.....	46

www.bdigital.ula.ve

I. INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Chagas

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, uno de los principales problemas de salud pública tanto en zonas rurales como urbanas de Latinoamérica y el responsable de la mayor tasa de morbilidad y mortalidad del continente, con porcentajes significativamente mayores que los reportados para malaria, squistosomiasis y leishmaniasis (Schmunis, 1997).

La enfermedad de Chagas se encuentra distribuida desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina, con un total de 22 países endémicos y un aproximado de 10 millones de personas infectadas (figura 1). Asimismo, es la causante de al menos 14 mil muertes al año y una pérdida de productividad de 1.2 billones de dólares anuales solo en Latinoamérica. Cabe acotar que los datos oficiales no reflejan la totalidad de los casos de Chagas debido a que gran parte de los mismos no son diagnosticados o reportados (TDR Disease Reference Group on Chagas Disease y World Health Organization, 2012). Para el año 2000 se estimó que un 25 % de la población de Latinoamérica (100 millones de personas), estaban en riesgo de contraer esta enfermedad, sin embargo, se cree que esta cifra ha disminuido en aproximadamente un 70% gracias a programas de control de transmisión vectorial, producto de iniciativas de países del cono sur como Uruguay, Chile y Brasil (Moncayo, 2003; Rassi Jr, Rassi, y Marin-Neto, 2010). No obstante, estas políticas no han tenido el mismo progreso en otros países del continente.

Por otro lado, el aumento de las migraciones desde países endémicos a no endémicos han ocasionado un incremento en el número de personas infectadas por *T. cruzi* en países como Estados Unidos, Canadá, parte de Europa, Australia y Japón, lo que origina un nuevo problema epidemiológico, económico, social y político a nivel mundial (figura 1) (Coura y Viñas, 2010).

Taxonomía y características de *T. cruzi*

T. cruzi es un parásito unicelular, hemoflagelado, que pertenece al filo: Euglenozoa, Clase: Kinetoplastea, Orden: Trypanosomatida, Familia Trypanosomatidae, Género *Trypanosoma*, Sub-Género *Schisotrypanum*, especie *cruzi* (Hoare, 1964), y está emparentado con otros parásitos obligados y patógenos para el hombre, como: *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*, agentes causantes de la enfermedad del sueño y con organismos del género *Leishmania* causantes de la leishmaniasis.

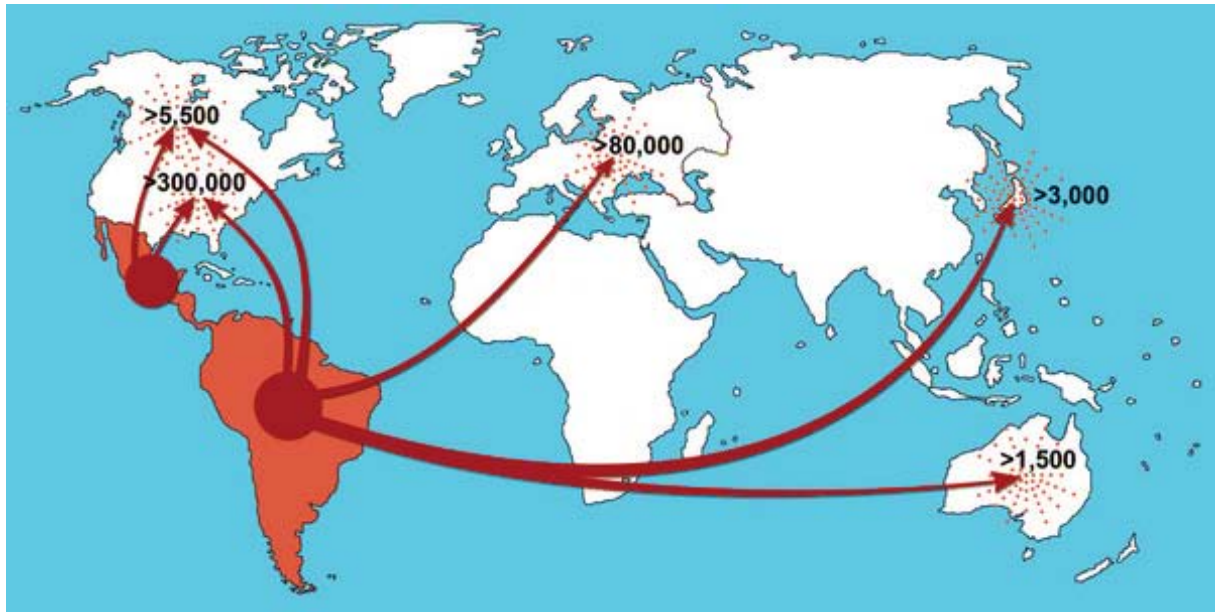


Figura 1. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas. Las zonas endémicas se indican con color rojo, junto a las rutas de migración y un estimado del número total de personas infectadas en países no endémicos (Coura y Viñas, 2010).

Al igual que otros Kinetoplastida, *T. cruzi* presenta algunas características: (i) una única mitocondria ramificada con un kinetoplasto (maxicírculos y minicírculos de ADN) (De Souza, 1999); (ii) glicosomas (peroxisoma especializado), donde se lleva a cabo gran parte de la glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato y la síntesis de éter lípidos, síntesis de purinas, síntesis de esteroides y β -oxidación (Oppenheimer y Borst, 2001) y (iii) Posee un único flagelo responsable del movimiento, que emerge de una invaginación denominada bolsa flagelar, este último es el sitio principal de endocitosis y exocitosis y es la única región donde el cuerpo del parásito no está recubierto por microtúbulos subpeliculares (De Souza, 1999).

El ciclo de vida de *T. cruzi* es digenético y polimórfico, presentando tres estadios morfológicos que pasan de manera obligatoria por un hospedador vertebrado, que incluye al hombre y un insecto vector de la sub-familia Triatominae. Las tres formas son: Tripomastigote (no proliferativo), presente en la sangre del mamífero y en la ampolla rectal del insecto, denominándose tripomastigote sanguíneo y metacíclico respectivamente; epimastigote (proliferativo) presente en el intestino medio del insecto y amastigote (proliferativo) forma intracelular en el mamífero (figura 2) (Tyler y Engman, 2001).

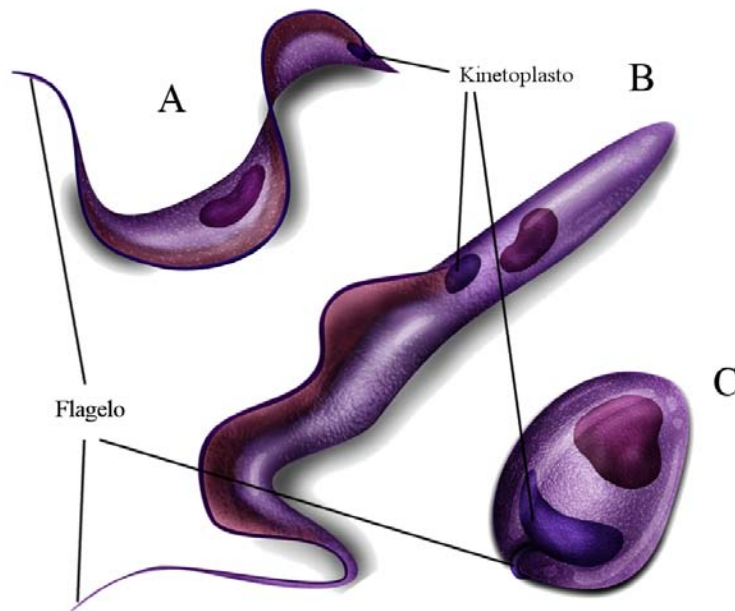


Figura 2 . Representación esquemática de los estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*. (A) Forma tripomastigote (B) epimastigote y (C) amastigote. (www.uta.edu/chagas/).

Fases de la enfermedad de Chagas en humanos

www.bdigital.ula.ve

Luego de la infección y un tiempo de incubación de 1 a 2 semanas, se desarrolla la primera fase de la enfermedad conocida como fase aguda, esta dura entre 1 a 2 meses y se caracteriza por una alta carga de parásitos en sangre y tejidos, además de bajos títulos de inmunoglobulinas G (IgG) específicos y altos títulos de inmunoglobulinas M (IgM). La mayoría de la sintomatología es inespecífica (fiebre, vómito, diarrea, anorexia e inflamación de los ganglios), por lo que esta fase puede pasar desapercibida. En una minoría de los casos se puede formar una lesión inflamatoria en el sitio de entrada del parásito, ya sea en la piel, conocido como chagoma o en la conjuntiva del ojo, conocido como signo de Romaña. Finalmente, los síntomas desaparecen con completa recuperación del paciente entre 3 y 4 meses después de la infección (Coura y De Castro, 2002; Tanowitz y col., 1992). La mortalidad en esta fase es menor al 10% y ocurre principalmente debido a complicaciones asociadas con miocarditis aguda o meningoencefalitis (Rassi Jr y col., 2010). Sin embargo, el tratamiento con una droga tripanocida como benznidazol o nifurtimox logran curar la enfermedad en esta fase y previenen las manifestaciones clínicas de la fase crónica en el 80 % de los casos (Urbina y Docampo, 2003).

La fase aguda es seguida por una fase indeterminada, en la cual no hay parásitos circulantes en sangre debido a que la infección es controlada por el sistema inmunológico (humoral) y hay aumento en los títulos de IgG específicos. Sin embargo, los parásitos pueden encontrarse en órganos y tejidos (Coura y De Castro, 2002). Esta fase puede durar toda la vida sin sintomatología clínica.

La siguiente fase llamada crónica se desarrolla entre 20-50 % de los casos. Esta fase se caracteriza por desarrollar problemas cardíacos, digestivos o neuronales; siendo los síntomas más comunes las arritmias, aneurismas cardíacos, hipertrofia miocelular, inflamación del corazón, disfunción del sistema nervioso autónomo (que suele asociarse a algunos de los problemas cardíacos y digestivos), daños del sistema nervioso central, entre otros. Durante esta fase no es común la observación de parásitos en sangre periférica (Coura y De Castro, 2002; Tanowitz y col., 1992). Cabe destacar que las drogas disponibles comercialmente para esta enfermedad son ineficientes en la cura parasitológica y clínica durante la fase crónica, además de tener fuertes efectos secundarios (Urbina y Docampo, 2003).

Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

La falta de iniciativas gubernamentales para la prevención y control de la enfermedad de Chagas han ocasionado que los sistemas de diagnóstico y de tratamiento en todas las fases de la enfermedad sean ineficientes, por ende la prevalencia de la enfermedad aumenta cada año en las zonas urbanas y rurales más pobres de Latinoamérica.

Como toda enfermedad infecciosa el diagnóstico se apoya en la información epidemiológica, clínica y de laboratorio del paciente. En zonas endémicas, el estudio epidemiológico analiza factores como: procedencia del paciente, existencia de familiares infectados, presencia de triatominos en la zona, entre otros. Por otro lado, los datos clínicos aplican casi exclusivamente para pacientes en fase crónica sintomática, en particular cuando existe bloqueo completo del haz de His en el electrocardiograma, que en Brasil tiene un valor predictivo superior al 95%, o megaesófago superior a 90%, o megacolon superior al 98%. Mientras que para pacientes en fase aguda, indeterminada o crónica asintomática, solo se puede saber de la existencia de infección para *T. cruzi* con apoyo en la información obtenida en laboratorios especializados. El diagnóstico de laboratorio depende de la fase de la enfermedad, por ejemplo, si se sospecha de fase aguda se emplea tradicionalmente los exámenes parasitológicos, pero cuando se debe confirmar o excluir a un individuo que se sospeche este en fase crónica o indeterminada (que es la mayoría de los casos), se prefieren los exámenes serológicos (Luquetti y Rassi, 2000).

Métodos parasitológicos: Se basan en la identificación del parásito en muestras de sangre a través del microscopio de luz. Poseen 100 % de especificidad pero una sensibilidad de 34-85% (Cedillos y col, 1982; Neal y Miles, 1970; Pinto y col, 2008; Woo, 1969).

- Gota fresca: Se basa en la búsqueda de tripomastigotes a partir de muestras de sangre fresca del paciente. Actualmente es el método más empleado en los centros de diagnóstico.
- Gota gruesa: La detección se hace mediante zonas de alta concentración de ADN del parásito teñidas con Giemsa a partir de muestras de sangre desfibrinada.

- Método de concentración de Strout y microhematocrito: Son procedimientos que buscan concentrar al parásito por centrifugación para facilitar la visualización. La detección se realiza en la fracción leucoplaquetaria de la sangre del paciente.
- Xenodiagnóstico: Consiste en la búsqueda del parásito en las deyecciones de triatomíneos que han sido alimentados con la sangre del paciente, para esto se utilizan ninfas del IV estadio libres de parásitos.
- Hemocultivo: Se basa en la siembra de la sangre del paciente en medios de cultivo especializados como el *liver infusion tryptose* (LIT), la detección se realiza mediante extendidos del cultivo durante los siguientes 120 días.

Método Molecular: Se basa en la detección indirecta del parásito a través de la amplificación de genes específicos del ADN (nuclear y kinetoplasto).

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): por sus siglas en inglés): Se basa en la detección del producto de amplificación de un gen específico del parásito mediante cebadores previamente diseñados. Esta técnica a ganado gran popularidad en la última década debido a que su sensibilidad es alta, llegando a detectar hasta un solo parásito en sangre (Duffy y col., 2009).

Métodos serológicos: Se fundamentan en la detección de IgG específicas, α - *T. cruzi* en muestras de sangre del paciente. Son empleados tradicionalmente para la fase indeterminada y crónica de la enfermedad y se requiere de la confirmación con al menos dos métodos para un diagnóstico definitivo. Son procedimientos muy sensibles pero poco específicos, ya que dependen principalmente del tipo de antígeno. En la actualidad, los antígenos más utilizados siguen siendo los extractos de parásitos o fracciones semipurificadas del mismo a pesar de su poca especificidad. Sin embargo, el desarrollo de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos durante la última década han permitido que la especificidad de las técnicas este muy cercana al 100%.

- Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA): por sus siglas en inglés): Actualmente es el método de diagnóstico de preferencia para la fase crónica. Se basa en la captura de anticuerpos α - *T. cruzi* empleando como señuelo antígenos del parásitos adsorbidos a placas de microtitulación de ELISA. El complejo antígeno/anticuerpo es detectado mediante un anticuerpo secundario α - inmunoglobulina ligado a una enzima reportera como la peroxidasa y la fosfatasa alcalina.
- Western blot: Por lo general se aplica como técnica complementaria para la confirmación de un caso de infección. El fundamento es el mismo que el del ELISA, con la diferencia de que los antígenos se adsorben a una membrana de nitrocelulosa o PDVF.
- Inmunofluorescencia indirecta (IFI): por sus siglas en inglés): En este caso el complejo antígeno-anticuerpo se detecta mediante una α - inmunoglobulina marcada con un fluoróforo, visualizado con la ayuda de un microscopio de fluorescencia.

- Reacción de Hemoaglutinación Indirecta (IHA: por sus siglas en inglés): Para la captura de anticuerpos en el suero, se emplean eritrocitos sensibilizados con antígenos del parásito, como resultado los glóbulos rojos se aglutinan en presencia de anticuerpos específicos. (Hay y col, 2002; Kuby, 2003).
- Reacción de Fijación de Complemento (RFC: por sus siglas en inglés): consiste en la captura de proteínas del complemento por parte de complejos antígeno-anticuerpo. La prueba incluye la adición de eritrocitos sensibilizados con una hemolisina. Si el suero posee anticuerpos específicos α - *T. cruzi*, se fija el complemento y no puede unirse a la hemolisina para lisar los eritrocitos (Hay y col., 2002)

Problemas asociados a los sistemas de diagnóstico para Chagas

A pesar del desarrollo e implementación de las metodologías descritas arriba, tanto en laboratorios de diagnóstico de rutina como en algunos bancos de sangre, aun no existe una técnica estandarizada que sea 100 % específica y sensible, de fácil manipulación y que tenga un bajo costo, accesible para los países endémicos.

Aunque los procedimientos parasitológicos tienen 100% de especificidad, el rango de sensibilidad es muy bajo, esto se debe a que depende principalmente de la concentración de parásitos en sangre, que varía de forma gaussiana a lo largo de la fase aguda y es muy baja e intermitente en la fase crónica, además requieren de muchas horas de trabajo, incluso semanas; demandan de mucha experiencia del especialista y requieren de instalaciones adecuadas para el procesamiento de organismos patógenos (Gomes y col, 2009; Portela-Lindoso y Shikanai-Yasuda, 2003). La PCR ha demostrado ser una buena solución para aumentar los niveles de sensibilidad de este formato de detección, ya que pueden detectar hasta un solo parásito en sangre (Souto y Zingales, 1993), sin embargo, se trata de un procedimiento poco reproducible, de alto costo y que también requiere de personal entrenado y de instalaciones especializadas (Basquiera y col., 2003; Junqueira y col 1996; Wincker y col., 1997).

Actualmente las pruebas serológicas como el ELISA, IFI e IHA son las más utilizadas por la facilidad de uso, sobretodo en la fase crónica. Sin embargo, los niveles de especificidad y sensibilidad dependen del tipo de antígeno, por lo que se pueden obtener resultados incongruentes, incluso utilizando la misma técnica (Gomes y col., 2009; Rassi Jr y col., 2010). Hasta ahora los antígenos más empleados siguen siendo los extractos alcalinos de epimastigotes o las fracciones purificadas y semi-purificadas del parásito, generando un gran número de falsos positivos y también falsos negativos (Frank y col., 2003; Gomes y col., 2009; Umezawa y col, 1996). Una estrategia para aumentar la especificidad, ha sido el diseño y aplicación de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos como antígeno. Por ejemplo, para la fase aguda existen unos pocos antígenos recombinantes como JL8 y MAP que logran detectar IgG en el 84,2 % de pacientes provenientes de Brasil y Panamá (Umezawa y col., 2004), mientras que para fase crónica un mayor número de antígenos han sido empleados, ya que las IgG específicas son más abundantes en esta fase. Dentro de este grupo tenemos a H49, JL7, A13, B13, JL8 y 1F8 (Umezawa y col., 1999), este último antígenos también es llamado FCaBP o Tc-24 y será utilizado durante la realización de este estudio. Otra solución que ha mejorado la especificidad de

los sistemas serológicos, ha sido el uso de antígenos secretados por la forma sanguínea del parásito (TESA: por sus siglas en inglés), sin embargo, solo son usados por laboratorios especializados para el diagnóstico y no en pruebas comercialmente disponible (Berrizbeitia y col., 2006; Frascch y col., 1988; Nakazawa y col., 2001; Silveira-Lacerda y col., 2004; Umezawa y col., 1996; Yabsley, Brown, y Roellig, 2009).

Otro problema asociado al diagnóstico de la enfermedad de Chagas, es que no posee sintomatología específica sino hasta que el paciente está en fase crónica, por lo que la mayoría de ellos no logran ser diagnosticados y por tanto no son tratados antes de la aparición de los síntomas (Sanchez-Sancho y col, 2010).

Un problema de gran importancia es el de saber si un paciente en tratamiento tuvo cura parasitológica o si ha tenido cura espontánea, ya que la seroconversión puede durar varios años (pudiendo detectarse IgG específicos), por lo que los sistemas serológicos (los más utilizados hasta ahora) son incapaces de discernir entre sí hubo cura parasitológica o no (Cançado, 1999). Una de las metodologías empleadas para el diagnóstico de este tipo de paciente es la prueba de lisis mediada por el complemento (CoML: por sus sigla en inglés) (Krettli y Brener 1982), donde la presencia de un anticuerpo lítico es indicador de infección activa. Sin embargo, este procedimiento fue muy poco difundido debido a la necesidad de trabajar con formas vivas del parásito y complemento. También es frecuente el uso de la PCR, sin embargo además de tener las dificultades mencionadas anteriormente, todavía no se han estandarizado el/los blancos ha amplificar, dejando a esta técnica como método confirmatorio (Machado-de-Assis y col., 2012). Un último problema, también de gran importancia es el de detectar de forma temprana la infección congénita en neonatos, ya que durante el primer año de vida, las IgG en el bebé son producto de la transferencia de la madre al hijo (Carlier y Torrico, 2003).

Todas estas complicaciones nos hace concluir, que necesariamente se debe cambiar el enfoque con el que se pretende detectar la presencia directa/indirecta del parásito *T. cruzi*. Una alternativa poco estudiada, pero que puede llegar a tener gran capacidad de resolución en el diagnóstico; es detectando exoantígenos de excreción/secreción liberados por el parásito, ya que la detección se haría de forma indirecta capturando proteínas específicas de *T. cruzi*, pudiéndose hablar de personas positivas para *T. cruzi* y no de forma indirecta por anticuerpo producidos por el paciente (pacientes seropositivos). Hasta ahora en *T. cruzi* se han reportado dos formas de liberación de exoantígenos; de forma soluble, los cuales ya han sido evaluadas con propósitos de diagnóstico tanto en sangre como orina (Araujo y col, 1992; Freilij y col, 1987; Katzin y col.,1989; Umesawa y col., 1993) y asociados a vesículas de secreción/excreción.

Vesículas extracelulares (VEs): una nueva fuente de biomarcadores de enfermedades

Dentro de las áreas de diagnóstico y liberación de fármacos en biotecnología de punta, las vesículas extracelulares (VEs), también llamadas vesículas de secreción/excreción, han ganado

muchísima preferencia en la detección de nuevos biomarcadores distintivos para cada condición humana (Cocucci y Meldolesi, 2015).

Se trata, de nano y microvesículas con membrana, liberadas por las células (procariotas y eucariotas) en el microambiente que las rodea. Basados en la biogénesis, las VEs pueden ser clasificadas en tres categorías; exosomas, ectosomas y vesículas apoptóticas. Los exosomas, de 40- 150 nm de diámetro, son liberadas de la célula por fusión exocítica de cuerpos multivesiculares (MVBs: por sus siglas en inglés), mientras que los ectosomas, de 100- 1000 nm de diámetro, son producidos por gemación directa de la membrana y las vesículas apoptóticas, de 100-5000 nm de diámetro, por desprendimiento a partir de una célula en proceso de muerte (figura 3) (J. Simpson y Mathivanan, 2012).

Los conocimientos en cuanto a composición y función de las VEs siguen creciendo cada día; ahora sabemos, que éstas representan un subproteoma de la célula de origen, transportando cofactores, proteínas, lípidos y ácidos ribonucleicos y que cumplen importantes funciones tanto en procesos fisiológicos (comunicación celular) como en procesos patológicos (Cocucci y Meldolesi, 2015). Para este último caso, ya se han reportado gran variedad de proteínas y ácidos ribonucleico, contenidos en VEs, implicados en procesos inflamatorios, problemas cardiovasculares y degenerativos , diabetes y varios tipos de cáncer (Montecalvo y col., 2012; Muralidharan-Chari y col, 2010; G. Raposo y Stoorvogel, 2013). Incluso se sabe que microorganismos como bacterias, hongos y parásitos utilizan VEs para la liberación de moléculas que modulan la interacción parásito-hospedador.

En *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania* spp, también se ha reportado la liberación de VEs (exosomas/ectosomas) para el transporte de moléculas al espacio extracelular (Marcilla y col., 2014). Incluso se sabe, que moléculas contenidas en estas VEs, desempeñan roles importantes en procesos como la modulación de la interacción parásito-hospedador, supervivencia del patógeno, replicación en el hospedador y la transición de una forma a otra durante el ciclo de vida. Específicamente para *T. cruzi* ya se identificaron un total de 367 proteínas contenidas en ectosomas y exosomas, de las cuales, 102 fueron exclusivas de epimastigotes y 22 para tripomastigotes metacíclicos (Bayer-Santos y col., 2013). Es decir, que existe una gran variedad de proteínas en el secretoma asociado a VEs de *T. cruzi* que pudieran ser empleadas como biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

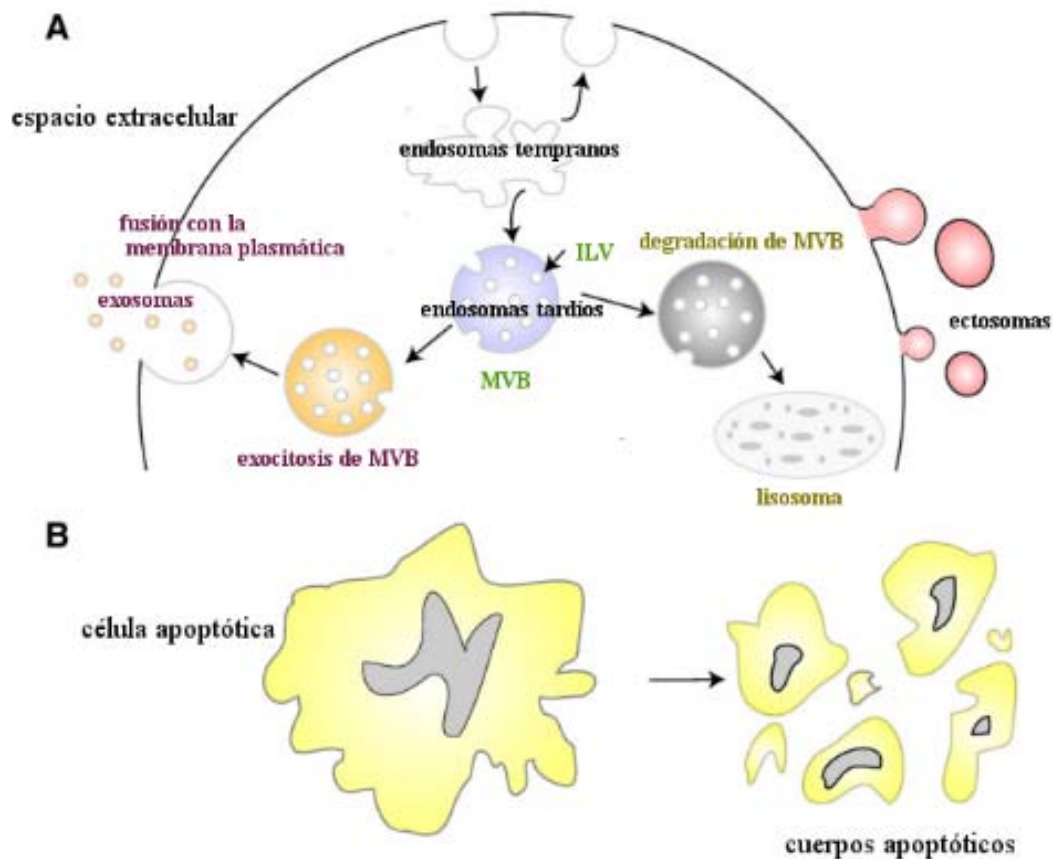


Figura 3. Representación esquemática de la liberación de VEs en el espacio extracelular. (A) liberación de exosomas y ectosomas. En los endosomas tempranos, las proteínas son tanto recicladas en la membrana plasmática como secuestradas por vesículas intraluminales (ILV: por sus siglas en inglés) en cuerpos MVBs más grandes. Las ILVs de los MVBs son generadas por invaginación de la membrana hacia dentro del lumen de los endosomas. Debido a sus propiedades biofísicas, los MVBs pueden ser tanto degradados (evolucionando a lisosomas) regulados por los Complejos de Clasificación Endosomal Requeridos para el Transporte (ESCRT: por sus siglas en inglés) o ubiquitinización o pueden ocurrir exocitosis (es decir, fusionarse con la membrana plasmática y a continuación liberar su contenido, los exosomas). Los ectosomas son liberados mediante un proceso de gemación y desprendimiento de la membrana plasmática. (B) Apoptosis o muerte celular por encogimiento de la célula, un sello distintivo de la apoptosis es la generación de cuerpos apoptóticos (ABs: por sus siglas en inglés). Estas vesículas son restos de la célula apoptótica en degradación con contenido nuclear y citoplasmático (Mathivanan y col, 2010).

Aislamiento y purificación de VEs

Actualmente, existen varios procedimientos para el aislamiento y purificación de VEs, no obstante los resultados obtenidos son contradictorios entre las distintas publicaciones, ya que los métodos utilizados hasta ahora se basan principalmente en la densidad de las vesículas

(exosomas/ectosomas), por tanto es necesario el diseño y el desarrollo de nuevas metodologías que permitan separar vesículas de biogénesis diferentes.

Todas aquellas preparaciones que contienen VEs, ya sea a partir de cultivos celulares, suspensiones celulares, tejidos o fluidos, poseen inevitablemente contaminantes como vesículas apoptóticas, agregados de proteínas, oligómeros de proteínas, lipoproteínas o proteínas asociadas con la superficie de las vesículas (Choi y col, 2013, 2014), para mejorar la purificación, las vesículas son prelavadas y filtradas antes de ser procesadas. Hasta ahora los métodos más frecuente de purificación se basan en la centrifugación (centrifugación diferencial y/o isopícnica), además de procedimientos como filtración en gel, fraccionamiento de campo-flujo o a través de kits como el ExomiR de Bioo Scientific o el ExoQuick-tc de System Biosciences, basados en nano filtros y agentes de precipitación respectivamente (Choi y col., 2013, 2014). Sin embargo, ninguna de estas técnicas es capaz de resolver de forma precisa la separación entre ectosomas y exosomas, requerimiento que podría ser provechoso si lo que se quiere es estandarizar un método de detección de proteínas para diagnóstico. Una posibilidad para una buena separación es a través de inmunoensayos, empleando anticuerpos específicos contra proteínas en la superficie de la membrana vesicular. Prueba de esto son los resultados obtenidos por algunos investigadores, quienes lograron aislar exosomas a partir de células presentadoras de antígenos (Clayton y col., 2001), exosomas positivos para HER2 a partir de líneas celulares de adenocarcinoma de mama y paciente con cáncer de ovario (Koga y col., 2005), exosomas positivos para A-33 a partir de células de carcinoma de colon (Mathivanan y col., 2010), exosomas positivos para EpCAM a partir de sueros de pacientes con cáncer de pulmón (Rabinowits y col, 2009) y el aislamiento de exosomas relacionados al cáncer de próstata (Mizutani y col., 2014).

Un punto en común entre los métodos de inmunoafinidad utilizados por estos investigadores, es que utilizaron como forma de captura de exosomas, partículas paramagnéticas acopladas a anticuerpos. Este sistema (relativamente novedoso) de purificación, ofrece una gran variedad de ventajas (que serán descritas a continuación), sobretodo en cuanto a diagnóstico directo se refiere.

Inmunocaptura con partículas paramagnéticas

El aislamiento, separación y purificación de moléculas, vesículas y células completas utilizando nano/micropartículas magnéticas acopladas a anticuerpos específicos, es una estrategia relativamente innovadora en ciencias biológicas.

Las purificaciones inmunomagnéticas poseen varias ventajas con respecto a metodologías convencionales. El proceso es rápido y simple, requiere de muy pocos pasos, se puede llevar a cabo en un solo recipiente y no requiere de equipos especializados de alto costo (figura 4). Además, este puede ser utilizado directamente sobre muestras que contengan material sólido en suspensión, o en algunos casos, como por ejemplo para el aislamiento de proteínas intracelulares, se pueden integrar los pasos de ruptura y separación, acortando aún más los tiempos de trabajo (Schuster y col., 2000). Otra ventaja, es

que este tipo de separación suele ser suave al momento de aislar proteínas o péptidos; incluso cuando se trata de grandes complejos proteicos que tienden a separarse y hasta desnaturalizarse (Hofmann y col, 2002). Además, a diferencia de la purificación con otros métodos, la separación inmunomagnética permite utilizar volúmenes discretos de solución, es decir a criterio del usuario.

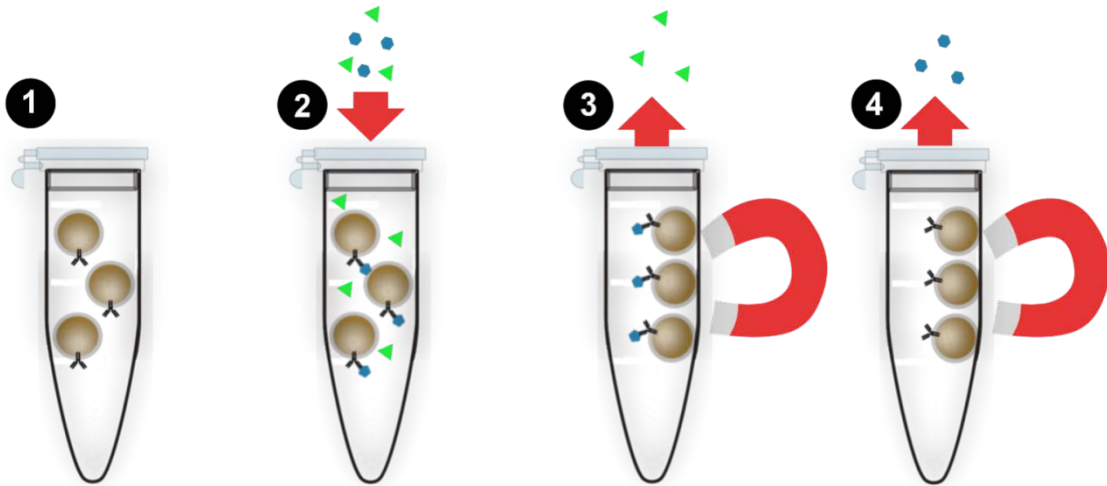


Figura 4. Esquema de inmunocaptura en *bath* con partículas magnéticas. Se adiciona la proporción requerida de partículas a un recipiente adecuado (1), se añade la muestra que contiene el elemento blanco y se incuba (2), pasado el tiempo de incubación se somete la mezcla a un campo magnético y se eliminan los elementos no unidos mediante lavados sucesivos (3). Finalmente el complejo partícula/anticuerpo es separado de los elementos capturados mediante un tampón para elución (4).

Las partículas magnéticas, empleadas para inmunocaptura y comercialmente disponibles, se fabrican generalmente con un núcleo de óxido de hierro de tamaños nanométricos, recubierto o encapsulado con algún tipo de polímero como; poliestireno, celulosa, agarosa, sílice o vidrio poroso (figura 5-A). Una característica importante de este tipo de núcleo, es que posee un comportamiento magnético llamado paramagnetismo; el cual le atribuye la capacidad de responder a la presencia de un campo magnético. En presencia de un campo (por ejemplo un imán) todos los momentos magnéticos del material se alinean hacia el campo, resultando en una muestra magnetizada; cosa que no ocurre en ausencia de campo, donde todos los momentos magnéticos se distribuyen al azar y el material está desmagnetizado. Esto es importante debido a que en presencia del campo se puede aislar cualquier elemento que se haya unido a la partícula a partir de una muestra, y en ausencia del campo despegar el elemento de la partícula para purificarlo. Un punto importante es que partículas magnéticas con un diámetro mayor a 1 μm pueden ser fácilmente separadas con un imán, mientras que partículas más pequeñas (dependiendo del material), pueden requerir de separadores magnéticos de alto gradiente (Cocucci y Meldolesi, 2015).

Por encima de la capa polimérica, las partículas vienen recubiertas con otro revestimiento funcional, útil para la unión de anticuerpos a la partícula. Existen comercialmente varias estrategias que

permiten la unión del anticuerpo a través de la región Fc (fragmento cristalizante: por sus siglas en inglés) y dejar expuesta la región Fab (fragmento de unión al antígeno: por sus siglas en inglés) para su interacción con el antígeno (<https://www.lifetechnologies.com/ve/en/home.html>).

- **Adsorción pasiva:** a través de interacciones hidrofóbicas entre la Fc y superficies de carácter hidrofóbico, como poliestireno o lípidos. Este fenómeno de interacción se puede ver favorecido si el anticuerpo ha sido parcialmente desnaturalizado antes de la adsorción (22-24 John E. Butler).
- **Unión covalente:** empleando brazos químicos capaces de formar enlaces covalentes con grupos amino, hidroxilo y sulfhidrilo en el anticuerpo, que permiten fijar permanentemente el anticuerpo. Los grupos moleculares más empleados son los grupos epoxi, amino, tosil y carboxilo, El acoplamiento por la Fc del anticuerpo se logra variando los niveles de pH y la concentración de sales en el tampón de conjugación (figura 5-B).
- **Afinidad:** a través de moléculas que unen específicamente la Fc del anticuerpo o por biotinylación, por ejemplo partículas acopladas a proteína A/G, anticuerpos α -Fc o estreptavidina, en este caso la interacción es de carácter iónico (figura 5-C).

El propósito de este trabajo, es el de conjugar IgG específicas contra varias proteínas/antígeno de *T. cruzi* a partículas superparamagnéticas de 1 μm de diámetro. Con la intención de realizar ensayos de captura de los antígenos en forma soluble, asociados a vesículas extracelulares (secreción/excreción) o a la membrana plasmática de parásitos completos. En miras de desarrollar una herramienta que permita detectar al parásito *T. cruzi* en la sangre de pacientes de forma más precisa que los métodos convencionales de diagnóstico.

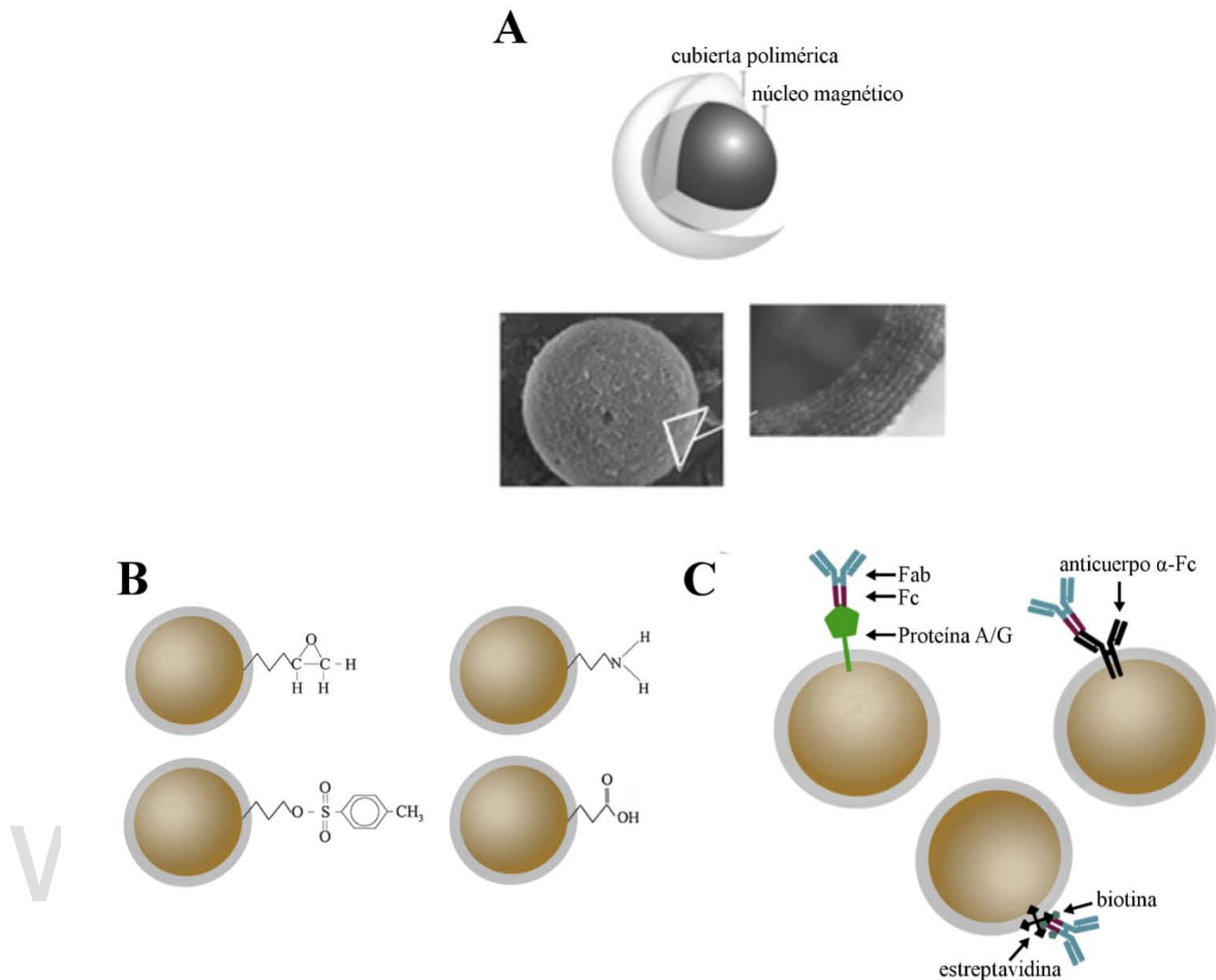


Figura 5. Partículas magnéticas para inmunocaptura. (A) Representación esquemática y micrografía de una partícula magnética encapsulada en sílice. (B) Tipos de brazos químicos para la fijación covalente de moléculas a partículas: grupos epoxi, amino, tosil y carboxilo (C) partículas previamente acopladas a proteínas para la fijación de anticuerpos por la región Fc: proteína A/G, anticuerpos secundarios y estreptavidina (<https://www.lifetechnologies.com/ve/en/home.html> con modificaciones).

II. HIPÓTESIS

Partículas superparamagnéticas conjugadas a IgG específicas contra proteínas de *T. cruzi* permitirán capturar antígenos solubles, vesículas secreción/excreción (en medios de cultivo, sueros de pacientes chagásico y animales experimentales) y parásitos completos.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Capturar con partículas superparamagnéticas conjugadas a IgG específicas contra proteínas de *T. cruzi*, vesículas de secreción/excreción (en suero de animales experimentales, pacientes chagásicos y medios de cultivos) y parásitos completos.

Objetivos específicos

1. Obtención de microsomas a partir de epimastigotes de *T. cruzi* por centrifugación diferencial.
2. Obtener anticuerpos policlonales en conejos utilizando como antígeno los microsomas.
3. Purificar a homogeneidad inmunoglobulinas G (IgG) a partir de sueros de conejos híper inmunizados, contra las proteínas: enolasa, Pgr24, PPKK (recombinantes), y microsomas de *T. cruzi* y *T. evansi*.
4. Conjugar de forma covalente los anticuerpos purificados a las partículas superparamagnéticas, mediante un brazo epoxi.
5. Evaluar la captura de antígenos recombinantes por parte de las IgG conjugadas a las partículas.
6. Capturar vesículas de secreción/excreción, epimastigotes y tripomastigotes, a partir de medios de cultivo y sueros (animales experimentales y de pacientes chagásicos) con el uso de las partículas conjugadas a IgG.
7. Evaluar la estabilidad de las IgG conjugadas a las partículas.

IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA

1. Materiales

1.1 Parásitos

1.1.2 Epimastigotes

Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* de la cepa EP (aislados de un caso agudo de la enfermedad de Chagas en 1967) cultivados en medio LIT suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino (inactivado a 56°C por 30 min) a 28°C con agitación constante (Camargo, 1964) hasta una densidad óptica aproximada de 0,8 (fase exponencial tardía).

1.1.2 Tripomastigotes

Tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* de la cepa M/HOM/VE/92/YBM-92 UDT Tc1 (Zingales y col., 2009) (aislados de un caso agudo de Chagas en el Estado Barinas, Venezuela y registrada en el banco de cepas de la OMS) mantenidos mediante infecciones sucesivas en ratones NMRI (*Mus musculus*) y los epimastigotes cultivados en medio LIT.

1.2 Sueros y anticuerpos

1.2.1 Sueros

Los sueros a continuación fueron donados y evaluados por el Laboratorio de Enzimología de Parásitos, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes.

1. Sueros humanos de pacientes en fase aguda y crónica para la enfermedad de Chagas, evaluados mediante pruebas serológicas (ELISA y MABA)
2. Sueros de conejos hiperinmunizados por vía subcutánea contra las proteínas recombinantes enolasa, Pgr24 y PPK de *T. cruzi*
3. Suero de un ratón NMRI hiperinmunizado con la proteína enolasa recombinante de *T. cruzi*.

4. Suero de un ratón NMRI infectado con tripomastigotes sanguíneos de la cepa YBM de *T. cruzi*

Para la obtención del suero 4, los ratones fueron infectados por vía intraperitoneal con tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*. Pasados 21 días de infección se tomaron 1,5 ml de sangre por punción cardíaca y se dejó coagular por 5 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se separó el coágulo por centrifugación a 600 *xg* por 5 min. La cosecha de los tripomastigotes se realizó resuspendiendo suavemente la capa de células que recubre el coágulo, en intervalos de 25 min cada uno, hasta obtener 5 parásitos por campo a 40x.

1.2.2 Anticuerpos

1. α -IgG humano hecho en cabra (SIGMA™)
2. α -IgG de conejo hecho en cabra (SIGMA™)
3. α -IgG de ratón hecho en conejo (SIGMA™)
4. α - IgG de conejo acoplado a Fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (SIGMA™)
5. α -PPDK monoclonal de *T. brucei*.
6. α -rK26 policlonal de *Leishmania infantum*

1.3 Material magnético

1.3.1 Partículas

Partículas superparamagnéticas epoxi-activadas de brazo largo (21 átomos) BIOCLONE Inc, *BcMag*™ (FC-106), almacenadas en H₂O mQ y 0,02 % de azida de sodio. Utilizadas para la conjugación covalente de grupos hidroxilo, amino y sulfhidrilo.

Tabla 1. Especificaciones de las partículas

Características	Partículas de óxido de hierro cubiertas por una capa de dióxido de silicio
Tamaño de la partícula	1 μm de diámetro
Número de partículas	$\sim 1,7 \times 10^8$ perlas (1 μm)/mg
Área de la superficie	$\sim 100 \text{ m}^2/\text{g}$
Tipo de magnetismo	Superparamagnetismo
Densidad efectiva	2.5 g/ml
Densidad de grupos funcionales (grupo epoxi)	$\sim 200 \mu\text{moles/g}$
Eficiencia de conjugación	1-10 mg de proteína/ml de partículas

1.3.2 Soporte magnético

PolyAtract® System 1000 Magnetic Separation Stand (PROMEGA).

1.4 Medios de cultivo y tampones

Durante la experimentación se utilizaron varios tipos de medios de cultivo y diversas soluciones y tampones con distintas composiciones, que se describirán a continuación en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Medios de cultivo.

Medio	Composición
Infusión de hígado corazón (LIT)	0,5% (p/v) de extracto de levadura, 0,002% (p/v) de hemina previamente disuelta en 8 ml de una solución 0,1 M de NaOH, 5% (v/v) de extracto de hígado de res, 5% (v/v) de suero fetal bovino, 1,5% (p/v) de triptosa, 0,4% (p/v) de glucosa, 5,36 mM de KCl, 35,7 mM de Na_2HPO_4 y 154 mM de NaCl
RPMI-1640 (SIGMA-ALDRICH®)	Suplementado con 25 mM de HEPES, 1% de glucosa, 2 mM de L-glutamina, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina y 60 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycinina

Tabla 3. Soluciones y tampones

Soluciones y tampones	Composición
<i>Cocktail</i> de Inhibidores de proteasas	2 mM de Na ₂ EDTA, 2 mM de Na ₂ EGTA, 10 μM de leupeptina, 50 μg/ml de inhibidor de tripsina (de soya), 1 mM de benzamidina, 50 μM de PMSF, 100 μM de TLCK, 0.2 μM de antipaina, 1 μM de pepstatina, 3 μM de E-64, 1 μM de quimiostatina y 1 μM de bestatina
Solución colorante para geles de poliacrilamida	3,02 mM de azul de Coomassie R-250, 45,4 % (v/v) de metanol y 9,2 % (v/v) de ácido acético glacial
Solución de bloqueo para inmunoblot	100 mM de NaCl, 80 mM de Na ₂ HPO ₄ , 20 mM de NaH ₂ PO ₄ , 0,1 % (v/v) de Tween-20 y 5% (p/v) de leche descremada en polvo, pH 7,4
Solución de bloqueo para partículas	1 M de etanolamina, pH 9
Solución de incubación para ELISA	130 mM de NaCl, 5 mM de Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM de KH ₂ PO ₄ y 1% (p/v) de leche descremada en polvo pH 7,2
Solución de incubación para inmunoblot	100 mM de NaCl, 80 mM de Na ₂ HPO ₄ , 20 mM de NaH ₂ PO ₄ y 1% (p/v) de leche descremada en polvo, pH 7,4
Solución de lavado para inmunoblot	100 mM de NaCl, 80 mM de Na ₂ HPO ₄ , 20 mM de NaH ₂ PO ₄ y 0,1% (v/v) de Tween-20, pH 7,4
Solución de revelado para inmunoblot	100 mM de NaCl, 80 mM de Na ₂ HPO ₄ , 20 mM de NaH ₂ PO ₄ , 0,05% (p/v) de DAB y 0,25% (v/v) de CoCl ₂ , pH7,4
Solución decolorante para geles de poliacrilamida	25% (v/v) de metanol y 7,5% (v/v) de ácido acético glacial
Tampón A	20 mM de Tris-HCl, 0,225 mM de sacarosa, 20 mM de KCl, 10 mM KH ₂ PO ₄ , 5 mM de Na ₂ EDTA y 5 mM de MgCl ₂ , pH 7,2
Tampón de carga	62 mM de Tris- base, 2% (p/v) de SDS, 10% (v/v) de glicerol, 50 mM de DTT o 100 mM de 2-β mercaptoetanol y azul de bromofenol, pH 6,8
Tampón de corrida	0,25 M de Tris-HCl, 0,19 M de glicina y 0,1 % (p/v) de SDS, pH 8,3
Tampón de elución	100 mM de glicina, 10 % (v/v) de etilenglicol y 0,3 M de NaCl; pH 2,5
Tampón de transferencia para Western blot	47,8 mM de Trizma base, 38,6 mM de glicina y 20% (v/v) de metanol

Tampón fosfato salino para ELISA	130 mM de NaCl, 5 mM de Na ₂ HPO ₄ y 1,5 mM de KH ₂ PO ₄ , pH 7,2
Tampón fosfato salino para inmunoblot	100 mM de NaCl, 80 mM de Na ₂ HPO ₄ y 20mM de NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Tampón gel concentrador	0,5 M de Tris-HCl, y 0,4 % (p/v) de SDS, pH 6.8
Tampón gel de resolución	1,5 M de Tris-HCl, y 0,4 % (p/v) de SDS, pH 8.8
Tampón isoosmótico	39 mM de Na ₂ HPO ₄ , 10 mM de NaH ₂ PO ₄ , 274 mM de NaCl, 22 mM de KCl, pH 7,2
Tampón isoosmótico glucosado	95 mM de Na ₂ HPO ₄ , 5 mM de NaH ₂ PO ₄ .2 H ₂ O, 73 mM de NaCl 1 % (p/v) de glucosa, pH: 7,2
Tampón RIPA	50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 1 mM de Na ₃ VO ₄ , 1 mM de EGTA, 1 mM de NaF, 1 mM de PMSF, 1 % (v/v) de Nonidep P-40 y 0,25 % (v/v) de desoxicolato de sodio, pH 7,4
Tampón Sorensen	1,25 mM de KH ₂ PO ₄ ; 3,8 mM de Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O; 5,6 mM de CCl ₃ .CH(OH) ₂ ; 0,01% (v/v) Tween 20

2 Metodología

2.1 **Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método de Lowry (Lowry y col., 1951) empleando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

2.2 **Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes**

Se siguió el método de (Laemmli, 1970), el gel de resolución se utilizó al 12 % de acrilamida (a partir de una solución al 30% (p/v), que corresponde a 29,21% de acrilamida y 0,795% de bis-acrilamida en agua destilada) en tampón gel de resolución y se polimerizó con 0.01% (p/v) de persulfato de amonio y 0,125% (v/v) de TEMED. En los casos que lo amerito, el gel de resolución se preparó al 10%. El gel concentrador se hizo al 5% de acrilamida en tampón gel concentrador y se polimerizó con 0,03% (p/v) de persulfato de amonio y 0,4% (v/v) de TEMED.

La preparación de las muestras a visualizar se hizo en tampón de carga en una relación 5:1 de muestra y tampón, luego se hirvieron por 10 minutos, se centrifugaron a 12000 xg por 30 segundos y finalmente se cargaron en el gel. La corrida electroforética se realizó a 20 miliamperios por gel y voltaje libre, utilizando el sistema para mini geles de *Hoefler* en tampón de corrida.

La visualización de las proteínas en los geles, se realizó mediante tinción con azul de Coomassie R250, incubando 15 minutos en agitación con solución colorante para geles de poliacrilamida a temperatura ambiente y luego 20 minutos en solución decolorante para geles de poliacrilamida bajo las mismas condiciones.

2.3 Purificación de proteínas recombinantes

Se purificaron las proteínas recombinantes enolasa, Pgr24 y PPDK de *T. cruzi* siguiendo las metodologías descritas por (Quiñones y col., 2007), Vielma (2005) y (González-Marcano y col., 2014), respectivamente.

En todos los casos, las proteínas purificadas fueron dializadas con 1 L de tampón fosfato salino para ELISA durante toda la noche a 4 °C con agitación suave, debido a que las proteínas enolasa y PPDK precipitaban después de la diálisis, se centrifugaron por 10 min a máxima velocidad en una centrifuga Eppendorf y se utilizó el sobrenadante.

2.4 Inmunoblots

2.4.1 Western blot

Proteínas corridas en SDS-PAGE fueron transferidas de forma activa a una membrana de PVDF (*Polyvinylidene difluoride* de PIERCE) utilizando tampón de transferencia para western blot y empleando una cámara de transferencia *Semi-dry* (AMERSHAN BIOSCIENCES™), durante 1,5 horas, con 45 mAmp y voltaje libre. Culminada la transferencia, la membrana se incubó durante 5 min en solución colorante de rojo Ponceau (0,1% p/v de rojo Ponceau y 5% v/v de ácido acético), con la finalidad de confirmar la transferencia.

A continuación la membrana se bloqueó con solución para inmunoblot durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación. Luego se lavó la membrana con solución de lavado para inmunoblot por 5 min con agitación, 3 veces y se agregó el anticuerpo primario (1/500 de suero α - ENO hecho en ratón y 1/5000 de suero α -Pgr24 hecho en conejo ambos policlonales y 1/4000 de α -PPDK monoclonal) en solución de incubación para inmunoblot durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación, se lavó nuevamente la membrana con solución de lavado 3 veces por 5 minutos con agitación suave y se incubó por 1 hora con agitación con el anticuerpo secundario en las siguientes diluciones 1/8000 (α - IgG de ratón) y 1/10000 (α -IgG de conejo) en solución de incubación, se repitieron los lavados con tampón fosfato salino para inmunoblot y se procedió al revelado. El revelado se hizo incubando las membranas con solución de revelado para inmunoblot y disparando la reacción

con 1/1000 de peróxido de hidrógeno comercial 3% (v/v) hasta que las bandas fueron visibles. Finalmente la reacción se detuvo con H₂O_d. En algunos casos se utilizó el sistema de revelado quimioluminiscente de AMERSHAM (GE HEALTHCARE), *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents*, según recomendaciones de la casa comercial.

En aquellos casos donde la membrana se incubó solo con el anticuerpo secundario, se emplearon las diluciones 1/2000 y 1/4000 de α -IgG de conejo.

2.4.2 Método de detección de múltiples antígenos (MABA)

Proteínas recombinantes purificadas, fueron adsorbidas a membranas de PVDF (*Polyvinylidene difluoride* de PIERCE), utilizando una cámara de transferencia *Miniblotter 28- SL*, INMUNETICS, con 12 y 6 μ g de enolasa y Pgr24 de *T. cruzi* por canal. Como control de método se utilizó la proteína rK26 de *Leishmania infantum* Silva (2010), colocando 6 μ g de la misma (previamente purificada) en otro canal. La adsorción de las proteínas se realizó a temperatura ambiente durante cuatro horas y agitación constante. Posteriormente la membrana se bloqueó durante toda la noche a 4 °C, con solución de bloqueo para inmunoblot, para finalmente ser lavada 8 veces con tampón de lavado para inmunoblot, durante 3 min con agitación. Las soluciones (con inmunoglobulinas G purificadas) fueron diluidas 1/100, 1/200 y 1/500 en solución de incubación para inmunoblot, y los controles 1/1000 de los sueros (α -ENO, α -Pgr24 y α -rK26) también en solución de incubación, se incubaron por media hora a temperatura ambiente y agitación; se lavó nuevamente con solución de lavado para inmunoblot y se incubó con el anticuerpo secundario 1/4000 (α -IgG de conejo) en tampón de incubación para inmunoblot durante media hora a temperatura ambiente y agitación; se realizaron los lavados correspondientes con tampón fosfato salino para inmunoblot, y se procedió a revelar como se describe en la sección 2.4.1.

2.4.3 Dot Blot

Proteínas de la fracción microsomal (FM) de *T. cruzi* y *T. evansi* y el péptido quimera del kit *CruziElisa* fueron adsorbidas con una Hamilton a membranas de PVDF (*Polyvinylidene difluoride* de PIERCE) de 1,5 cm² previamente activadas con metanol al 100% por 20 segundos. Las gotas se dejaron secar a temperatura ambiente. Ambas fracciones microsomales se utilizaron a una concentración de 3 μ g totales de proteína, homogeneizándolas previamente en un Potter en presencia de 0,1% de Tween 20. El péptido quimera se utilizó a una concentración de 0,21 μ g. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con solución de bloqueo para inmunoblot por 2 horas a temperatura ambiente y agitación, acto seguido, se lavaron 3 veces con solución de lavado para inmunoblot incubando cada lavado 5 min con agitación. Se evaluaron las siguientes diluciones del anticuerpo primario 1/1000, 1/2000, 1/4000 y 1/8000 (α - FM de *T. cruzi* y *T. evansi*) y 1/100, 1/200 y 1/500 de las IgG purificadas a partir del suero de un paciente chagásico crónico, todas en solución de incubación para inmunoblot, la incubación fue

de 1 hora a temperatura ambiente y agitación (una dilución por membrana), nuevamente se lavaron las membranas con solución de lavado para inmunoblot y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y agitación con el anticuerpo secundario 1/4000 (α - IgG de conejo) y 1/150000 (α -IgG humano) en la solución de incubación para inmunoblot. Se repitieron los lavados con tampón fosfato salino para inmunoblot y se procedió al revelado como se indica en la sección 2.4.1.

2.5 Obtención de anticuerpos policlonales α - FM de *T. cruzi* en conejos

2.5.1 Aislamiento de la FM de *T. cruzi* por centrifugación diferencial

La fracción microsomal fue obtenida mediante centrifugación diferencial a partir de epimastigote de la cepa EP de *T. cruzi* siguiendo el procedimiento de (Steiger y col., 1980) y (Concepción y col., 1998). Los parásitos en fase exponencial fueron colectados a partir de 1 L de cultivo por centrifugación a 3400 xg por 15 minutos a 10 °C (temperatura a la cual se hacen todos los pasos de centrifugación) y lavados una vez con tampón A y luego con tampón B centrifugando a 5000 xg después de cada lavado. Las células se rompieron por abrasión con carburo de silicio (200 mesh) en relación 1:1 en peso, en un mortero frío y en presencia de tampón B suplementado con 1/1000 de un cocktail de inhibidores de proteasas. La ruptura fue seguida con un microscopio de luz hasta obtener aproximadamente 90% de células rotas. La mezcla de carburo de silicio y células rotas fue diluida en aproximadamente 50 ml de tampón B con inhibidores de proteasas y se dejó sedimentar. El sobrenadante fue centrifugado a 30600 xg por 20 minutos para eliminar el carburo de silicio residual, la fracción nuclear (FN), fracción granular gruesa (FGG) y fracción rica en glicosomas (FRG), nuevamente se recuperó el sobrenadante y se ultracentrifugó a 105000 xg por 1.5 horas a 5°C, para separar la fracción microsomal (FM).

El pellet correspondiente a la fracción microsomal se resuspendió en tampón fosfato salino 20 mM pH 7,2 con inhibidores de proteasas, se homogenizó con un Potter y se determinó la concentración de proteínas siguiendo el método de Lowry. Por último, la muestra se fraccionó en tubos con 500 μ l y se almaceno a -20°C hasta su uso.

2.5.2 Inmunizaciones

Empleando el protocolo descrito por (Ausubel y col., 1995) con algunas modificaciones, se inmunizaron dos conejos machos (*Oryctolagus cuniculus*) de 3 meses de edad. Uno con la FM de *T. cruzi* y otro con la FM de *T. evansi* (esta última fue donada por el Laboratorio de Enzimología de parásitos a una concentración de 10, 22 μ g/ μ l). En todas las inmunizaciones la FM fue diluida en una solución con 0,8 % de NaCl, 7,4 mM de Tris- HCl y 0,2% de SDS pH 6,8, hasta un volumen de 500 μ l.

Se realizó un total de 6 inmunizaciones por vía intradérmica, las primeras cinco con 300 µg de proteína de la FM y la sexta con 500 µg, se dejaron pasar 15 días entre una inoculación y otra. En la primera inoculación se mezcló un volumen de la solución con la FM con un volumen de adyuvante completo de Freund (1:1) (SIGMA). En la segunda, tercera y cuarta se mezclaron con adyuvante incompleto de Freund (SIGMA) en la misma relación y la quinta y sexta, sin adyuvante.

2.5.3 Titulación del suero

Para verificar la presencia de anticuerpos α -FM en los sueros de los conejos, se realizó una titulación por dot blot (como se describe en la sección 2.4.3) pasados 15 días de la última inmunización. Para la obtención del suero, se tomaron 1,5 ml de sangre de la oreja de los conejos, se dejó coagular por 2 horas a temperatura ambiente y se separó el coágulo del suero (que corresponde al sobrenadante) por centrifugación a 12000 xg por 10 minutos a temperatura ambiente.

2.5.4 Obtención de los sueros hiperinmunizados

Una vez corroborada la presencia de altos títulos de anticuerpos α - FM, se hicieron dos extracciones de sangre (\approx 50 ml) por punción cardíaca, una a los 18 días y la otra a los 31 días posteriores a la sexta inoculación. La sangre extraída se dejó coagular durante 3 horas a temperatura ambiente en tubos de centrifugación de 50 ml, el coágulo formado se despegó de las paredes del tubo con un palillo de madera y se centrifugó a 1000 xg por 15 minutos a 10 °C, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 12000 xg por 10 minutos a 10 °C, se recuperó el sobrenadante (que corresponde al suero) y se fraccionó en tubos de 1 ml cada uno. Estos se almacenaron -20 °C hasta su uso.

2.6 Purificación de inmunoglobulinas G

Siguiendo la metodología descrita por Velásquez-Olivares (2012) con algunas modificaciones, se hicieron purificaciones de las IgG totales, a partir de cada uno de los sueros empleados a lo largo del período experimental. Se purificaron IgG a partir de sueros α -FM de *T. cruzi* y *T. evansi*, sueros hiperinmunizados con las proteínas recombinantes de *T. cruzi*: enolasa, Pgr24, PPDK y a partir del suero de un paciente chagásico en fase crónica.

Como paso inicial de purificación, se hizo una dilución $\frac{1}{2}$ del suero en Tris- HCl 10 mM pH 8 (tampón a utilizar durante toda la purificación), luego se eliminaron algunas proteínas por *salting out*, con dos concentraciones distintas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Primero con 20 % de saturación e incubando durante

30 minutos a 4 °C, se centrifugó a 14600 xg y se recuperó el sobrenadante. A continuación se agregó 50 % de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e incubó durante 3 horas a 4°C y se centrifugó como en el paso anterior. Se recuperó el pellet y se resuspendió en el volumen inicial, es decir, el volumen del suero diluido, finalmente la muestra se transvaso a una bolsa de diálisis Spectra/ Por ® 3 y se dializó con 2 L del mismo tampón durante toda la noche a 4°C y agitación suave.

Posteriormente, la muestra fue cargada en una resina DEAE-52 *Wathman* previamente equilibrada con Tris- HCl 10 mM pH 8. Luego se realizó un lavado con el equivalente a 5 volúmenes de la resina utilizando el mismo tampón para equilibrar y por último se eluyeron las IgG con 40 mM de NaCl disuelto en 10 volúmenes del mismo tampón. El flujo de la columna durante la purificación fue de 1 gota cada 10 segundos colectando fracciones de 1,5 ml.

La purificación fue visualizada mediante SDS-PAGE siguiendo el método descrito en la sección 2.2. Para determinar el peso molecular de las proteínas en el gel, se hizo una gráfica del logaritmo del peso molecular versus el frente de corrida (distancia recorrida por la proteína) de los marcadores. A partir de la ecuación de la regresión lineal de esta gráfica, se calcularon los pesos moleculares de las proteínas.

Las fracciones correspondientes a las IgG purificadas se unieron en un pool y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Lowry. Este valor indica los miligramos de proteína iniciales al momento de conjugar a las partículas.

A modo de confirmar que las proteínas purificadas eran IgG se utilizó el método de detección de antígenos múltiples MABA, como se describe en la sección 2.4.2.

2.7 Conjunción de IgG a partículas superparamagnéticas BcMag™ Epoxi-Activadas

Se siguió la metodología de conjunción recomendado por la casa comercial *BIOCLONE Inc* para BcMag™ Epoxi-Activadas con algunas modificaciones.

2.7.1 Concentración de las IgG

Para disminuir el volumen de solución que contenía las IgG luego de la purificación (aprox. 30 ml), hasta obtener la concentración recomendada por la casa comercial (1- 10 mg/ml) e incubar con las partículas, las IgG se precipitaron toda la noche con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80 % de saturación. Se centrifugó a 14600 xg por 30 minutos a 4 °C y se resuspendió el pellet en 1 ml de tampón de conjunción (20 mM de Na_2HPO_2 y 20 mM de Na_3PO_4 , pH 11), luego las IgG se transfirieron a una bolsa de diálisis Spectra/ Por ® 3 y se dializaron contra 2 L del mismo tampón por 8 horas a 4 °C y agitación suave.

2.7.2 Conjugación

Como paso previo a la conjugación, las partículas a utilizar se transfirieron a un tubo de microcentrífuga, luego el tubo se colocó en el separador magnético durante 4 minutos (momento en el que todas las partículas se encuentran pegadas a la pared del tubo) y se removió el sobrenadante, el pellet de partículas se resuspendió en tampón de conjugación (20 mM de Na_2HPO_2 y 20 mM de Na_3PO_4 , pH 11) y se sónico 3 veces con intensidad 3 con una duración de 1 segundo cada uno, esto se repitió 4 veces más (procedimiento de lavado de partículas que se utilizó durante todo el periodo de experimentación). Luego de los lavados, se agregó la solución con las IgG dializadas, se mezcló todo con sonicación (3 impulsos de intensidad 3 y de 1 segundo c/u) y se incubó por 72 horas a 4 °C y agitación constante, se lavaron nuevamente las partículas, pero en este caso utilizando para los dos primeros lavados tampón de conjugación y para las otras tres solución de bloqueo para partículas (etanolamina 1 M, pH 9). El sobrenadante inicial y los dos primeros lavados se almacenaron a 4 °C para cuantificar la concentración de IgG no conjugadas por el método de Lowry.

Hecho el último lavado, las partículas conjugadas a IgG se incubaron con 1 ml de la solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C y agitación constante, se hicieron los lavados correspondientes con tampón de almacenamiento (20 mM de NaH_2PO_2 y 20 mM de Na_2HPO_4 , pH 7,2) y se almacenaron en el mismo tampón con 0,02 % de azida de sodio a 4 °C hasta su uso.

Para determinar la cantidad de proteína conjugada a las partículas, se hizo una sustracción de los miligramos de IgG purificados (calculados por Lowry), menos los miligramos en el sobrenadante luego de la incubación con las partículas. La eficiencia de conjugación se calculó relacionando los miligramos de IgG conjugados entre los miligramos de partículas empleados y comparando estos valores con los propuestos por la casa comercial BIOCLONE.

2.7.3 Reconocimiento antígeno-anticuerpo

Las IgG recuperadas en el sobrenadante luego de la incubación con las partículas, fueron evaluadas por MABA y Dot Blot para determinar si había pérdida en la capacidad de reconocimiento de los antígenos luego del tratamiento alcalino de conjugación. Para IgG α - ENO y α - Pgr24 se empleó la metodología descrita en la sección 2.4.2 y para α - FM de *T. evansi* la descrita en 2.4.3.

2.7.4 Rendimiento de conjugación

Se determinó la eficiencia de conjugación de IgG/ α - ENO a las partículas utilizando dos pHs distintos en el tampón de conjugación uno a pH 10 y otro 11. La purificación de los anticuerpos se realizó como se describe en la sección 2.6 y la conjugación como en la sección 2.7. Es de destacar que

luego de la purificación de IgG, el volumen del pool de purificación fue dividido en dos partes iguales, luego se precipitaron las IgG con 80 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y al momento de dializar, uno se hizo con tampón de conjugación a pH 10 y el otro a pH 11. Los miligramos de partículas empleados para cada condición fueron los mismos (7,5 mg).

2.8 Partículas paramagnéticas conjugadas a IgG

Las partículas conjugadas a IgG fueron sometidos a diferentes pruebas a lo largo del periodo experimental, se evaluó la presencia de las IgG sobre la partícula, el tipo de enlace entre la partícula y la IgG, el reconocimiento de antígenos recombinantes y nativos por parte de las IgG conjugadas a las partículas y la estabilidad de la IgG conjugada a la partícula.

2.8.1 Detección de IgG conjugadas a las partículas paramagnéticas

La presencia de IgG unidas a las partículas se puso de manifiesto, en la disminución de la concentración de IgG en la solución de conjugación luego del tiempo de incubación. Para confirmar esto, se realizó un inmunoensayo tipo ELISA directamente sobre la partícula e incubando con anticuerpo conjugado a una enzima reportera. Se utilizaron partículas conjugadas a IgG (α - ENO, α - Pgr24, α - PPK, α -FM de *T. evansi* y con las IgG totales de un paciente crónico) 150 μg por ensayo, las cuales fueron bloqueadas con 1 % (p/v) de leche descremada en tampón fosfato salino para ELISA durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación. Pasado el tiempo de incubación se hicieron 5 lavados a las partículas con el mismo tampón sin leche (300 μl) y se incubó con el anticuerpo secundario: α -IgG de conejo (para partículas con IgG α - ENO, α - Pgr24, α - PPK, α -FM de *T. evansi*) y α -IgG humano (para partículas conjugadas a IgG de un paciente crónico), ambos en una dilución 1/12000 en 300 μl de solución de incubación para ELISA. La mezcla se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave. Nuevamente se hicieron 5 lavados a las partículas con tampón ELISA y se procedió al revelado. Como controles se emplearon partículas con IgG incubadas solo con solución de revelado, partículas sin sensibilizar y bloqueadas con etanolamina/leche descremada e incubadas con el anticuerpo secundario y con solución de revelado.

El revelado se realizó con 200 μl de solución de revelado del kit *CruziElisa*, incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos, la reacción se detuvo con 100 μl de HCl 0,5 M. Luego se colocó el tubo de reacción en el soporte magnético por 3 min y se tomó el sobrenadante, que fue transferido a pozos de placas de ELISA (modelo COSTAR), los valores de absorbancia fueron medidos en un lector de ELISA (BIOLATIN CPD 212).

Los resultados de absorbancia fueron evaluados con el software de estadística *SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)*. Primero se analizó el tipo de distribución de los datos para luego realizar una prueba de contraste no paramétrica (Kruskal-Wallis).

2.8.2 Determinación del tipo de interacción entre las partículas paramagnéticas y las IgG

La casa comercial BIOCLONE plantea que la unión entre las partículas y el ligando ocurre por la formación de un enlace covalente mediado por el grupo epoxi adherido a la partícula. Para poner esto a prueba y dilucidar el tipo de enlace entre las partículas y las IgG, se trató de separar el anticuerpo conjugado a la partícula con un agente reductor y calor. Se emplearon partículas conjugadas con IgG (α - ENO, α -Pgr24 y α -PPDK). 105 y 210 μ g de partículas con IgG/ α -ENO y 150 μ g de partículas con IgG (α -Pgr24 y α -PPDK). Estas fueron lavadas 5 veces (con tampón fosfato salino para ELISA) y se les agregó 60 μ l de tampón de carga para realizar una desnaturalización calentando a temperatura de ebullición por 10 min. Seguidamente se centrifugó por 30 segundos a máxima velocidad en una centrifuga Eppendorf y finalmente se cargaron 30 μ l del sobrenadante por pozo en un gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las proteínas corridas a partir de partículas con IgG (α - ENO y α -PPDK) fueron transferidas a membranas de PVDF para realizar un Western blot como se describe en la sección 2.4.1 y las correspondientes a partículas con IgG/ α -Pgr24 fueron visualizadas por tinción del gel con azul de Coomassie.

Adicionalmente se realizó un ensayo tipo ELISA (como se describe en la sección anterior), empleando 150 μ g de partículas conjugadas a IgG (α -ENO y α -PPDK) previamente desnaturalizadas, las cuales se incubaron con α -IgG de conejo acoplado a peroxidasa. La visualización de los resultados se realizó de manera cualitativa y no mediante el lector de ELISA.

2.8.3 Captura de antígenos recombinantes con IgG conjugadas a partículas paramagnéticas

Para evidenciar que las IgG conjugadas a las partículas no habían perdido la capacidad de reconocer a los antígenos luego de las condiciones alcalinas de conjugación, se diseñaron dos metodologías:

Método A

Se emplearon 105 μ g por ensayo de partículas conjugadas a IgG (α -ENO y α -Pgr24); las cuales fueron incubadas con los respectivos antígenos recombinantes purificados durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación. Seguidamente se lavaron las partículas 5 veces con 300 μ l de tampón para

ELISA y se agregó 60 µl de tampón de carga para realizar una desnaturalización calentando a temperatura de ebullición por 10 min. Se centrifugó a máxima velocidad en una centrifuga Eppendorf y el sobrenadante obtenido se cargó en un gel de poliacrilamida al 12 % (SDS-PAGE) para posteriormente realizar un Western blot como se describe en la sección 2.4.1.

Método B

Se emplearon partículas conjugadas a IgG (α - ENO, α -Pgr24 y α -PPDK). Para partículas con IgG/ α - ENO se usaron 75 µg, los cuales fueron incubados por una 1 hora a temperatura ambiente y agitación (**condiciones a utilizar para el resto de las incubaciones**) con solución de bloqueo 1% (p/v) de leche descremada en 300 µl de tampón fosfato salino para ELISA. Seguidamente, se lavaron las partículas 5 veces con el mismo tampón sin leche (300 µl) y a continuación se incubó con la proteína enolasa recombinante de *T. cruzi*. Se hicieron nuevamente 5 lavados y se incubó con el anticuerpos primario (1/1000 de suero α -ENO hecho en ratón) se hicieron los lavados y se incubó con el secundario (1/8000 α - IgG de ratón) en 300 µl de solución de incubación para ELISA. Nuevamente se lavaron 5 veces las partículas y se procedió al revelado, este se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección 2.8.1. Como controles se utilizaron: partículas conjugadas a IgG/ α -ENO incubadas con el anticuerpo primario (de ratón), secundario (α -IgG de ratón) y solución de revelado, partículas conjugadas a IgG/ α -ENO incubadas solo con el anticuerpo secundario y solución de revelado y partículas conjugadas a IgG/ α -ENO tratadas solo con solución de revelado.

Para partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 se siguió el mismo procedimiento descrito arriba con algunas modificaciones; se utilizaron 150 µg de partículas conjugadas por tratamiento, las cuales fueron incubadas con aprox. 40 µg de la proteína Pgr24 recombinante, el anticuerpo primario fue una dilución 1/20 de suero de un paciente crónico seropositivo para Chagas y el anticuerpo secundario una dilución 1/15000 de α - IgG humano. Como controles se utilizaron: partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 incubadas con anticuerpo primario (suero humano) y secundario (α -IgG humano), partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 incubadas con el anticuerpo secundario, partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 incubadas con el antígeno y partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 incubadas con el antígeno y el anticuerpo secundario.

De igual forma, para partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK se utilizaron 150 µg por tratamiento, las cuales fueron incubados con 100 µg de la proteína PPDK recombinante de *T. cruzi*. Como anticuerpo primario se usó una dilución 1/8000 de suero α -PPDK monoclonal y como secundario una dilución 1/8000 de α -IgG de ratón. Como controles se utilizaron: partículas sin IgG bloqueadas con etanolamina 1 M y leche descremada incubadas con el antígeno, anticuerpo primario, secundario y solución de revelado. Se probaron dos condiciones, en un caso haciendo todas las incubaciones en tampón fosfato salino para ELISA y en el otro con tampón para radio inmunoprecipitación (RIPA), este último con la intención de comprobar si ocurrían interacciones inespecíficas entre la partícula y las moléculas a conjugar en presencia de un tampón diferente al ELISA, generalmente utilizado para inmunoprecipitación. El revelado se realizó como se describe en la sección 2.8.1.

Los datos de absorbancia para el ensayo con conjugados α -Pgr24, fueron evaluados con el software de estadística *SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)*. Primero se analizó el tipo de distribución de los datos y luego se hicieron dos pruebas de contraste una no paramétrica (Kruskal-Wallis) y otra paramétrica (ANOVA de una vía) con un contraste post-hoc (T2 de Tamhane), esta última permite el análisis entre grupos de datos, donde las varianzas son desiguales.

2.8.4 Captura de antígenos naturales con IgG conjugadas a partículas paramagnéticas

2.8.4.1 Captura de antígenos en condiciones solubles

Se hicieron ensayos de captura de la proteína PPDK de *T. cruzi*, empleando como fuente un lisado de epimastigotes de la cepa EP crecidos en medio LIT. Para la ruptura de los parásitos se utilizó 100 μ l de un cultivo en fase exponencial tardía, este fue centrifugado a 1000 xg por 5 min y el pellet de parásitos fue lavado 2 veces con tampón isoosmótico glucosado. Seguidamente se adicionó 200 μ l de tampón para radio inmunoprecipitación 5x (RIPA) con 1/1000 de Cocktail de Inhibidores de proteasas; 1mM de PMSF; 0,5 mM de PPI; 1 mM de KF y 0,01 % de BSA. La muestra se sometió a 25 impulsos de sonicación de intensidad 5 de 1 segundo cada uno y se incubó por 45 min en hielo, se sonicó 10 veces más y se agregó 800 μ l de H₂O_a estéril para llevar el tampón RIPA a 1X, nuevamente se hicieron 20 sonicaciones y finalmente se centrifugó a 12000 xg por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se incubó toda la noche a 4 °C y agitación con 1,5 mg de partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK. Finalizado el tiempo de incubación se lavaron 5 veces las partículas con 800 μ l de tampón fosfato salino para ELISA y se agregó tampón de carga para hacer una desnaturalización por calentamiento a temperatura de ebullición por 15 min, como control se procedió con el mismo tratamiento pero sin BSA. La visualización de la PPDK eluida se realizó por Western Blot como se describe en la sección 2.3.1.

2.8.4.2 Captura de la proteína PPDK secretada/excretada por *T. cruzi* con partículas paramagnéticas conjugadas a IgG

Para la captura de la proteína PPDK secretada/excretada por *T. cruzi* se evaluaron dos fuentes:

- **Medio condicionado**

Se cultivaron epimastigote de la cepa YBM de *T. cruzi* en medio RPMI-1640 suplementado, tal como describen (Figuera y col., 2013; Raposo y col., 1996; Silverman y col., 2010) con algunas modificaciones.

Seguidamente se incubaron 3 mg de partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK durante 24 horas a 4 °C y agitación con 12 ml de medio de cultivo condicionado sin parásitos a pH 7,2; es importante acotar que el pH del medio fue corregido adicionando NaOH. Pasado el tiempo de incubación, se lavaron 5 veces las partículas con 1 ml para cada lavado de tampón isoosmótico glucosado y se agregaron 30 μ l de tampón de carga para realizar una desnaturalización calentando a temperatura de ebullición por 15 min, se centrifugó por 30 segundos a máxima velocidad en una centrifuga Eppendorf y se cargó todo el sobrenadante en un gel de poliacrilamida al 10 % (SDS-PAGE). Como control se incubaron (bajo las mismas condiciones) 3 mg de partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK con medio condicionado previamente ultracentrifugado a 105000 xg por 90 min a 4°C.

- **Sueros**

Para este ensayo se utilizaron 900 μ g (por tratamiento) de partículas conjugada a IgG/ α -PPDK, que fueron incubadas por 8 horas a 4°C y agitación suave con 200 μ l de diferentes tipos de sueros: (a) suero de un ratón NMRI infectado con la cepa YBM (ver sección:1.2.1), (b) el mismo suero anterior pero centrifugado a 1000 xg por 15 min para eliminar los parásitos, (c) suero de un ratón sano, (d) suero de un paciente chagásico en fase aguda y (e) suero de un paciente chagásico en fase crónica. A los sueros a, b y c se les agregó 1 mM de PMSF antes de la incubación. Una vez hecha la incubación, se lavaron las partículas 5 veces con 1 ml por lavado de tampón isosmótico glucosado y se agregó tampón de carga para hacer una desnaturalización calentando a temperatura de ebullición por 15 min. Se cargaron las muestras en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) para realizar tres Western Blot como se describe en la sección 2.4.1. Para revelar los Western se utilizaron tres tipos de antisueros en diferentes diluciones: 1/1000 de suero inmune α -Pgr24, 1/1000 α -PPDK y 1/20 del suero de un paciente crónico. Como anticuerpo secundario se utilizó 1/5000 de α -IgG de conejo y 1/1000 α -IgG humano. Como control se emplearon partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK tratados solo con tampón de carga.

Adicionalmente, se hicieron ensayos de viabilidad del parásito en el suero (a) antes y después de la incubación con las partículas. Para esto, se realizaron conteos con cámara de Neubauer y tinción con azul de Tripano 0,4 % en una relación 1:1 (suspensión celular: azul de Tripano).

2.8.4.3 Captura de parásitos de *T. cruzi* con partículas conjugadas a IgG mediante antígenos asociados a la membrana plasmática

- **Captura de epimastigotes de *T. cruzi***

Epimastigotes de la cepa EP crecidos en medio LIT 0,8 (400 μ l), fueron colectados por centrifugación a 1000 xg por 5 min y lavados 2 veces con 600 μ l de tampón isosmótico glucosado.

Asimismo, 150 µg de partículas conjugadas a IgG (α - ENO, α - Pgr24, α -PPDK y α - FM de *T. cruzi*) también fueron lavadas 5 veces con el mismo tampón (200 µl) como se ha descrito hasta ahora.

Se incubaron los epimastigotes con cada uno de los tipos de partículas conjugadas a IgG por 2.5 horas a temperatura ambiente y agitación. Pasado este tiempo, se eliminaron los parásitos libres (parásitos sin partículas adheridas) haciendo 3 lavados de las partículas con 200 µl de tampón isosmótico glucosado y utilizando el soporte magnético. El pellet final se resuspendió en 200 µl del mismo tampón, y se transfirió 5 µl de la muestra a un porta objeto para ser analizado con un microscopio de luz a 40x.

- **Captura de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi***

Para la captura de la forma sanguínea, se utilizaron 200 µl del suero de un ratón NMRI infectado con la cepa YBM de *T. cruzi* (ver sección 1.2.1), el cual fue diluido $\frac{1}{2}$ en tampón isosmótico y se le agrego 1 mM de PMSF. Se emplearon partículas conjugadas a IgG (α -ENO, α -FM de *T. cruzi* y las IgG del suero del paciente crónico) 150 µg para cada uno.

Se incubaron las partículas conjugadas a IgG con el suero de ratón por aproximadamente 20 horas, 7 horas a temperatura ambiente y agitación, 4 horas a 0 °C y 9 horas a 4 °C y agitación, tomando muestras de 5 µl cada 2 horas para ser analizadas con un microscopio de luz a 40x y 100x. También se realizó una tinción de Giemsa de los tripomastigotes sanguíneos, tomados 10 µl directamente del suero, este fue puesto sobre un portaobjeto, se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó con metanol 100 % por 1 min. La lámina fijada se trató por 10 min con 2 % de Giemsa en 1/5 de tampón Sorensen y se visualizó con el microscopio a 40x.

2.8.5 Microcopia

2.8.5.1 Inmunofluorescencia indirecta de epimastigotes capturados con partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24

Epimastigotes de la cepa EP crecidos en medio LIT (100 µl) y partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 (150 µg), fueron lavados como se describió en el apartado anterior. Seguidamente se incubaron por 2,5 horas a temperatura ambiente y agitación. Para aislar los parásitos unidos a partículas y eliminar el exceso de partículas, se colocó el tubo de incubación en el soporte magnético por 1 min y se tomó el sobrenadante; este fue tratado con 4 % de formaldehído por 3 min; 1,5 min en agitación suave y 1,5 min en el soporte magnético. Se lavó 3 veces con 500 µl de tampón isosmótico (tampón a utilizar a lo largo de toda la experiencia) y se resuspendió el sedimento obtenido, hasta obtener 10 parásitos por campo a 40 x. A continuación se agregaron 10 µl de la muestra en pozos hechos en portaobjetos de

vidrio previamente tratados con 0,01 % (v/v) de poli-L-lisina en H₂O_d y se dejó secar toda la noche a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se hidrataron los pozos y se incubaron con solución de bloqueo (BSA al 3% (p/v) y cloruro de amonio 50 mM en tampón isosmótico) por 30 min a 37 °C, se hicieron tres lavados con tampón isosmótico y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y en cámara húmeda con una dilución 1/100 de conjugado α -IgG de conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) con 1% (p/v) de BSA en el mismo tampón. Se lavaron 5 veces los pozos y se agregó 10 μ l de Mowiol (*Calbiochem*®) para finalmente fijar las láminas con un cubreobjetos. Para la visualización de las muestras se utilizó un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i. Como controles se emplearon parásitos tratados con α -IgG/FITC, parásitos incubados solo con las partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 y parásitos incubados con partículas sin IgG bloqueadas con etanolamina 1 M y leche descremada e incubadas con α -IgG/FITC.

2.8.5.2 Microscopía electrónica de barrido y transmisión de epimastigotes capturados con partículas conjugadas a α -PPDK

Se obtuvieron epimastigotes de *T. cruzi* unidos a partículas conjugadas a α -PPDK siguiendo la metodología descrita en la sección 2.8.4.3.

Para la visualización por microscopía electrónica de barrido, los parásitos unidos a las partículas fueron fijados con mezcla 3:3 (formaldehído 3%: glutaraldehído 3%) en tampón cacodilato 0,1 M pH 6,3 a 4 °C; luego se tomaron \approx 2 μ l de la muestra y se transfirieron a un porta muestra estándar de aluminio, donde se hizo una deshidratación durante 48 horas con un evaporador de alto vacío HITACHI modelo *HUS-5 GB*. Una vez deshidratada, la muestra fue cubierta con oro coloidal y se visualizó con un microscopio electrónico de barrido HITACHI *S-2500*.

Para la visualización por microscopía electrónica de transmisión, se siguió el procedimiento anterior hasta el fijado. Luego la muestra fue transferida a rejillas cubierta con formvar y óxido protegidas. Para luego ser resuspendidas *in situ* en una solución al 2,5 % (v/v) de ácido fosfotúngstico en tampón fosfato salino 0,1 M pH 7,2. Se procedió a la deshidratación a temperatura ambiente y se visualizó en un microscopio electrónico de transmisión HITACHI *H-7000*.

2.8.5.3 Microscopía electrónica de transmisión de vesículas extracelulares (VEs) capturadas con partículas conjugadas a α -PPDK

Para la visualización de VEs, se siguió el método de aislamiento de vesículas descrito en la sección 2.8.4.2 utilizando como fuente de VEs del suero del ratón infectado con la cepa YBM que incluye los parásitos y 600 μ g de partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK. Luego de 5 lavados de las vesículas unidas a las partículas, las vesículas fueron separadas mediante elución con 100 μ l de tampón de elución (ver la sección de materiales) incubándolos 10 min a temperatura ambiente y con agitación. Se recuperó el

sobrenadante (con el uso del soporte magnético) y se le agregó 50 µl de mezcla 3:3 (formaldehído 3%: glutaraldehído 3%) en tampón cacodilato 0,1 M pH 6,3. Se ultracentrifugó a 95000 x g por 1 hora y se resuspendió el sedimento con 100 µl de tampón cacodilato, nuevamente se centrifugó con las mismas condiciones y se realizó un proceso de post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% en tampón cacodilato a 4 °C durante 24 horas, con cuidado de no resuspender el pellet. A continuación, la muestra fue deshidratada con alcohol etílico en concentraciones ascendentes; 30 y 50 % (v/v) durante 20 min, dos veces con 80 % (v/v) por 30 min y dos veces al 100% (v/v) por 30 min. Por último, se incubó con óxido de propileno puro durante 30 min y se realizó una infiltración en resina epoxídica (Epon 812) en proporciones ascendentes de una mezcla de Epon 812: óxido propileno, v/v, 1:4; 2:3; 3:2; 4:1, y finalmente en Epon 812 puro; en cada paso, el material fue agitado constantemente durante 30 min. Finalmente, el material fue incluido en Epon 812 puro y llevado a la estufa, a 60°C, por 48 horas. Se hicieron tallados de las pirámides y cortes ultrafinos, para ser observados en un microscopio electrónico de transmisión HITACHI H- 7000.

2.8.6 Estabilidad en el tiempo de las IgG conjugadas

La estabilidad de las IgG conjugadas a las partículas fue evaluada determinando la capacidad de las IgG de reconocer al antígeno. Para esto se realizaron inmunoensayos tipo ELISA-sándwich como se describe en el apartado B de la sección 2.8.3 cada 15 días por 5 meses. Se emplearon partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 almacenadas en dos tipos de soluciones, una en tampón de almacenamiento (20 mM de NaH₂PO₂ y 20 mM de Na₂HPO₄, pH 7,2) y otras en diluyente de conjugado del Kit *CruziELISA*, ambos almacenados a 4 °C.

1. Obtención de anticuerpos policlonales α - fracción microosomal de *T. cruzi*

Se obtuvieron títulos de 1/8000 de α -FM de *T. cruzi* y de 1/4000 para *T. evansi* por dot blot (figura 6). Este resultado refleja de alguna forma que hay proteínas más inmunogénicas en la fracción microosomal de *T. cruzi* que en la de *T. evansi*, ya que los conejos fueron inoculados con las mismas concentraciones de proteínas y repeticiones de las dosis.

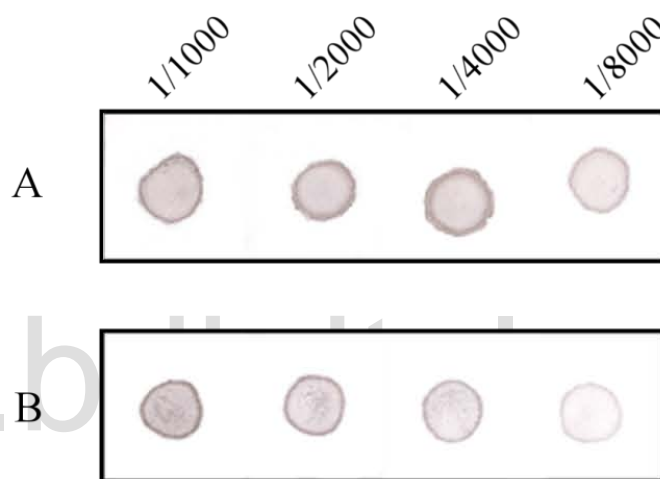


Figura 6. Titulación de anticuerpos α - FM. dot blots del antisuero α -FM de *T. cruzi* (A) y α -FM de *T. evansi* (B), se utilizaron las diluciones 1/1000, 1/2000, 1/4000 y 1/8000 de los sueros, Las membranas fueron sensibilizadas con 3 μ g de proteína de la FM correspondiente homogenizada previamente con un Potter. Como anticuerpo secundario se empleó α -IgG de conejo acoplado a la enzima peroxidasa. Se reveló con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno.

2. Purificación de IgG

Se purificaron las IgG totales, partiendo de diferentes antisueros incluyendo los producidos en este trabajo (α -FM de *T. cruzi* y de *T. evansi*). Se utilizaron antisueros hechos en conejos contra las proteínas recombinantes de *T. cruzi*: enolasa, Pgr24 y PPK y a partir del suero de una paciente chagásico crónico. Las IgG fueron purificadas a homogeneidad esencialmente en dos pasos, primero se eliminaron algunas proteínas (especialmente albúmina, la cual representa hasta el 45% de las proteínas totales del suero) por desplazamiento salino (*Salting out*), para luego realizar una cromatografía de intercambio iónico. En la figura 7, se muestra que las IgG fueron purificadas casi a homogeneidad

observándose la cadena pesada y ligera de las IgG, la cadena pesada con un peso aproximado de 55 kDa y la ligera de 25 kDa, estos corresponde a los pesos reportados para esta glicoproteína. También se observa una proteína contaminante de mayor peso molecular cercano a 90 kDa que coeluye junto con las IgG y que muy probablemente sea una γ -globulina que normalmente copurifica con las IgG (Elgert, 2009).

Cabe destacar que para la purificación de las IgG a partir de suero humano del paciente chagásico crónico, no fue necesario el paso de elución con 40 mM de NaCl en la columna de cromatografía iónica. La IgG se obtuvo pura solo con el lavado inicial (figura 7-F), este resultado indica que las IgG no se unieron a la resina (como ocurrió en el resto de las purificaciones).

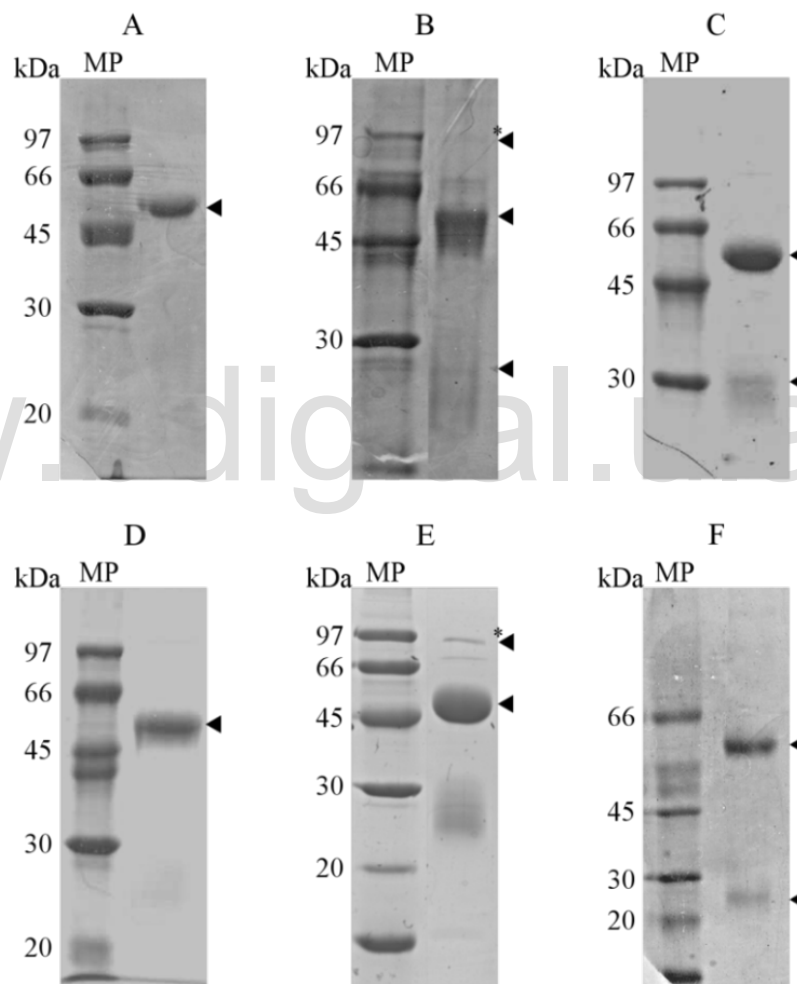


Figura 7. Purificación de IgG. SDS-PAGE de las IgG purificadas. Los productos de purificación fueron cargados en un gel de acrilamida al 12 % y teñidos con azul de Coomassie. Se purificaron las IgG a partir de antisueros α -FM de *T. cruzi*(A), α -FM de *T. evansi* (B), α - ENO(C), α -Pgr24 (D), α -PPDK (E) y las IgG de un suero de un chagásico crónico (F), las puntas de flecha indican las cadenas pesada y ligera de las IgG, 55 kDa y 25 kDa respectivamente, y las flechas con asteriscos una proteína que coeluye de alrededor de 90 kDa. **Abreviaturas, MP:** marcadores de peso molecular.

Las fracciones con las IgG purificadas se unieron en un pool y se cuantificó la concentración de proteínas por Lowry, con el fin de determinar los miligramos de IgG iniciales que fueron utilizados al momento de sensibilizar las partículas magnéticas.

Para corroborar que las proteínas purificadas eran IgG, se realizaron inmunoblots (MABA y dot blot), empleando diluciones seriadas del pool de purificación. Para la sensibilización de membranas de PVDF se utilizaron las proteínas recombinantes Pgr24 y ENO purificadas (figura 8) y el péptido quimera del kit *CruziElisa*, tanto la Pgr24 como el péptido fueron donados por el Laboratorio de Enzimología de Parásitos. Se evaluó las IgG purificadas a partir de antisueros α -ENO, α -Pgr24 y las IgG del suero del paciente chagásico crónico (figura 9). Obteniéndose que para los tres tipos de antisuero hay reconocimiento del antígeno. Este resultado verifica que las proteínas purificadas y observadas en los geles de SDS-PAGE eran IgG.

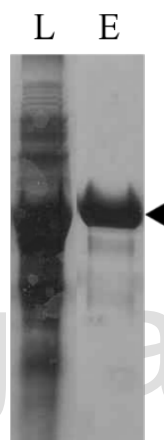


Figura 8. Purificación de enolasa recombinante de *T. cruzi*. Para la purificación se usó una resina de afinidad a metales regenerada con cloruro de níquel (IMAC). La proteína se une a la resina por la cola poli-His y se eluye con imidazol. Para verificar su pureza se realizó un SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12 % el cual se tiñó con azul de Coomassie. La punta de flecha indica la banda correspondiente a la enolasa de *T. cruzi* purificada. **Abreviaturas, L:** lisado celular de *E. coli* (cepa BL21) luego de la inducción y **E:** eluido o fracción de la proteína purificada.

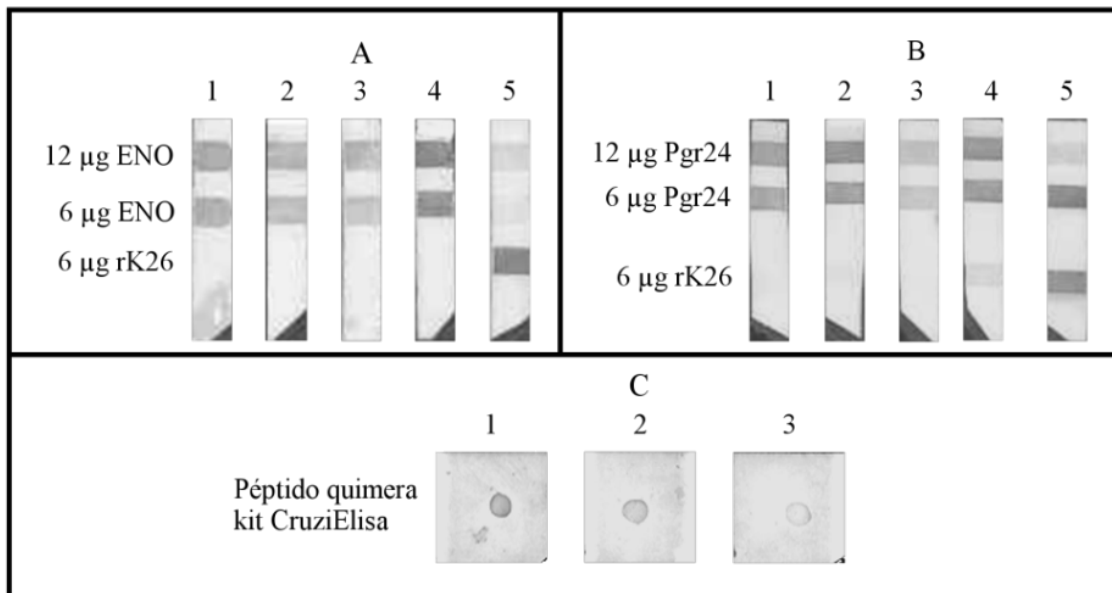


Figura 9. . Inmunoblots de los productos de purificación. MABA (A y B), dot blot (C). Las membranas de PVDF para MABA fueron sensibilizadas con 12 µg y 6 µg del antígeno correspondiente purificado (enolasa y Pgr24) y para el dot blot con 0,21 µg del péptido quimera del kit *CruziElisa*. Se probaron las fracciones purificadas a partir de los antisueros α- ENO (A), α- Pgr24 (B) e IgG del suero crónico (C). Las diluciones del pool fueron (1) 1/100, (2) 1/200 y (3) 1/500, (4) corresponde a 1/1000 del antisuero correspondiente sin purificar y (5) 1/1000 de antisuero α- rK26. Como anticuerpo secundario se utilizó α- IgG de conejo y α- IgG humano acoplado a la enzima peroxidasa. El revelado se hizo con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno.

3. Conjugación de IgG a partículas paramagnéticas

Las IgG purificadas fueron concentradas por *salting out* y resuspendidas en ≈ 1 ml en tampón de conjugación. Una vez concentradas las IgG se conjugaron con las partículas paramagnéticas como fue descrito en la metodología. En la tabla 4 y figura 10 se muestran los valores de IgG que se unieron por miligramo de partículas, obteniéndose que a medida que aumentan los miligramos de partículas empleados, aumentan los miligramos de IgG inmovilizados. El rendimiento de conjugación fue de 0,127- 0,263 mg_{IgG}/mg_{partículas}, resultado que concuerda con el rango de conjugación reportado por la casa comercial de las partículas de 0,033- 0,333 mg_{proteína}/mg_{partículas}.

Tabla 4. Conjugación de IgG a partículas paramagnéticas

mg de partículas	mg de IgG conjugados					
	α -ENO	α - Pgr24	α - FM <i>T. evansi</i>	α - FM <i>T. cruzi</i>	IgG paciente crónico	α - PPDK
6	-	0,78	0,89	-	-	-
7,5	1,83	-	-	1,37	1,49	-
15	3,82	3,95	-	-	-	2,92 \pm 0,57*
30	-	-	-	-	-	4,53

* Media aritmética y error estándar de siete eventos de conjugación.

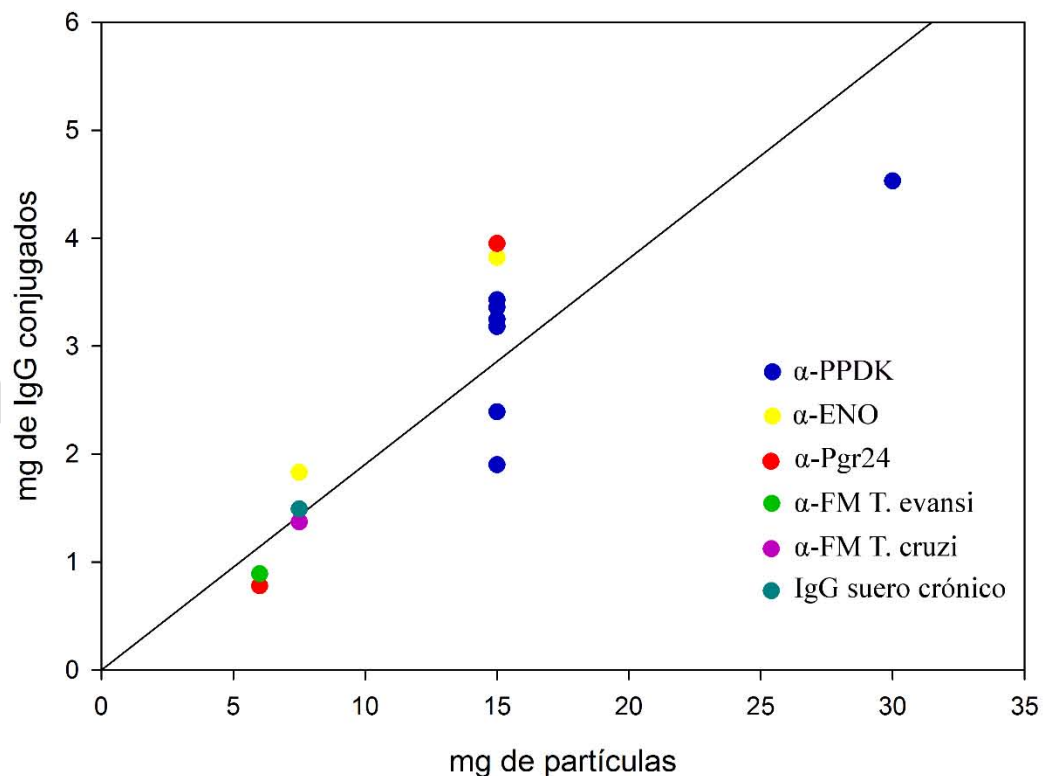


Figura 10. Miligramos de IgG conjugados por miligramo de partículas

Debido a que el pH de conjugación es muy alto (pH 11), se determinó si las IgG no conjugadas seguían teniendo la capacidad de reconocer los antígenos. Para esto, se realizaron MABA y dot blot de las IgG no conjugadas, evaluándose las IgG α - ENO, α - Pgr24 y α - FM de *T. evansi*. En la figura 11, se observa que las IgG del sobrenadante aún tienen la capacidad de reconocer a los antígenos. Esto sugiere que las IgG recuperan la conformación nativa al ser incubadas en tampón fosfato salino para inmunoblot a pH 7,4.

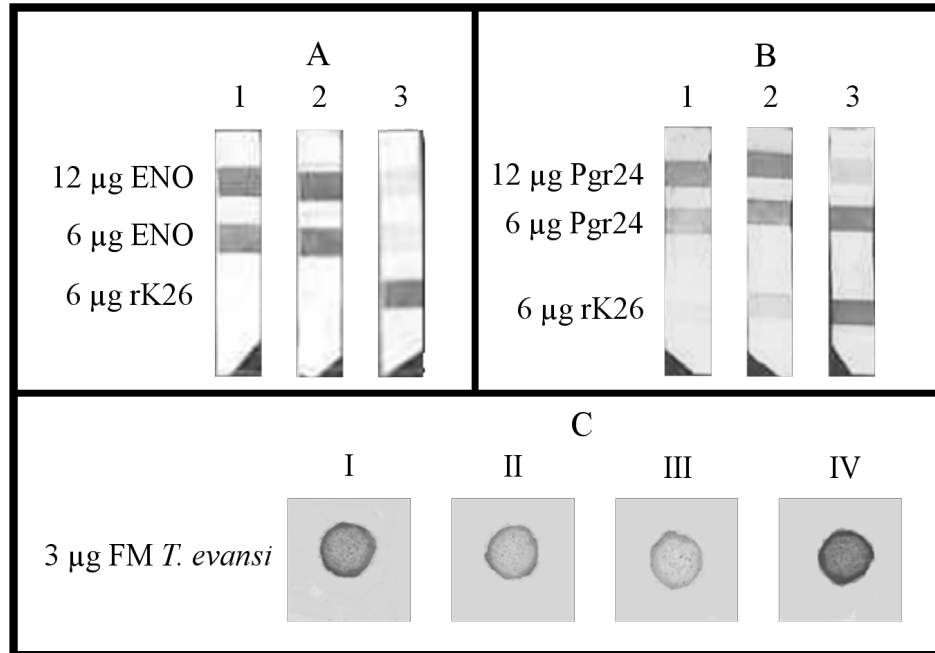


Figura 11. Inmunoblots de las IgG no conjugadas. MABA (A y B), dot blot (C). Las membranas de PVDF para MABA fueron sensibilizadas con 12 µg y 6 µg del antígeno correspondiente (enolasa y Pgr24) y para el dot blot (C) con 3 µg de la FM homogenizada con potter en presencia de Tween 20. En los paneles A y B se evaluaron las IgG no conjugadas α- ENO y α- Pgr24 respectivamente, haciendo una dilución 1/200 (1) del sobrenadante. (2) corresponden a una dilución 1/1000 del antisuero y (3) 1/1000 de antisuero α-rK26. En el panel C se evaluó las IgG no conjugadas a partir del suero α-FM de *T. evansi*, haciendo diluciones seriadas del sobrenadante: 1/100 (I), 1/200 (II) y 1/500 (III). (IV) corresponde a una dilución 1/1000 del antisuero. Como anticuerpo secundario se utilizó α-IgG de conejo acoplado a la enzima peroxidasa. El revelado se hizo con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno.

3.1. Rendimiento de conjugación

Se evaluaron los miligramos de IgG α - ENO de *T. cruzi* conjugadas por miligramo de partículas, empleando dos condiciones de pH en el tampón de conjugación uno a pH 10 y otro a pH 11. El mejor rendimiento fue obtenido a pH 11, el cual fue $\approx 10\%$ mayor que el de pH 10 (figura 12). Esto corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^{14}$ moléculas de diferencia.

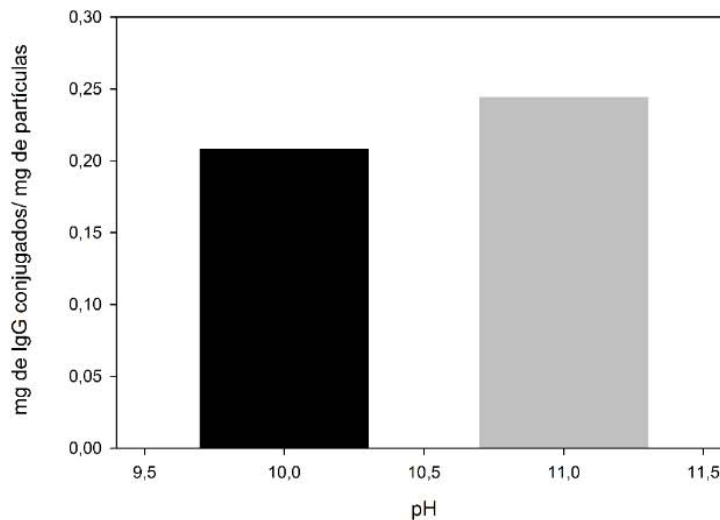


Figura 12. . Eficiencia de conjugación de IgG α -ENO de *T. cruzi* a partículas paramagnéticas bajo dos condiciones de pH (10 y 11).

4. Partículas paramagnéticas conjugadas a IgG

4.1 Detección de IgG conjugadas a las partículas paramagnéticas

Para detectar la presencia de las IgG sobre las partículas, se realizó un inmunoensayo tipo ELISA, usando como método de detección un segundo anticuerpo α -IgG acoplado a la enzima peroxidasa. Se evaluaron partículas conjugadas a IgG de conejo (α -ENO, α -Pgr24, α -PPDK, α -FM de *T. evansi* e IgG del suero de un paciente chagásico crónico). En la figura 13, se observa que los anticuerpos α -IgG detectan las IgG en la partícula paramagnéticas y además no interactúa de manera inespecífica con ella.

Estos resultados fueron analizados con el software de estadística SPSS, obteniéndose, que ninguno de los grupos de datos para cada tratamiento tienen una distribución normal (datos no mostrados). Esto era de esperar, ya que el número de muestras para cada tratamiento es pequeño (≤ 10); por lo que se realizó una prueba de contraste no paramétrico como es el Kruskal-Wallis, ver tabla 5; se obtuvo una p-value de 0,002; lo que indica, que existen diferencias estadísticas significativas entre las absorbancias obtenidas para cada tratamiento y estas diferencias no son producto del el azar.

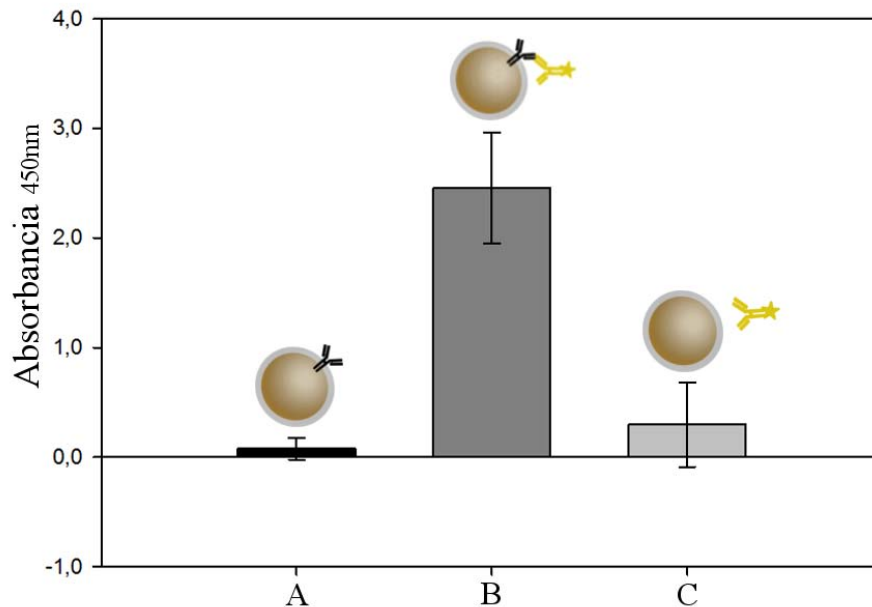


Figura 13. Inmunoensayo de la presencia de IgG sobre las partículas. Partículas con IgG incubadas con solución de revelado (A), partículas con IgG incubadas con α -IgG acoplado a peroxidasa y solución de revelado (B) y partículas sin IgG y bloqueadas, incubadas con α -IgG acoplado a peroxidasa y solución de revelado (C). Se emplearon los anticuerpos (α -IgG de conejo y de humano) acoplados a peroxidasa. El revelado se hizo con solución de revelado de Kit *CruziElisa*.

Tabla 5. Estadísticos- Prueba de Kruskal- Wallis

χ^2	12,255
<i>Df</i>	2,000
<i>P</i> -value	0,002

4.2 Determinación del tipo de interacción entre las partículas paramagnéticas y las IgG

Una vez verificada la presencia de la IgG sobre la partícula, se determinó si la unión ocurría por la formación de un enlace covalente o si se trataba de una interacción más débil (Van der Waals, hidrofóbica o iónicas). Para esto se utilizaron partículas conjugadas a IgG (α -ENO, α -Pgr24 y α -PPDK), los cuales fueron incubadas con tampón de carga (β -mercaptoetanol y/o ditiotretitol) y calentada a punto de ebullición durante 15 min. Los sobrenadantes fueron analizados por SDS-PAGE y Western blot. En la figura 14, se observa que las IgG α -ENO y α -Pgr24 no fueron liberadas de las partículas con este tratamiento, mientras que las IgG α -PPDK sí. No obstante, cuando las partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK (sometidas a desnaturalización) fueron lavadas e incubadas con α -IgG conjugado a peroxidasa se observó coloración, indicando que no todas las IgG conjugadas a las perlas

magnéticas se habían liberado. Este resultado indica que las interacciones predominantes entre las perlas paramagnéticas e IgG son de tipo covalente, similar a lo que reporta la casa comercial Bioclone.

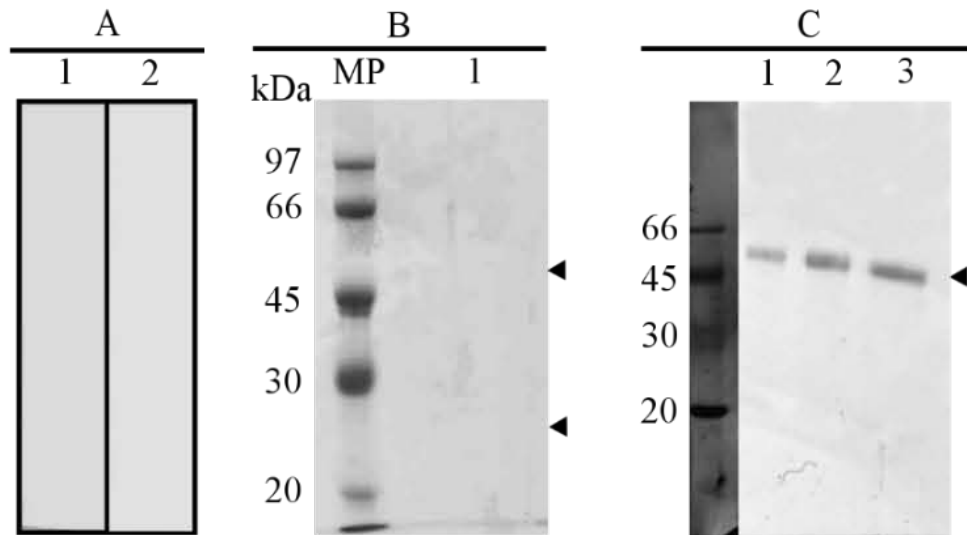


Figura 14. Determinación del tipo de interacción entre las partículas paramagnéticas y las IgG. Panel A y C Western blots de los sobrenadantes a partir de partículas conjugadas a IgG (α -ENO y α -PPDK) respectivamente; (B) SDS-PAGE del sobrenadante a partir de partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24. En (A) 1 y 2 indican los eluidos a partir de distintas cantidades de partículas conjugadas a IgG/ α -ENO (105 y 210 μ g respectivamente), en (B) 1 indica el eluido a partir de partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 y en (C) 1 y 2 el eluido a partir de partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK utilizando β -mercaptoetanol (tal como se usó en los demás ensayos) y en 3 con DTT. Como anticuerpo secundario se utilizó α -IgG de conejo acoplado a peroxidasa. El revelado se hizo con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno. Las puntas de flecha indican las bandas correspondientes a la cadena pesada.

4.3 Captura de antígenos recombinantes con IgG conjugadas a partículas paramagnéticas

Para determinar si las IgG conjugadas a las partículas reconocían al antígeno luego del proceso de conjugación se diseñaron dos metodologías.

- **Método A**

Se incubaron las proteínas recombinantes ENO y Pgr24 de *T. cruzi*, previamente purificadas (figura 15), con partículas conjugadas a IgG (α -ENO y α -Pgr24), respectivamente. Para luego ser sometidas a desnaturalización (calentando a temperatura de ebullición) en tampón de carga y liberar el

antígeno. En la figura 16, se observa la presencia de ambos antígenos, este resultado indica que las IgG conjugadas siguen conservando la afinidad por los antígenos después del tratamiento fuerte de conjugación.

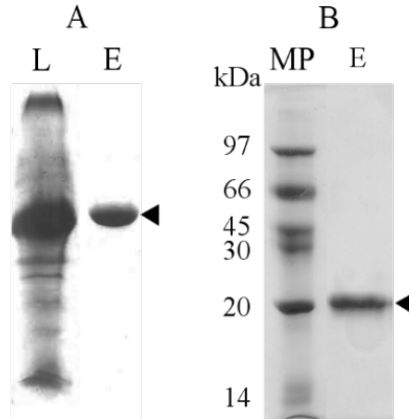


Figura 15. Purificación de las proteínas recombinantes enolasa y Pgr24. La purificación fue seguida por SDS-PAGE en geles al 12 % tiñendo con azul de Commassie, purificación de enolasa (A) y Pgr24 (B). Abreviaturas, L: lisado celular de *E. coli* (cepa BL21) luego de la inducción, E: eluido o fracción de la proteína purificada y MP: marcadores de peso molecular. Las puntas de flechas indican la banda que corresponde a la proteína purificada.

www.bdigital.ula.ve

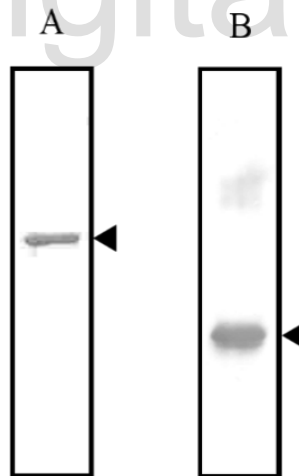


Figura 16. Reconocimiento de antígenos por parte de las IgG conjugadas a partículas. Western blot de las proteínas enolasa (A) y Pgr24 (B), las cuales fueron eluidas de partículas conjugadas a IgG/ α -ENO y α -Pgr24 respectivamente. Como anticuerpo primario se utilizó una dilución 1/500 de antisuero α -ENO hecho en ratón y 1/5000 de antisuero α -Pgr24 hecho en conejo. Como anticuerpo secundario se usó α -IgG de ratón y de conejo acoplados a peroxidasa. El revelado se hizo con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno. Las puntas de flecha indican la banda que corresponde a cada antígeno.

- **Método B**

Otro método que permitió determinar que las IgG (α -ENO, α -Pgr24 y α -PPDK) conjugadas a las partículas seguían la capacidad de reconocer a los antígenos, fue mediante un inmunoensayo del tipo ELISA-sándwich. En las figuras 17, 18 y 19, se observa que los tres tipos de IgG reconocen a los respectivos antígenos y que además ninguna otra molécula (antígeno, anticuerpo primario y anticuerpo secundario) interactúa de manera inespecífica con las partículas; con la excepción del control B utilizando partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 donde se observan valores altos de absorbancia, (figura 18).

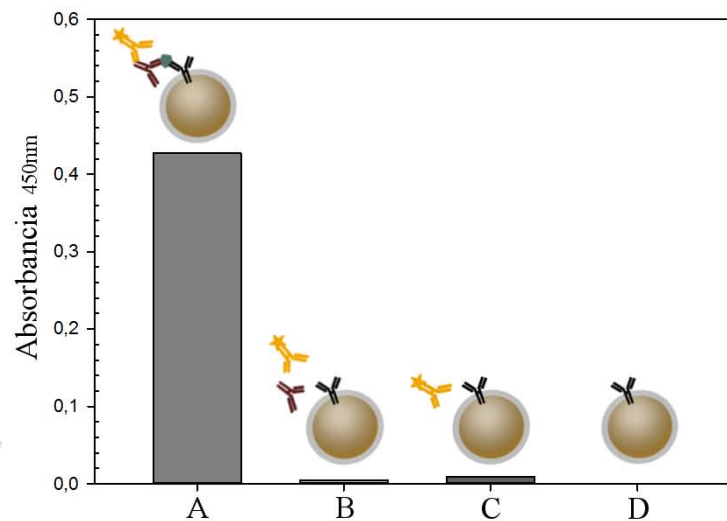


Figura 17. Reconocimiento del antígeno enolasa por parte de IgG/ α -ENO conjugadas a partículas. Se emplearon 75 μ g de partículas conjugadas a IgG/ α -ENO por ensayo. Los tratamientos fueron: partículas conjugadas a IgG/ α -ENO incubadas con enolasa, anticuerpo primario, secundario y solución de revelado (A); partículas conjugadas a IgG/ α -ENO incubadas con anticuerpo primario, secundario y solución de revelado (B); partículas conjugadas a IgG/ α -ENO incubadas con anticuerpo secundario y solución de revelado (C) y partículas conjugadas a IgG/ α -ENO incubadas con solución de revelado (D). El anticuerpo primario fue una dilución 1/1000 de antisuero α -ENO hecho en ratón y el secundario 1/8000 de α -IgG de ratón. Para el revelado se empleó solución de revelado del kit *CruziElisa*, deteniendo la reacción a los 4 min.

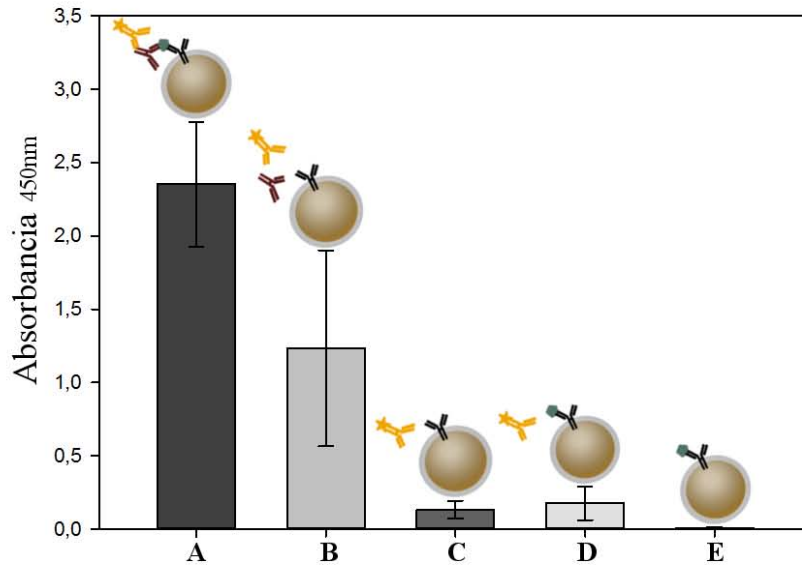


Figura 18. Reconocimiento del antígeno Pgr24 por parte de IgG/α-Pgr24 conjugadas a partículas. Se emplearon 150 μg de partículas conjugadas a IgG/α-Pgr24 por ensayo. Los tratamientos fueron: partículas conjugadas a IgG de conejo/α-Pgr24 incubadas con Pgr24, suero crónico, anticuerpo secundario y solución de revelado (A); partículas conjugadas a IgG/α-Pgr24 incubadas con suero crónico, anticuerpo secundario y solución de revelado (B); partículas conjugadas a IgG/α-Pgr24 incubadas con anticuerpo secundario y solución de revelado (C), partículas conjugadas a IgG/α-Pgr24 incubadas con Pgr24, anticuerpo secundario y solución de revelado (D) y partículas conjugadas a IgG/α-Pgr24 incubadas con solución de revelado (E). Como anticuerpo primario se utilizó 1/20 del suero de un paciente chagásico crónico y secundario 1/15000 de α-IgG humano. Para el revelado se empleó solución de revelado del kit *CruziElisa*, deteniendo la reacción a los 10 min.

Figura 18.

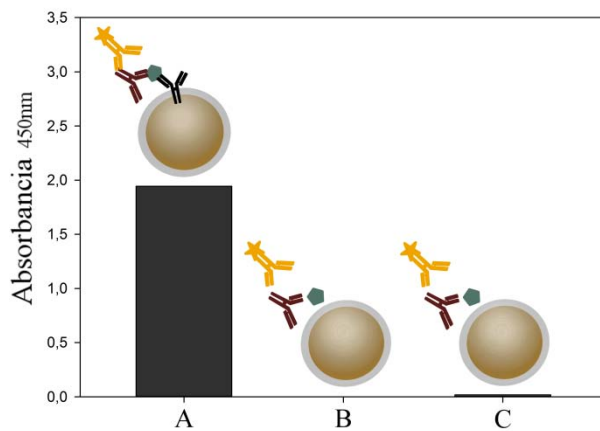


Figura 19. Reconocimiento del antígeno PPDK por parte de IgG/α-PPDK conjugadas a partículas. Se emplearon 150 μg de partículas

conjugadas a IgG/α-PPDK por ensayo. Los tratamientos fueron: partículas conjugadas a IgG de conejo/α-PPDK incubadas con PPDK, anticuerpo primario, anticuerpo secundario y solución de revelado (A); partículas sin IgG bloqueadas con etanolamina y leche descremada incubadas con PPDK, anticuerpo primario, anticuerpo secundario y solución de revelado (B) y partículas sin IgG bloqueadas con etanolamina y leche descremada incubadas con PPDK, anticuerpo primario, anticuerpo secundario y solución de revelado (C), para este último tratamiento se utilizó tampón RIPA en las incubaciones. Como anticuerpo primario se utilizó 1/8000 de α-PPDK monoclonal y secundario 1/8000 de α-IgG de ratón. Para el revelado se empleó solución de revelado del kit *CruziElisa*, deteniendo la reacción

Los resultados de absorbancia obtenidos con partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24, específicamente los tratamientos A y B (figura 18), fueron analizados con el software de estadística SPSS. En la figura 20, se observa que en ninguno de los tratamientos los datos tienen una distribución normal. Por ello, se realizaron dos pruebas de contraste un Kruskal- Wallis (prueba no paramétrica) y un ANOVA de una vía con un post-hoc T2 de Tamhane (prueba paramétrica). Obteniéndose un p-value de 0,000 (tabla 6) y una significación de 0,012 (tabla 7), ambos resultados indican, que las absorbancias obtenidas para cada tratamiento son diferentes, y que estas diferencias no son causadas por el azar, sino por el tratamiento *per se*.

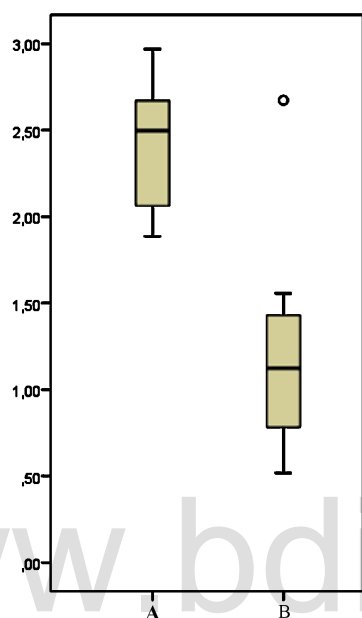


Figura 20. Distribución de los datos (reconocimiento del antígeno Pgr24 por parte de IgG/ α -Pgr24 conjugadas a partículas) tratamiento A y B. Los extremos de cada bigote de las barras indican el valor mínimo y máximo de los datos y la línea horizontal que corta las barras, la mediana, es decir el 50 % de los datos.

Tabla 6. Estadísticos- Prueba de Kruskal- Wallis entre tratamientos A y B con partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24

χ^2	39,408
Df	4,000
P-value	0,000

Tabla 7. Prueba de comparaciones múltiples T2 de Tamhane entre tratamientos A y B con partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Significación
Tamhane	A	B	1,18150*	0,27375	0,012
	B	A	-1,18150*	0,27375	0,012

4.4 Captura de antígenos naturales con IgG conjugadas a partículas paramagnéticas

4.4.1 Captura de la Piruvato Fosfato Dikinasa (PPDK) soluble con partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK

A partir de lisados de la forma epimastigote de la cepa EP de *T. cruzi*, se realizaron ensayos de inmunocaptura con partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK. Se probaron dos condiciones de captura, en presencia de 0,01 % (p/v) de BSA, el cual actúa como distractor de las proteasas y otra sin BSA. En la figura 21 (carriles S y N), se observa la presencia de la PPDK de 100 kDa y 75 kDa (González-Marcano, 2012). Sin embargo, solo en el carril E de la figura 21 (con BSA) se observa señal para PPDK con pesos moleculares menores a 75 kDa, este resultado indica, que las partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK captura al antígeno natural a partir del extracto de parásitos solo en presencia del distractor de proteasas.

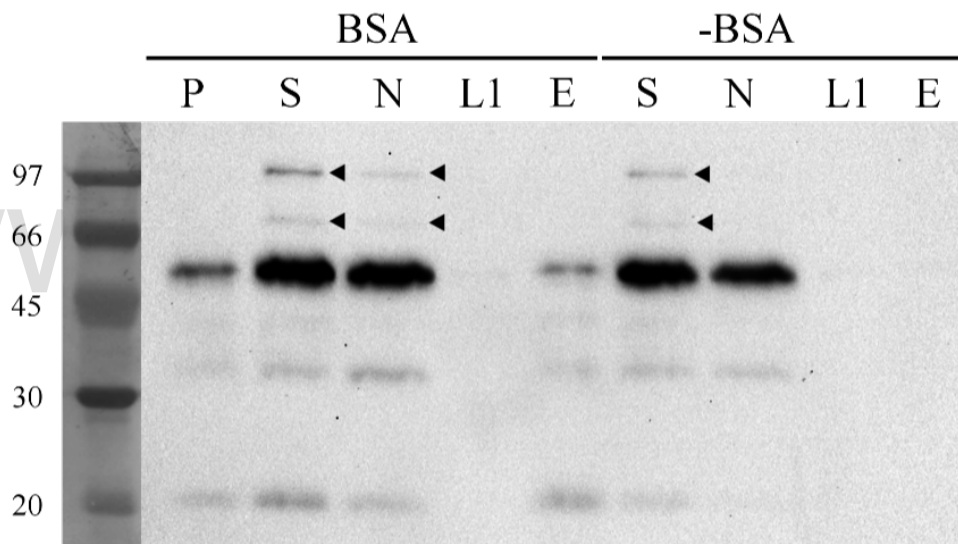


Figura 21. Captura de la proteína PPDK natural de *T. cruzi* con partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK. Western blot de la PPDK capturada a partir del lisado de epimastigotes. Los primeros cinco carriles corresponden al ensayo de captura con BSA y los últimos cuatro sin BSA. Como anticuerpo primario se usó una dilución 1/4000 de α -PPDK monoclonal y como secundario 1/8000 de α -IgG de ratón. Para el revelado se utilizó el sistema de revelado quimioluminiscente de Amersham (GE Healthcare), ECL Plus Western blotting Detection Reagents, según recomendaciones de la casa comercial. **Abreviaturas, P:** Pellet del lisado, **S:** Sobrenadante del lisado, fracción que se incubó con los conjugados, **N:** Fracción de proteínas del sobrenadante que no se unió a los conjugados, **L1:** primer lavado de los conjugados luego de la incubación con el lisado, **E:** proteínas eluidas a partir de los conjugados.

4.4.2 Captura de la proteína PPDK secretada/excretada por *T. cruzi* con partículas paramagnéticas conjugadas a IgG

Se realizaron ensayos de captura de la PPDK de *T. cruzi* a partir de dos fuentes: a) medio condicionado y b) sueros de pacientes y animales experimentales.

- **Medio condicionado**

Se incubaron partículas conjugadas a α -PPDK con medio condicionado (RPMI-1640) bajo dos condiciones: a) sobrenadante de una ultracentrifugación de un medio condicionado y b) medio condicionado sin ultracentrifugar. En la figura 22, se observa que el conjugado capturó proteínas con pesos moleculares que van desde un rango de 80 a 15 kDa, sin embargo con este resultado no se puede saber si todas las bandas son de PPDK (productos de degradación) o si son proteínas asociadas a la PPDK.

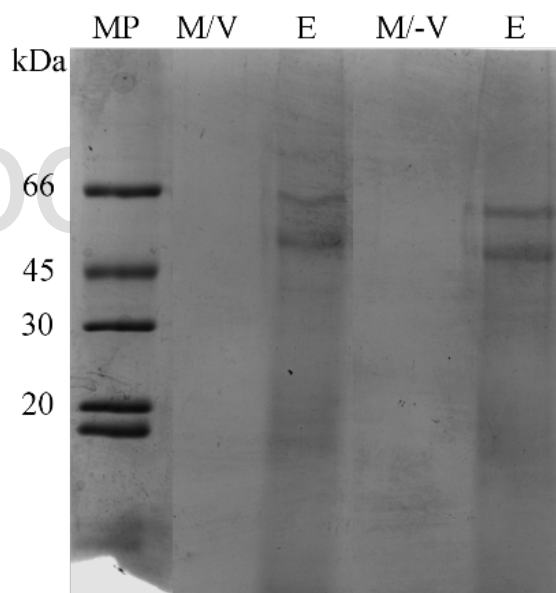


Figura 22. Captura de PPDK secretada/excretada por *T. cruzi* en medio condicionado, con partículas conjugadas a IgG α -PPDK. SDS-PAGE del producto de captura de partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK a partir de medio condicionado de epimastigotes de *T. cruzi*. **Abreviaturas:** M/V: medio condicionado sin ultracentrifugar e incubado con conjugados α -PPDK, M/-V: medio condicionado ultracentrifugado e incubado con conjugados α -PPDK, E: fracción eluida de los conjugados y MP: marcadores de peso molecular.

- **Sueros**

Se evaluó la capacidad de las partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK de capturar a la PPDK liberada por la forma tripomastigote sanguínea, en un medio más complejo (suero). Para esto se realizaron incubaciones de partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK con varios tipos de sueros: suero de un ratón infectado con la cepa YBM en fase aguda, suero de un ratón sano, suero de un paciente chagásico agudo y crónico. El volumen de suero y la concentración de conjugados (partícula/anticuerpo) fueron las mismas para cada incubación. En la figura 23-1, se observa que el perfil proteico es el mismo para el suero de ratón con parásitos y sin parásitos, indicando que las proteínas capturadas no son el resultado de la presencia del parásito, sino de proteínas presentes en el suero. Los conjugados (partícula/anticuerpo) también capturaron diversas proteínas en los sueros humanos, tanto en fase aguda como crónica (Figura 23-1). Para saber si las proteínas capturadas con las partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK y visualizadas en los geles eran el producto de la degradación de PPDK o proteínas que están formando un complejo con la PPDK capturada, se realizaron western blot y se revelaron con α -PPDK, α -PGR24 y suero de un paciente crónico. En las figuras 23-2, 23-3 y 23-4, se observa que hay bandas que de forma específica fueron reconocidas por α -PGR 24, α -PPDK y suero de paciente crónico. Estos resultados demuestran que las bandas de proteínas observadas en el SDS-PAGE son el producto de complejos proteicos capturados por la IgG/ α -PPDK conjugada a la partícula y no el producto de interacciones inespecíficas o de degradación de una proteína en particular (por ejemplo PPDK).

Por otro lado, en la figura 32, se observa que partículas conjugadas con IgG/ α -PPDK e incubadas con sueros (ratón y humano) agudos y suero humano crónico se aglutinan en presencia de vesículas extracelulares. Esto solo es posible si hay gran exposición de PPDK en la membrana de las vesículas.

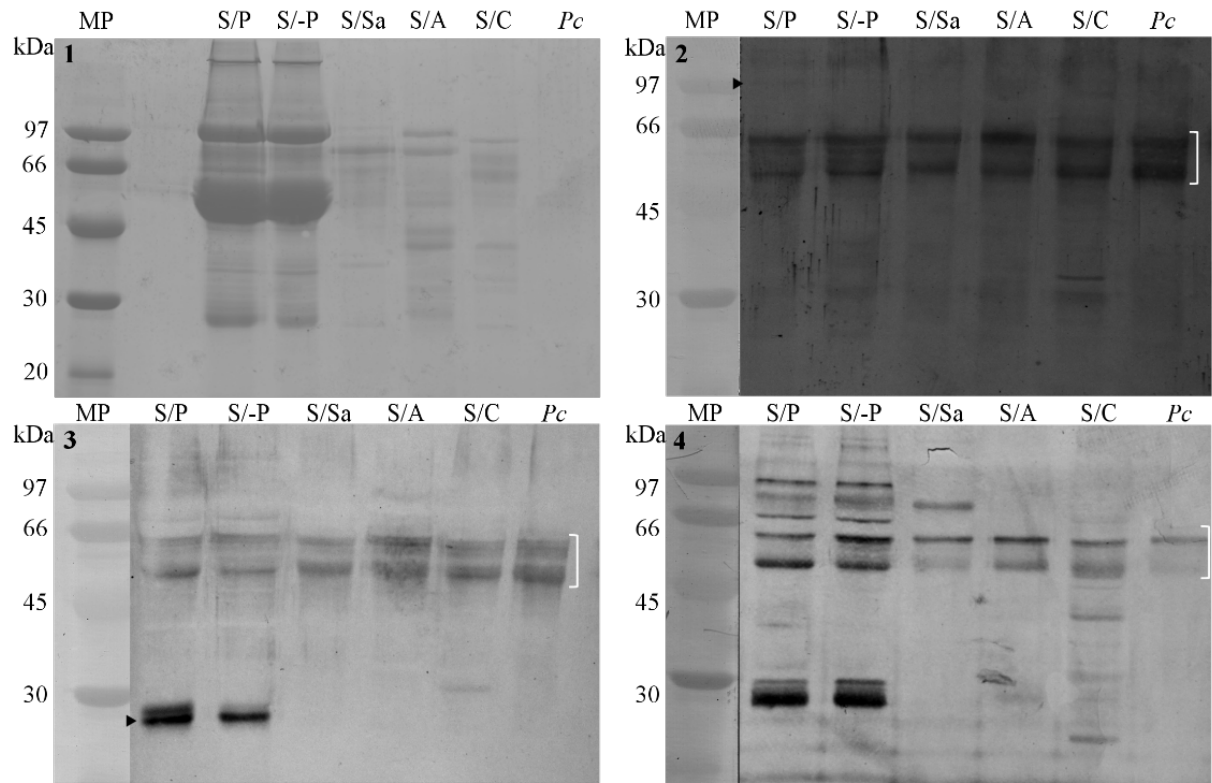


Figura 23. Captura de exoantígenos de secreción/excreción de *T. cruzi* en sueros, mediante partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK. SDA-PAGE (1) y Western blots (2-4). Se cargaron los eluidos producto de la incubación de partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK con diferentes tipos de sueros: suero de un ratón en fase aguda en presencia de tripomastigotes (S/P), el mismo suero anterior pero sin parásitos luego de centrifugar (S/-P), suero de un ratón sano (S/Sa), suero de un paciente chagásico agudo (S/A) y suero de un paciente crónico (S/C). (2) Western blot revelado utilizando 1/1000 de α -PPDK policlonal como anticuerpo primario y 1/5000 α -IgG de conejo acoplado a peroxidasa como secundario; (3) Western blot revelado con 1/1000 de antisuero α -Pgr24 y 1/5000 α -IgG de conejo y el (4) Western blot revelado con 1/20 de un suero de un paciente chagásico crónico y 1/1000 de α -IgG humano. El revelado se hizo con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno. Las puntas de flecha indican las bandas correspondientes a PPDK de 100 kDa (2) y Pgr24 de 24 kDa (3). Los corchetes indican la cadena pesada de las IgG que se despegaron de las partículas. **Abreviaturas:** *Pc*: control de partículas conjugadas tratados solo con tampón de carga, **MP**: marcadores de peso molecular.

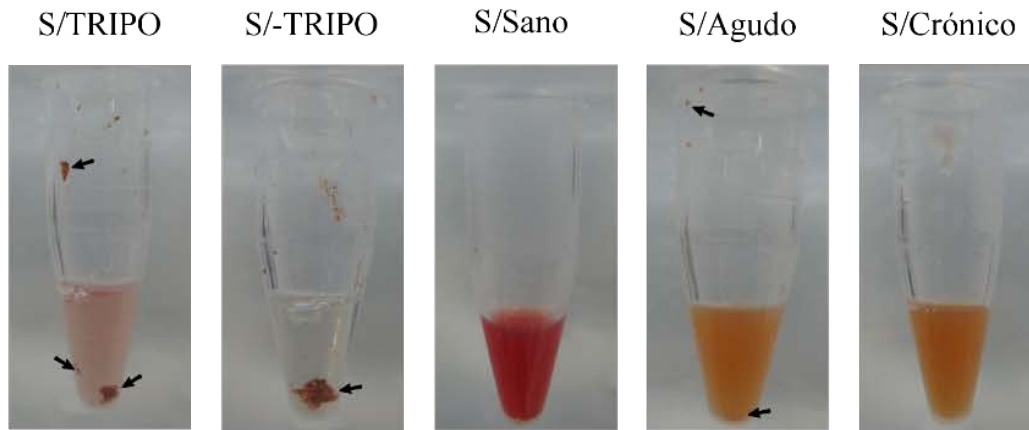


Figura 24. Incubación de partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK con diferentes tipos de suero. De derecha a izquierda; conjugado (partículas/anticuerpos) incubados con suero de un ratón NMRI infectado con la cepa YBM de *T. cruzi* (S/TRIPO); el mismo suero anterior pero sin parásito (removidos por centrifugación) (S/-TRIPO), suero de un ratón NMRI sano (S/sano), suero de un paciente chagásico agudo (S/agudo) y suero de un paciente chagásico crónico (S/crónico). Las flechas negras indican agregados de partículas.

4.4.3 Captura de parásitos de *T. cruzi* con partículas conjugadas a IgG mediante antígenos asociados a la membrana plasmática

- **Captura de epimastigotes de *T. cruzi***

Empleando partículas conjugadas a IgG (α -ENO, α -Pgr24, α -PPDK y α -FM de *T. cruzi*), se realizaron ensayos de captura de la forma epimastigote del parásito. Los parásitos se visualizaron por microscopía de luz. Obteniéndose que la mayoría de los conjugados (partícula/IgG) se adherían a la bolsa flagelar del parásito, a excepción de partículas conjugadas con IgG/ α -FM y α -ENO, que se unieron también en otras regiones de la membrana plasmática del parásito (figuras 25-28). Cabe destacar, que en la mayoría de los casos se podían observar hasta 5 parásitos con partículas adheridas por campo a 40 x, luego del tiempo de incubación.

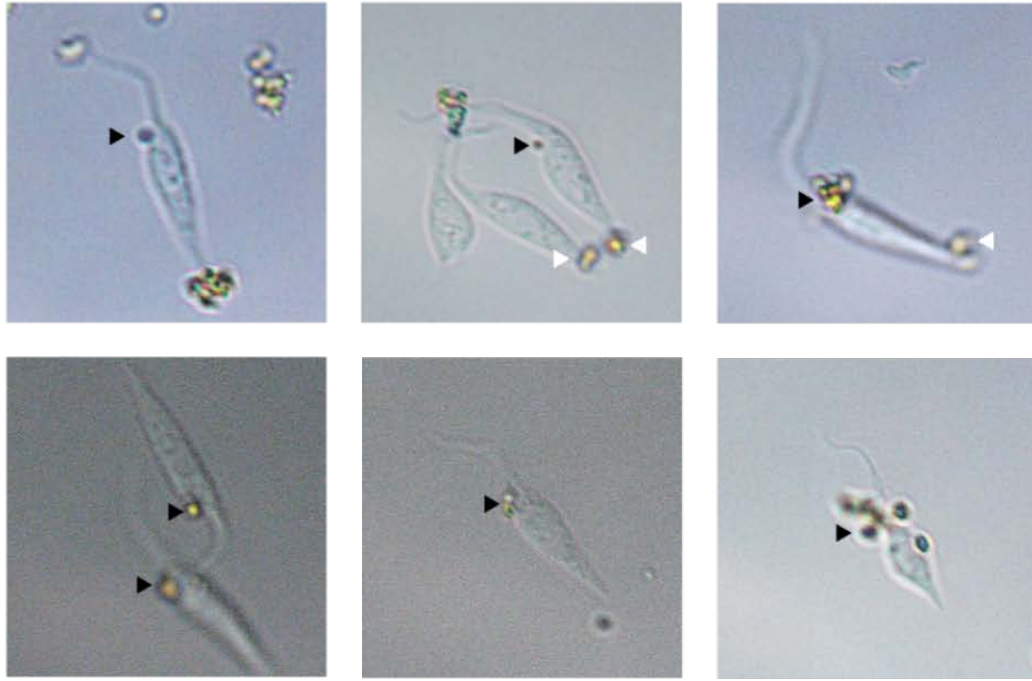


Figura 25. Captura de epimastigotes con partículas conjugadas a IgG/ α -ENO. Las puntas de flecha negras indican el sitio de unión de la partícula en la bolsa flagelar y las blancas en otra localización de la membrana.

www.bdigital.ula.ve

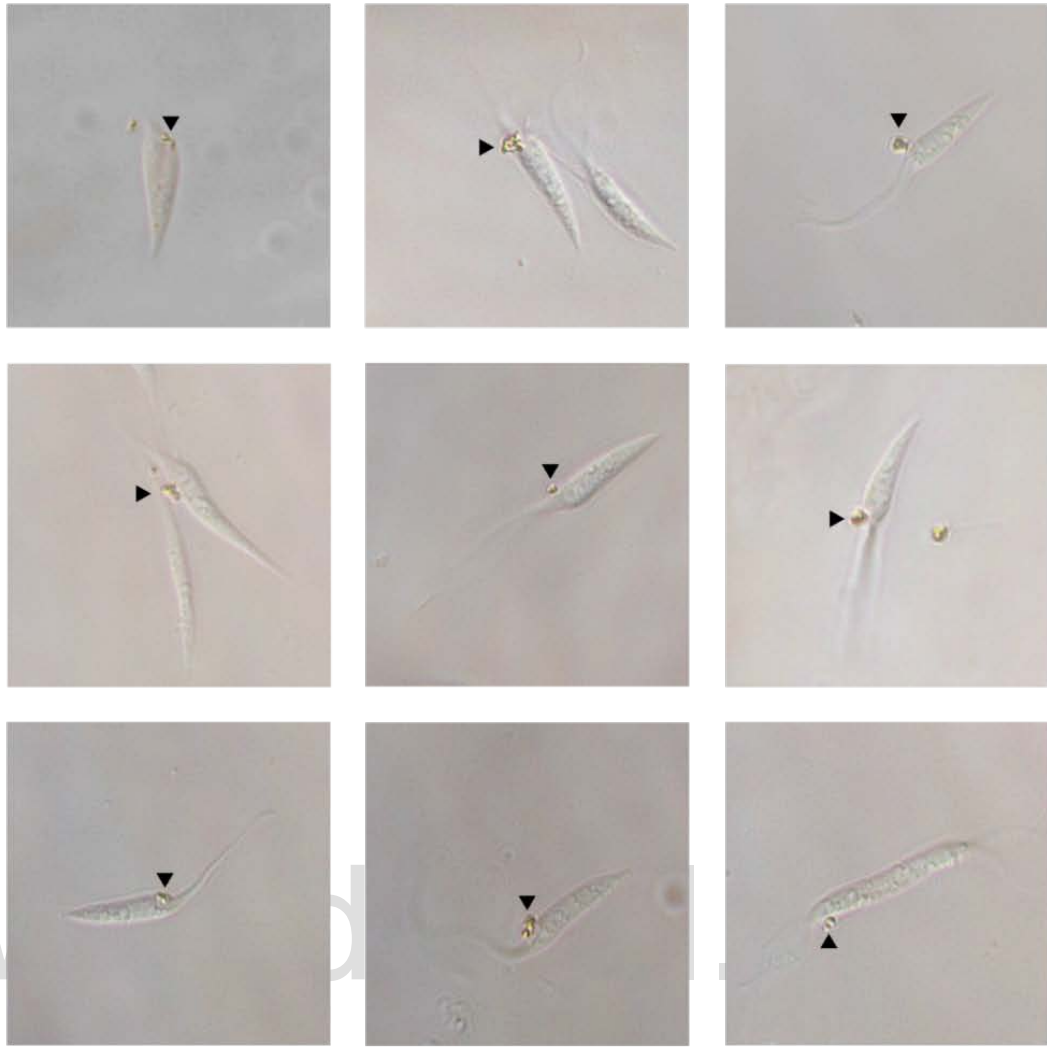


Figura 26. Captura de epimastigotes con partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24. Las puntas de flecha negras indican el sitio de unión de la partícula en la bolsa flagelar.

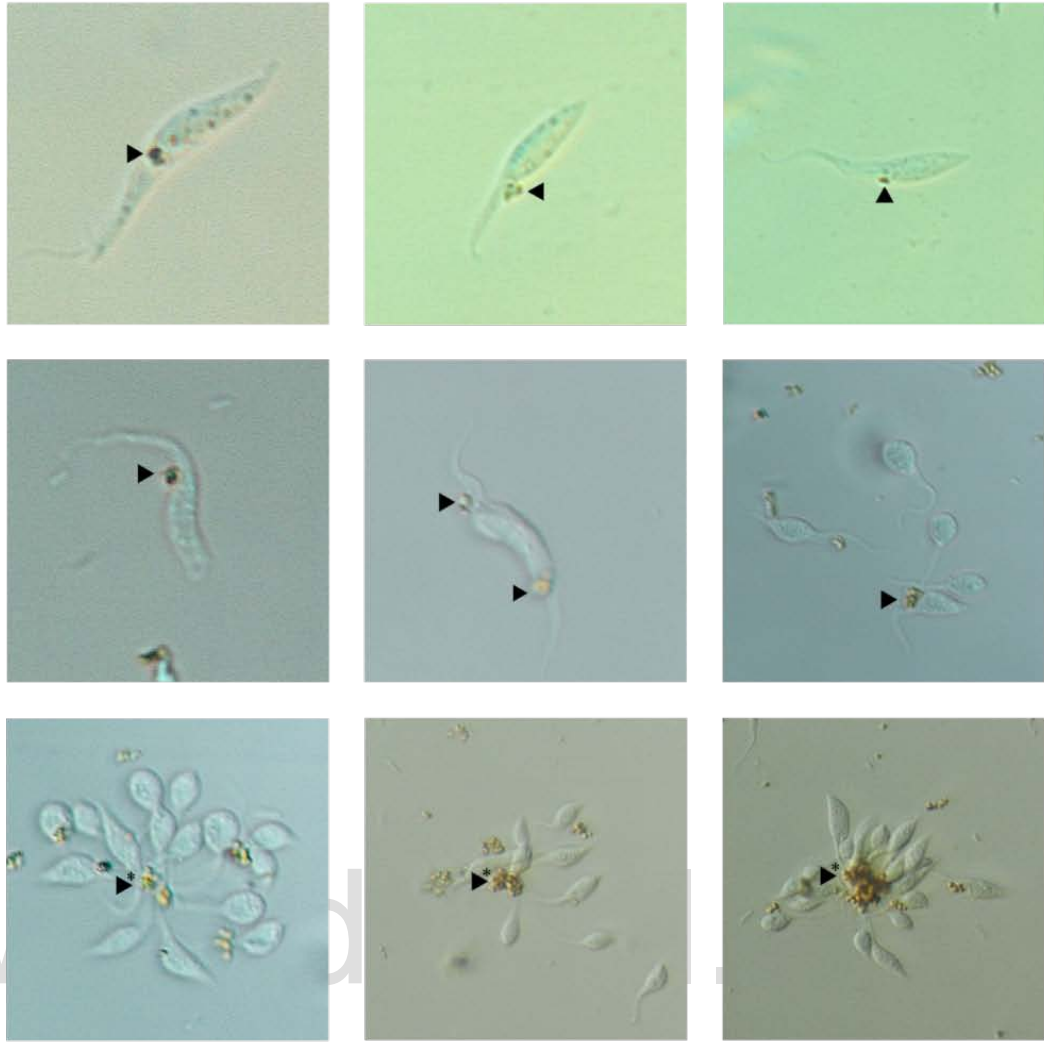


Figura 27. Captura de epimastigotes con partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK. Las puntas de flecha negras indican el sitio de unión de la partícula en la bolsa flagelar y las flechas con asteriscos, agregados partícula-epimastigotes.

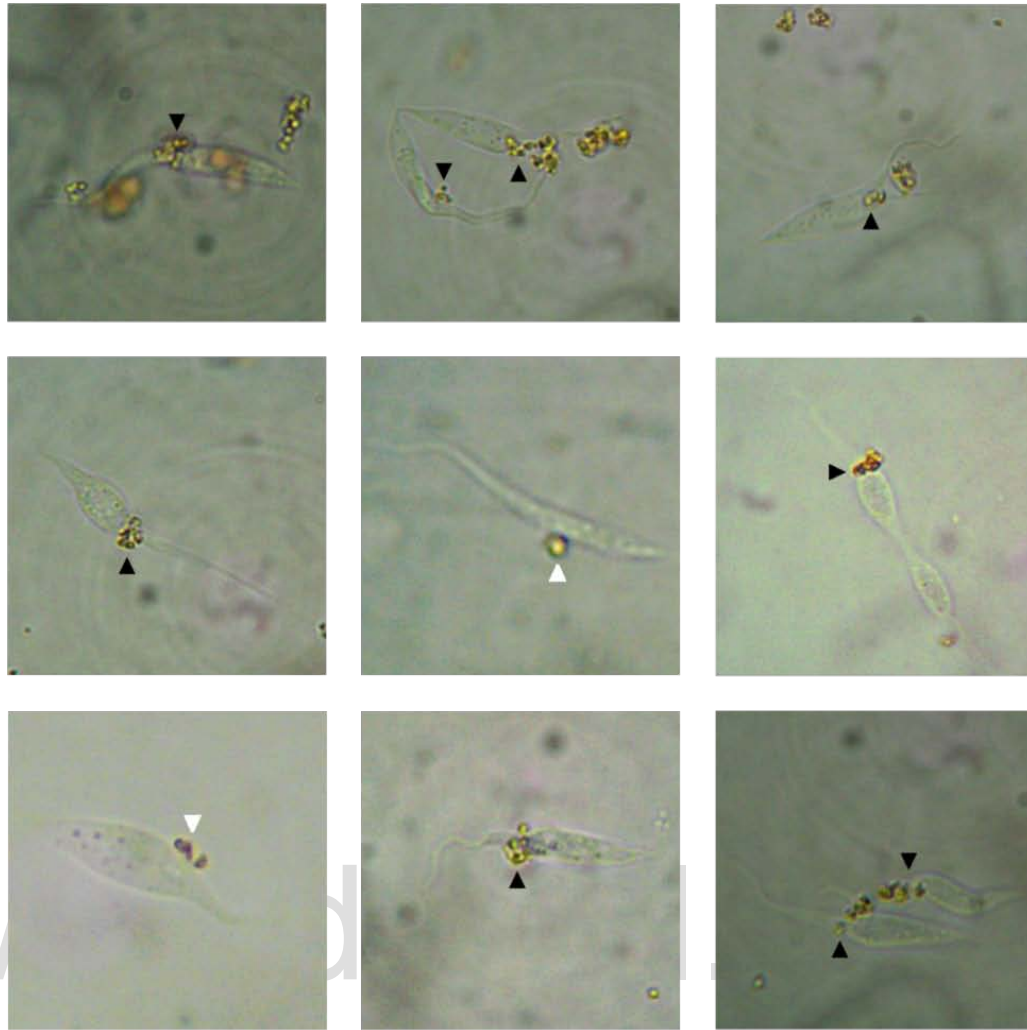


Figura 28. Captura de epimastigotes con partículas conjugadas a IgG/ α -FM. Las puntas de flecha negras indican el sitio de unión de la partícula en la bolsa flagelar y las blancas en otra localización de la membrana.

- **Captura de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi***

Partículas conjugadas a IgG (α -ENO, α -FM de *T. cruzi* y las IgG del suero de un paciente chagásico) fueron utilizados para los ensayos de captura de los tripomastigote sanguíneo de *T. cruzi*. Únicamente el conjugado de IgG obtenido de un paciente crónico fue capaz de unirse a los tripomastigotes (figura 29), siendo necesario un tiempo de incubación de 20 horas y disminución de la temperatura a 5°C (mezcla parásitos/conjugados), ya que se quería disminuir el efecto hidrodinámico del parásito. Sin embargo, la eficiencia de captura fue muy baja, a diferencia de los ensayos de captura de epimastigotes, pudiéndose observa 1 solo parásito por campo a 40 x.

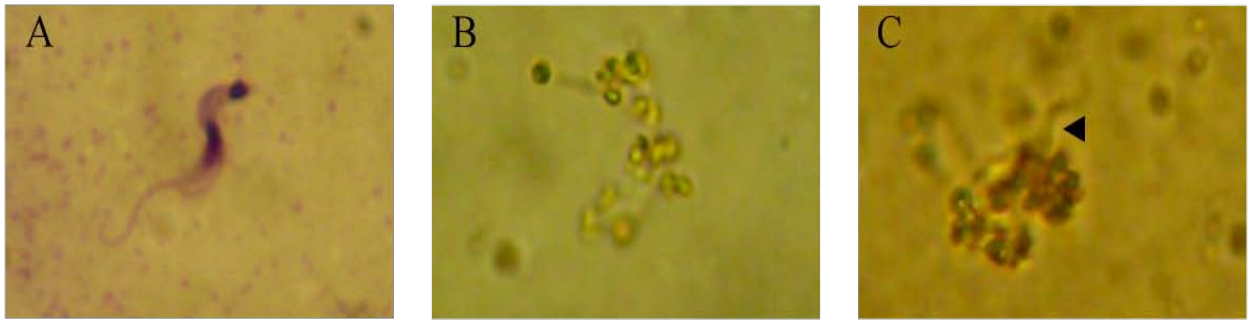


Figura 29. Captura de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* con partículas conjugadas a IgG de suero crónico. Tripomastigotes de *T. cruzi* coloreado con Giemsa (A); tripomastigotes unidos con los conjugados después de 20 horas de incubación (B y C). La flecha negra indica la posición del tripomastigote.

4.5 Microscopía

4.5.1 Inmunofluorescencia indirecta de epimastigotes capturados con partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24

Los epimastigotes unidos a partículas con IgG/ α -Pgr24 fueron visualizados en luz visible e inmunofluorescencia mediante un microscopio invertido de epifluorescencia. Las partículas con IgG/ α -Pgr24 se unieron a la bolsa flagelar de los epimastigotes (figura 30-A y 30-B) confirmando la localización previamente determinada donde se une este conjugado (partícula/anticuerpo); asimismo, partículas sin anticuerpo bloqueadas con etanolamina y leche descremada no se unen a los epimastigotes (figura 30-D). El marcaje de las partículas se hizo con el anticuerpo α -IgG de conejo acoplado a FITC, que emite fluorescencia en la región verde del espectro (rango de emisión 435–485 nm). Como se puede observar en la figura 30-A, las partículas unidas a la bolsa flagelar del epimastigote emiten fluorescencia, es decir la unión parásito-IgG/partícula efectivamente ocurre por la presencia del anticuerpo α -Pgr24. Sin embargo, partículas con IgG/ α -Pgr24 sin marcaje con FITC y partículas bloqueadas tratadas con FITC también emiten fluorescencia, pero con menor intensidad.

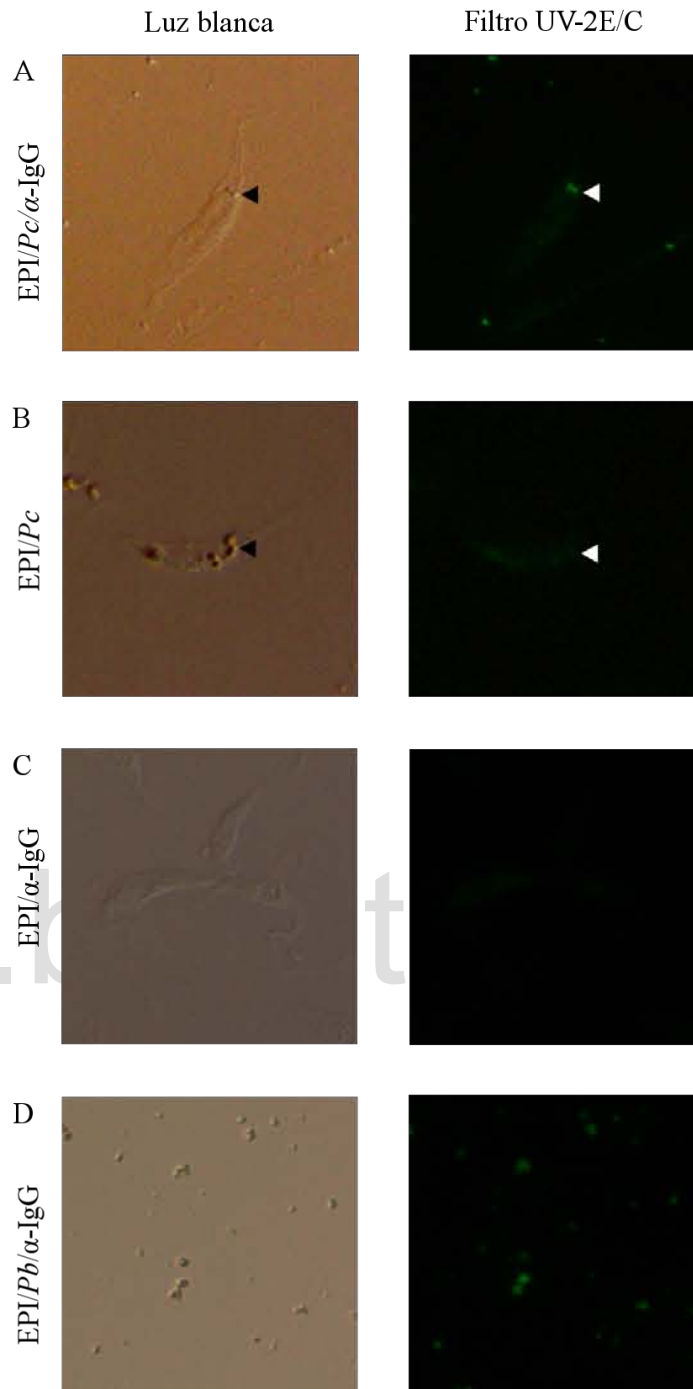


Figura 30. Captura de epimastigotes con partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24. Fila izquierda micrografía con luz blanca, fila derecha utilizando el filtro UV-2EC. Epimastigotes unidos a partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 e incubados con α -IgG de conejo acoplado a FITC (A); epimastigotes unidos partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 (B); epimastigotes incubados con α -IgG de conejo acoplado a FITC (C) y partículas sin sensibilizar y bloqueadas, incubadas con el α -IgG con FITC (D). Las flechas negras indican partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 unidas a la bolsa flagelar y las flechas blancas, partículas con fluorescencia.

4.5.2 Microscopía electrónica de barrido y transmisión de epimastigotes capturados con conjugados α -PPDK

Otra técnica utilizada para la visualización de epimastigotes unidos a conjugados con mayor resolución fue la microscopía electrónica de barrido y transmisión. En este caso solo se usaron partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK/epimastigotes. En las figura 31 y 32, se observa claramente que las partículas se unieron principalmente a la bolsa flagelar del parásito, sin embargo, también se observaron partículas unidas al flagelo. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con microscopía de luz. También se observa en las figuras 31y 32 que la textura de las partículas es rugosa e irregular y no lisa, ya que el núcleo magnético de las partículas está cubierto por dióxido sílice.

En la figura 32, se observa que hay proyecciones de la membrana que emergen del flagelo (vesículas) y que son reconocidas por las partículas y en algunos casos hay una doble unión entre membrana del flagelo-partícula-membrana plasmática. También se observan en las micrografías, vesículas emergiendo de la membrana plasmática (ectosomas) y de la bolsa flagelar (exosomas) y en algunos casos vesículas libres unidas a las partículas.

www.bdigital.ula.ve

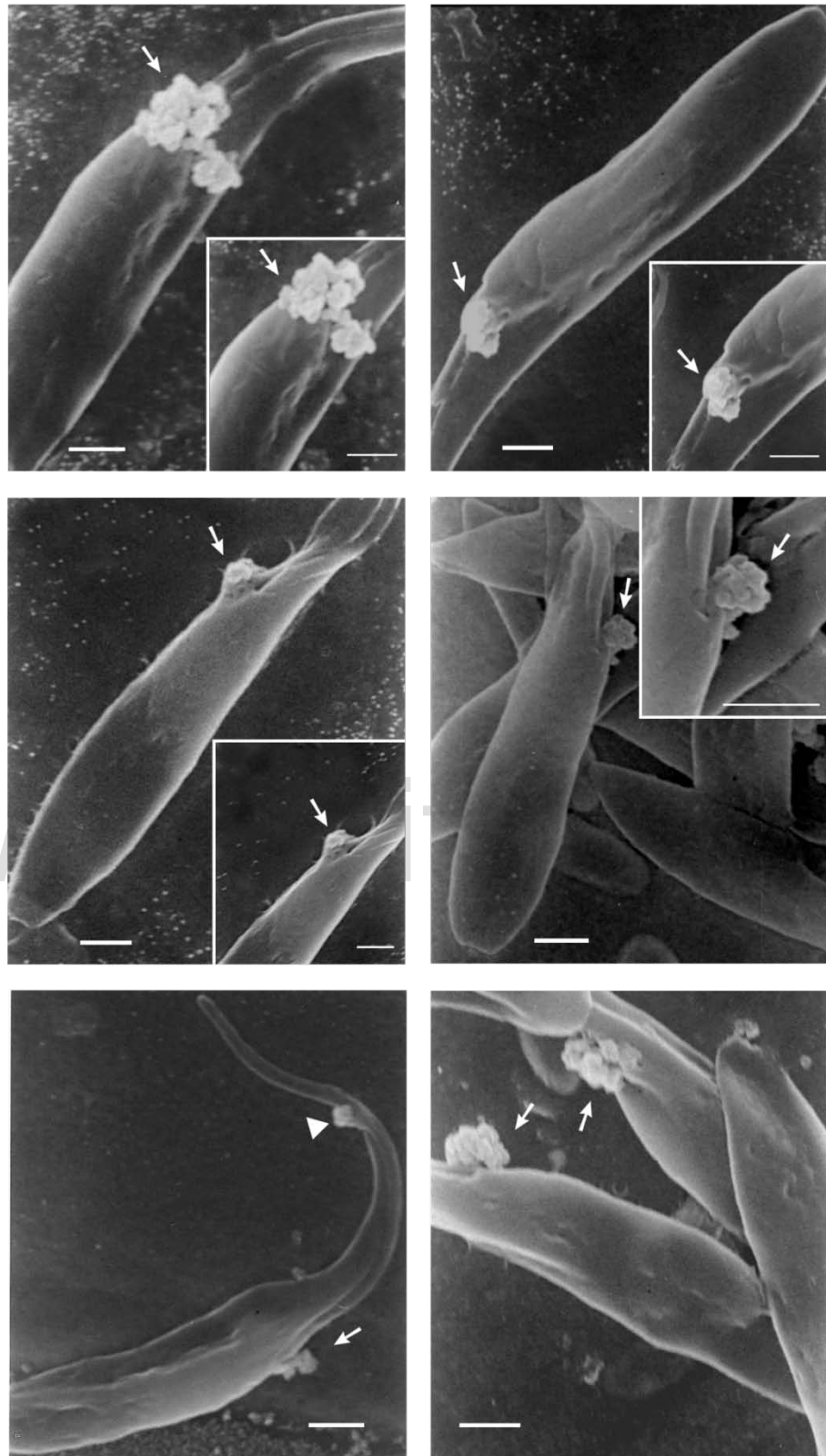


Figura 31. Microscopía electrónica de barrido de epimastigotes capturados con partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK. Las flechas blancas indican partículas unidas a la bolsa flagelar y las puntas de flecha la partículas unidas al flagelo. Barras= 1 μ m.

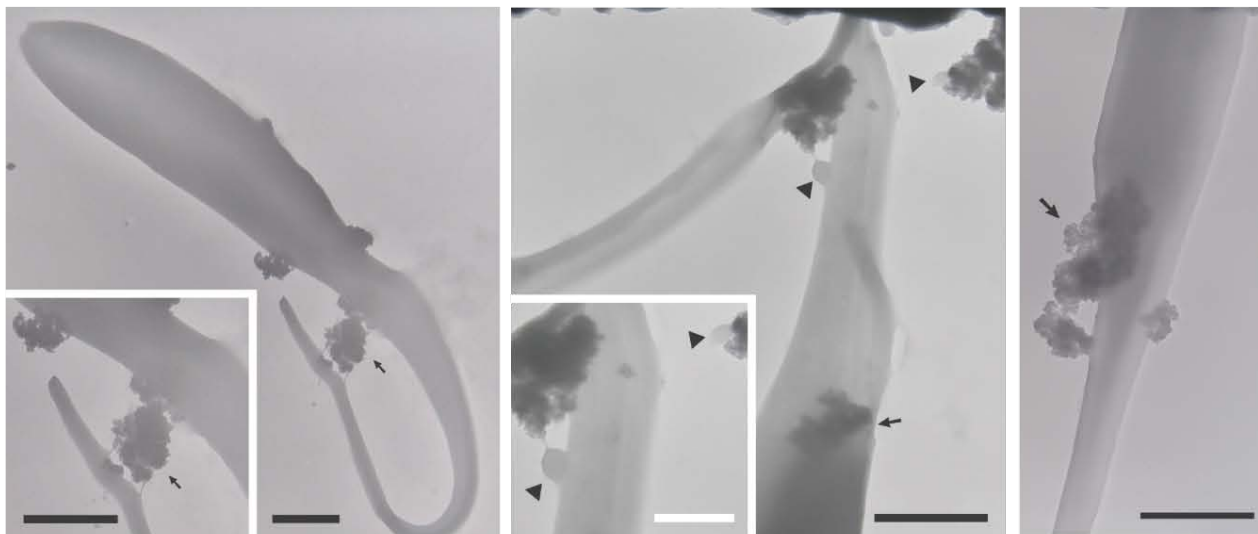


Figura 32. Microscopía electrónica de transmisión de epimastigotes capturados con partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK. Las flechas negras indican partículas unidas a la bolsa flagelar y las puntas de flecha vesículas unidas a las partículas. Barras negras = 1 μ m. Barra blanca= 500 nm.

4.5.3 Microscopía electrónica de transmisión de vesículas extracelulares (VEs) capturadas con partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK

En los resultados obtenidos en la sección 4.4.2, partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK capturaban varias proteínas de *T. cruzi*. Para determinar si las proteínas asociadas a PPDK eran parte de un complejo de proteínas (interacción proteína/proteína) o si se trataba de vesículas liberadas (exosomas y/o ectosomas) al medio extracelular (suero de ratón en fase aguda), se realizó una microscopía de transmisión a partir de las posibles vesículas liberadas del conjugado (partícula/PPDK). En la figura 33, se observa la presencia de cuerpos vesiculares con diámetros menores a 200 nm, sin embargo las vesículas al parecer son poco electrón densas, por lo que no se lograron ver con alta definición; o quizás, debido a que los cortes no fueron lo suficientemente buenos por la contaminación con partículas de sílice. Este resultado demuestra que la PPDK está siendo secretada/excretada por el parásito mediante vesículas extracelulares de secreción/excreción y no de forma soluble en un complejo proteína/proteína.

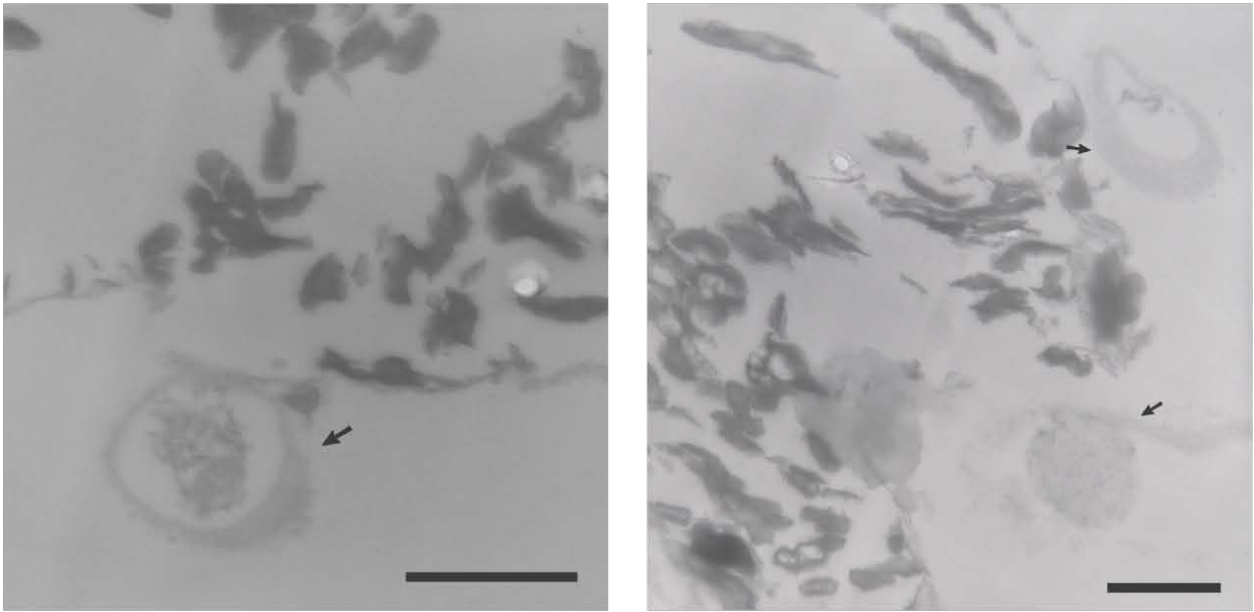


Figura 33. Microscopía electrónica de transmisión de vesículas extracelulares (VEs) capturadas con partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK. Las vesículas fueron capturadas a partir del suero de un ratón infectado con la cepa YBM de *T. cruzi*. Las flechas negras indican la localización de las vesículas y los cuerpos más oscuros (electron densos) a cristales de SiO₂ que se desprenden de la partícula. Barras= 200 nm.

4.6 Estabilidad de las IgG conjugadas a partículas paramagnéticas

Para determinar si los conjugados (partícula-IgG) pueden ser utilizados como una herramienta de diagnóstico, fue necesario determinar la estabilidad de las IgG conjugadas a las partículas. En la figura 34, se muestran los valores de absorbancia obtenidos durante 5 meses, utilizando conjugados (partícula/ α -Pgr24) almacenados en dos soluciones diferentes, unos en tampón de almacenamiento (20 mM de NaH₂PO₂ y 20 mM de Na₂HPO₄, pH 7,2) y otro en diluyente de conjugado del Kit *Cruzi-ELISA*. Este resultado indica que durante los 5 meses de experimentación no hubo pérdida de la afinidad y por ende la estabilidad de la IgG. Tampoco se observan diferencias significativas entre las partículas almacenadas con el tampón de almacenamiento y las almacenadas en diluyente de conjugado.

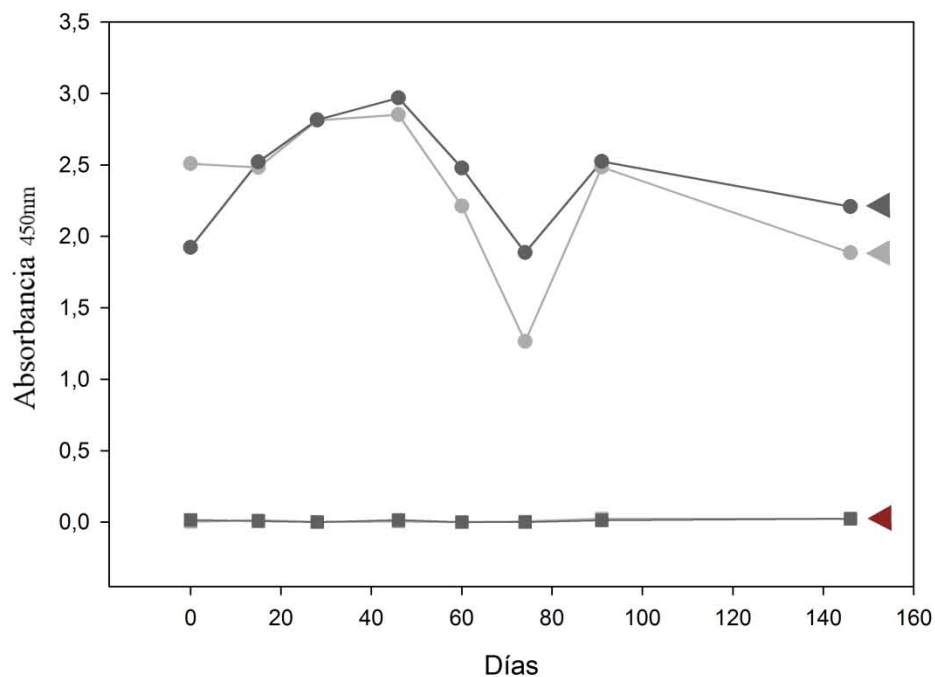


Figura 34. Estabilidad de la IgG (α -Pgr24) conjugada a partículas. Para cada ensayo se utilizaron 150 μ g de partículas, 40 μ g de Pgr24 (antígeno), como primer anticuerpo una dilución 1/20 del suero de un Chagásico crónico y como secundario 1/15000 de α -IgG humano acoplado a la enzima peroxidasa. La flecha gris oscuro indica las absorbancias obtenidas con partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 almacenadas en tampón de almacenamiento (20 mM de NaH_2PO_2 y 20 mM de Na_2HPO_4 , pH 7,2), las flecha gris claro las absorbancias con partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 almacenados diluyente de conjugado del Kit *Cruzi-ELISA* y la flecha roja los valores de absorbancia obtenidos con partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24 incubadas únicamente con agente de revelado. El revelado se hizo con solución de revelado del kit *CruziElisa* deteniendo la reacción a los 10 min con HCl 0,5 M.

VI. DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas afecta a millones de personas tanto en zonas endémicas de Latinoamérica como en otros países del mundo (Rassi Jr et al., 2010). Los esfuerzos realizados para enfrentar este problema de salud pública se han centrado principalmente en el control vectorial, sin tener en cuenta que existen otras vías de transmisión como transfusiones de sangre, congénita, trasplantes de órganos y oral (Moncayo, 2003). Es obvio que ha faltado voluntad e iniciativas de los gobiernos Latinoamericanos, incluyendo el de Venezuela para hacer políticas públicas eficientes para disminuir los riesgos de transmisión e infección con *T. cruzi*. Además, los tratamientos y sistemas de diagnóstico son ineficientes, siendo de carácter urgente la disponibilidad de recursos para la investigación en estas áreas.

Una de las principales características que hacen a la enfermedad de Chagas difícil de diagnosticar, es que no posee sintomatología clínica específica, por lo que puede pasar desapercibida y por tanto no es tratada a tiempo. Existen básicamente dos formatos para el diagnóstico de esta enfermedad: de forma directa detectando al parásito por microscopía luz y de forma indirecta capturando anticuerpos IgG e IgM específicos contra proteínas del parásito o amplificando genes específicos del parásito (PCR). Los sistemas de diagnóstico directos tienen una especificidad del 100 %, sin embargo, la sensibilidad se ve comprometida por la concentración de parásitos en sangre (generalmente baja) y la experiencia del especialista. La PCR ha demostrado ser una buena solución para aumentar los niveles de sensibilidad, no obstante, se trata de un procedimiento de alto costo y que requiere de personal e instalaciones especializadas. Este último punto es de gran importancia debido a que esta enfermedad afecta principalmente a personas en las zonas rurales y más pobres de Latinoamérica, por lo que las pruebas deben ser de bajo costo, rápidos y de fácil desarrollo, y así abordar a las clases más bajas de la sociedad que son las que padecen mayoritariamente esta enfermedad. Por otro lado, los métodos serológicos dependen de las características del antígeno, por lo que en muchos casos se obtienen resultados incongruentes que requieren de la aplicación de más de un procedimiento para un diagnóstico definitivo. Los tipos de antígeno más empleados incluyen: fracciones completas o semipurificadas de epimastigotes y proteínas recombinantes, los cuales pueden llevar a falsos negativos por diferencias dentro de las cepas de *T. cruzi* o falsos positivos por reacción cruzada con anticuerpos producidos contra otras enfermedades parasitarias.

Otro problema de gran importancia en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, es el de saber si hubo cura parasitológica después que un paciente ha recibido tratamiento con fármacos tripanocidas, ya que la seroconversión puede durar varios años (pudiendo detectarse IgG específicos), por lo que los sistemas serológicos son incapaces de discernir entre sí hubo cura parasitológica o no (Cançado, 1999). Una alternativa a los sistemas de diagnóstico serológicos, es el uso de la prueba de lisis mediada por el complemento (CoML) (Krettli y Brener 1982), donde la presencia de anticuerpos líticos es un indicador de infección activa. Sin embargo, este procedimiento ha sido poco difundido debido a la necesidad de trabajar con formas vivas del parásito. Otro problema que ha ganado importancia, es que la mayoría de los kits de diagnóstico comerciales disponibles son ineficientes en la detección temprana de la infección congénita en el primer año de vida de un neonato, ya que los anticuerpos presentes en el

bebé son producto de la transferencia de la madre al hijo y la cantidad de parásitos en sangre puede ser muy baja (Carlier y Torrico, 2003).

En la últimas tres décadas se han hecho esfuerzos en investigar un nuevo formato para la detección de *T. cruzi* a través de la captura de proteínas de secreción directamente de la sangre u orina de los pacientes (Araujo, Chiari, y Dias, 1981; Corral, Anders, y Grinstein, 1992; Freilij, Corral, Katzin, y Grinstein, 1987; Katzin y col., 1989; Umesawa y col., 1993). A pesar de que se han obtenido excelentes resultados con los exoantígenos (alta especificidad y sensibilidad), aun no existe un kit comercial con la capacidad de detectar exoantígenos, el cual podría sustituir y mejorar las técnicas tradicionales, ya que se detectaría indirectamente al parásito (personas positiva para *T. cruzi*) y no anticuerpos circulantes (seropositivos) en el paciente.

Recientemente se han desarrollado técnicas en biotecnología de punta, con bajo costo y fácil manipulación, que han mostrado gran eficiencia en la captura de células completas y vesículas extracelulares utilizando anticuerpos como anzuelo. Son las nano/micro partículas paramagnéticas conjugadas a anticuerpos. Con este sistema no solo se pueden capturar antígenos solubles o asociados a membranas, sino que además no requiere de equipos adicionales, pues la ulterior purificación del antígeno requiere únicamente de un imán y solución de lavado (Cocucci y Meldolesi, 2015; Oksvold, Neurauter, y Pedersen, 2015; Olsvik y col., 1994; Radisic, Iyer, y Murthy, 2006; Safarik y Safarikova, 2004).

Este innovador sistema acoplado a anticuerpos específicos α - *T. cruzi*, debería ser capaz de detectar y aislar proteínas solubles o asociadas a membranas para diagnosticar la presencia de *T. cruzi* en muestras de suero y/o orina en todas las fases de la enfermedad de Chagas, e incluso, en un futuro podría llegar a ser una herramienta útil para el diagnóstico de neonatos con transmisión congénita, o determinar cura parasitológica en pacientes tratados con drogas tripanocidas o cura espontánea.

En este trabajo se logró conjugar anticuerpos policlonales (IgG purificados) a partículas superparamagnéticas BIOBLONE (FC-106), las cuales permitieron, entre otras cosas, capturar proteínas recombinantes solubles y proteínas nativas asociadas a vesículas extracelulares (exosomas/ectosomas) y a la membrana plasmática de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* como una posible herramienta para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Como paso previo a la conjugación, las IgG totales de cada suero fueron purificadas en dos pasos (precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico en una resina DEAE 52 Whatman). En todos los casos se logró purificar las IgG junto a una pequeña cantidad de una proteína de mayor peso molecular que coeluye con las IgG (figura 7). Cabe destacar, que las IgG purificadas a partir del suero humano no se unieron a la resina, por lo que se omitió el paso de elución durante la cromatografía (sección 2.6 de la metodología). Esto quizás se deba a que a pH 8 (pH del tampón de purificación) las IgG de conejo están cargadas negativamente, pues su punto isoeléctrico está entre 6,1-6,5 (Wu, Huang, Mullett, Yeung, y Pawliszyn, 2001), mientras que en las IgG de humano casi todas las cargas están neutralizadas, ya que el punto isoeléctrico está entre 6,6- 8,6

(Hamilton, 1987). Adicionalmente, se confirmó la purificación de IgG mediante inmunoblots de los productos de purificación (figura 8).

Las IgG purificadas, concentradas y dializadas fueron conjugadas a las partículas paramagnéticas. La interacción entre las partículas y el ligando ocurre por la formación de un enlace covalente entre los grupos amino, hidroxilo y sulfhidrilo de los residuos de amino ácidos de las proteínas y los grupos epoxi de las partículas. La formación del enlace depende de la fuerza iónica y pH del medio, siendo necesario que el pH de conjugación esté entre 11-12 para promover la unión con grupos hidroxilo, > 9 para aminas y entre 7,5-8,5 para sulfhidrilo (figura 35). En este estudio se requería que las IgG se unieran a las partículas paramagnéticas por la región cristalizable (Fc: por sus siglas en inglés) y así dejar disponible la región de interacción con el antígeno (Fab: por sus siglas en inglés). Por ellos se prefirió promover la formación de enlaces con los grupos hidroxilo, abundantes en los polisacáridos presentes en la región Fc (Stadlmann, Pabst, Kolarich, Kunert, y Altmann, 2008). La otra recomendación de la casa comercial, es que el tampón de conjugación debe tener una fuerza iónica baja y no debe contener grupos amino, hidroxilo o fenoles, para así evitar competencia entre las moléculas a conjugar a la partícula y promueve interacciones electrostáticas como estrategia de pre-concentración de IgG sobre la partícula. En este estudio se empleó un tampón de conjugación compuesto por fosfato de sodio dibásico y tribásico 20 mM a pH 11. Que aunque posee especies nucleofílicas que pueden interaccionar con el grupo epoxi, al parecer esto no ocurrió o al menos en muy poca proporción, ya que la cantidad de moléculas del tampón supera la concentración de IgG e igual se obtuvo una eficiencia de conjugación de IgG como la reportada por la casa comercial.

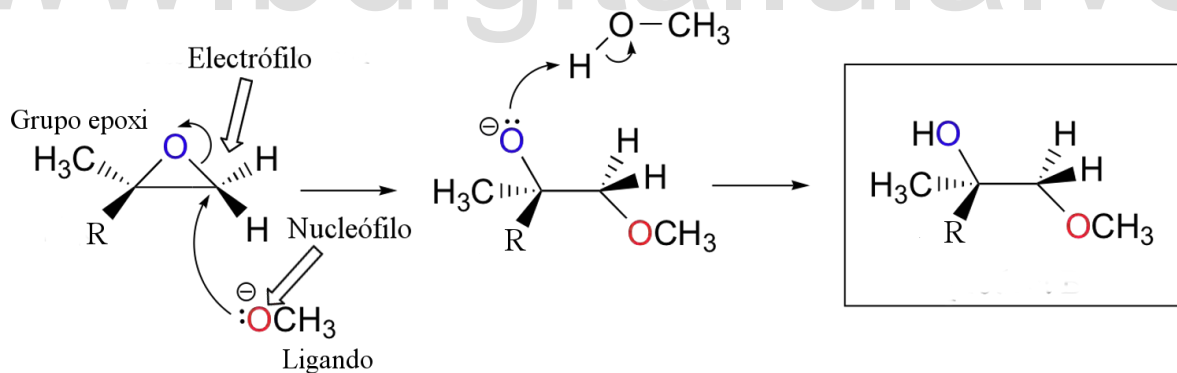


Figura 35. Representación esquemática de la formación del enlace covalente entre el grupo epoxi y una átomo de oxígeno. El enlace se forma mediante un ataque nucleofílico de un nucleófilo (por ejemplo: O, N y S) a un electrófilo (aceptor de electrones), que en este caso es un carbono con una carga parcial positiva.

La cantidad de IgG conjugadas a las partículas fue entre 0,127-0,263 mg IgG/mg partículas, rango de eficiencia de conjugación similar a lo reportado por la casa comercial de 0,030-0,300 mg proteína/mg partícula. En la figura 10, se muestra que hay un aumento lineal de los mg de IgG conjugados, es decir directamente proporcional a la cantidad de partículas empleadas. No obstante, existen pequeñas

variaciones en los mg de IgG conjugadas con una misma cantidad de partículas, muy probablemente debido a errores de precisión en los miligramos de partículas empleados o la concentración de IgG en la solución de conjugación. Mientras mayor sea la concentración de la molécula a conjugar (IgG), mayor es el impedimento estérico y menor la eficiencia de conjugación.

La eficiencia de conjugación entre IgG y partículas paramagnéticas fue similar a pH 11 y 10, indicando que a estos pH los enlaces entre IgG y grupos funcionales de las partículas no cambian, y tampoco la funcionalidad de los anticuerpos unidos.

La unión específica de las IgG a partículas paramagnéticas se confirmó por ELISA, detectando a las IgG conjugadas mediante un anticuerpo α -IgG acoplado a la enzima peroxidasa (figura 13). Además, se determinó que la etanolamina (agente de bloqueo propuesto por la casa comercial BIOCLONE) y leche descremada (agente de bloqueo adicional propuesto por nosotros), permitieron evitar interacciones inespecíficas entre los componentes de la partícula (núcleo magnético o cristales de dióxido) y otras sustancias.

La unión covalente entre IgG y la partícula paramagnética (BIOCLONE), fue confirmada al someter al conjugado (partícula/IgG) a condiciones desnaturalizantes (temperatura de ebullición y agentes reductores: β -mercaptoetanol y/o DTT), ya que bajo estas condiciones no hubo liberación de las IgG. Sin embargo, existe una población de IgG que podría interactuar con las partículas mediante enlaces más débiles (iónicas, Van der Waals e hidrofóbicas). Para eliminar estas interacciones es importante lavar los conjugados con un tampón con una baja fuerza iónica y luego a mayor fuerza iónica.

La afinidad de las IgG conjugadas a las partículas por los antígenos fue evaluada mediante un ELISA- Sándwich. Obteniéndose, que todas las IgG conjugadas reconocen al respectivo antígeno aun después del proceso alcalino de conjugación (pH 11). Además, los conjugados (partícula/IgG) no interactúan de forma inespecífica con otras moléculas, lo que verifica la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo (figuras 16-19). Un resultado importante, fue el obtenido con partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24, ya que una vez capturado el antígeno (Pgr24), el complejo partícula/IgG/antígeno fue capaz de reconocer anticuerpos α -Pgr24 en el suero de un paciente chagásico crónico (figura 18). El anticuerpo α -Pgr24 ha sido reconocido como anticuerpo lítico, indicador de infección activa con *T. cruzi* (Krautz, Kissinger y Krettli, 2000). Por tanto, este tipo de conjugado (partícula/ α -Pgr24) podría ser utilizado como sistema de diagnóstico serológico. El antígeno Pgr24, también llamada proteína flagelar de unión a calcio (FCaBP: por sus siglas en inglés) está localizada principalmente en el flagelo del parásito, sin embargo también se encuentra en el glicosoma de amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, siendo esta organela considerada un reservorio de antígenos de este parásito (Quiñones 1996).

Habiendo demostrado que las IgG conjugadas a partículas capturaban antígenos recombinante en condiciones relativamente ideales (con antígenos purificados y tampón de incubación formulado), se evaluó la capacidad de las IgG conjugadas a partículas de capturar a los antígenos naturales en medios de cultivo y sueros.

Recientemente la proteína PPDK de *T. cruzi*, enzima responsable de catalizar la fosforilación reversible de piruvato y Pi utilizando fosfatos β y γ de la molécula de ATP para generar AMP, PPi y PEP, fue localizada en la matriz y la membrana del glicosoma; en este estudio se reportaron dos formas, una en la matriz y otra en la membrana del glicosoma con pesos moleculares de 100 y 75 kDa, respectivamente (González-Marcano y col, 2014). La PPDK fue solubilizada a partir epimastigotes con una solución que contenía detergentes. En la figura 21 se observa, que las partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK no capturan a la PPDK de 75 y 100 kDa del homogenato, pues lo que se observa es PPDK degradada. Resultados similares de degradación de la PPDK natural han sido reportada en homogenatos de *T. cruzi* (Gonzales-Marcano, 2012). Esta estrategia para la detección de antígenos a partir de homogenatos de parásito, requiere de un cocktail de inhibidores de proteasas y distractores al momento de la ruptura de las células, para así evitar la degradación de los antígenos y de las IgG conjugadas a las partículas al momento de ser incubadas con los extractos. Convirtiéndose en un procedimiento engorroso.

Recientemente fue publicado que la proteína PPDK de *T. cruzi* tenía una nueva localización, en vesículas extracelulares (ectosomas/exosomas) liberadas por epimastigotes de *T. cruzi* (Bayer-Santos et al., 2013). En este trabajo, se hicieron experimentos de captura de la PPDK secretada/excretada empleando partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK e incubándolas con el sobrenadante de un medio de cultivo de secreción (RPMI-1640) de epimastigotes, suero de animales experimentales infectados y pacientes chagásicos. Las IgG conjugadas capturaron PPDK y otras proteínas del medio, que podrían ser parte de un complejo proteico o de vesículas extracelulares. También este conjugado capturó una gran variedad de proteínas a partir de sueros (ratón en fase aguda y suero de pacientes chagásicos en fase aguda y crónica). Al revelar los Western blot con los productos de captura de la PPDK conjugada; con anticuerpos α -PPDK, α -Pgr24 y el suero de un paciente chagásico crónico, se observaron fuertes señales positivas, indicando que este conjugado (partícula/ α -PPDK) fue capaz de pescar varias proteínas de *T. cruzi* en medio extracelular. Sin embargo, hasta ese momento aún no sabíamos si este resultado era el producto de la captura de vesículas extracelulares como reportaron (Bayer-Santos et al., 2013) o si eran complejos proteicos. Para esto, se realizó una microscopía electrónica de transmisión del producto de elusión de partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK incubadas con el suero de un ratón agudo. El resultado fue, que efectivamente se trataba de vesículas extracelulares liberadas por la forma tripomastigote sanguínea, las cuales poseían un diámetro de \approx 200 nm (rango reportado para ectosomas) (figura 33). Este es el primer reporte de la presencia de PPDK en vesículas extracelulares a partir de la forma tripomastigote sanguínea, además de ser la primera evidencia de que PPDK se encuentra localizada en la cara externa de la membrana vesicular. Un resultado importante de mencionar en la figura 33, es que además de cuerpos vesiculares, también se observa cuerpos electrondensos, estos corresponden a cristales de dióxido de sílice, los cuales son desprendidos de las partículas debido a la sonicación, por lo que no se recomienda (para trabajos posteriores) el uso de sonicación para eliminar la remanencia magnética y separar las partículas.

Con esta nueva estrategia de detección indirecta del parásito, que posibilita asociar más de una proteína específica de *T. cruzi*, indiscutiblemente se puede estandarizar un método de diagnóstico indirecto, utilizando perfiles proteicos de vesículas extracelulares, esto posibilitaría detectar en qué fase de la enfermedad se encuentra un paciente o si ha tenido cura parasitológica, o hacer un kit de

aglutinación, ya que las partículas conjugadas a IgG y vesículas capturadas se aglutinan (figura 24). Esta aglutinación se debe a múltiples sitios de reconocimiento del antígeno en vesículas por las IgG conjugadas a partículas, formando una red y por tanto perdiendo la solubilidad.

Además de capturar vesículas extracelulares utilizando partículas conjugadas a IgG, también se lograron capturar epimastigotes completos con partículas conjugadas a IgG (α -ENO, α -Pgr24, α -PPDK y α -FM de *T. cruzi*), a partir de medio de cultivo. En las figuras 25-28 se puede observar, que la mayoría de los conjugados (partícula/IgG) se unen principalmente a la bolsa flagelar del parásito; sin embargo, partículas conjugadas a IgG/ α -ENO y partículas conjugadas a IgG/ α -FM de *T. cruzi* no solo se unen a la bolsa flagelar sino también a otras regiones de la membrana plasmática del epimastigote (figuras 25 y 28). Estos resultados eran de esperar, debido a que la proteína enolasa de *T. cruzi* ha sido reportada en puntos discretos en la membrana plasmática de epimastigotes, incluyendo la región apical del parásito (Domingo-Sananes, 2004). La enolasa es una enzima ubicada principalmente en el citosol, no obstante ha sido localizada en la membrana plasmática de muchos organismos patógenos como un factor de virulencia (receptor de plasminógeno) y en vesículas extracelulares (Avilán y col., 2011), sin embargo, no se conoce la ruta por la cual la enolasa tiene como destino la membrana plasmática o vesículas extracelulares, ya que esta enzima no tiene secuencias señales conocidas para estas ubicaciones. Tampoco es conocido si la enolasa encontrada en las vesículas extracelulares está ubicada principalmente en exosomas o ectosomas, lo que si podemos concluir con nuestros resultados es que hay enolasa mirando hacia la cara externa de las vesículas que se excretan por la bolsa flagelar, y en la membrana plasmática. Es de hacer notar que la mayor concentración de marcaje con las partículas conjugadas a IgG/ α -ENO estuvo en la bolsa flagelar (figura 25), zona de mayor actividad de intercambio entre el medio extracelular e intracelular (endocitosis y exocitosis) y además es la zona de liberación de cuerpos multivesiculares (exosomas) (Field y Carrington, 2009).

A diferencia del conjugado (partículas/ α -ENO), partículas conjugadas a IgG/ α -PPDK y Pgr24 fueron localizados principalmente en la bolsa flagelar y en el flagelo. Estas proteínas han sido reportadas en vesículas extracelulares (proteómica) (Bayer-Santos et al., 2013), por lo que no es de extrañar que todos los tipos de conjugados (partículas/ α -Pgr24 y α -PPDK) se unieran a esta zona. Es más, en trabajos anteriores, la proteína Pgr24, ya había sido reportada no sólo en ectosomas de *T. cruzi* (Bayer-Santos et al., 2013), sino también en exosomas liberados de la bolsa flagelar y en la membrana plasmática de epimastigotes (Ouaisi y col., 1992).

Los cúmulos de señales observadas en la bolsa flagelar de los epimastigotes con los conjugados (partículas/IgG) no deben ser el producto de un efecto hidrodinámico de los antígenos (PPDK, Pgr24 y Enolasa) en la membrana (Engstler y col., 2007), es decir que estos antígenos tengan una migración hacia esta zona como producto de una fluidez de la membrana o por balsas lipídicas, ya que la densidad de las partículas ($2.5 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$) es muy elevada, como para ser empujadas desde cualquier punto de la membrana plasmática hacia la bolsa flagelar. Por tanto las señales localizadas en la bolsa flagelar deben ser el producto de la salida de cuerpos multivesiculares (exosomas) donde están localizadas estas proteínas. Además, esta afirmación es corroborada por la captura de vesículas con los conjugados (partículas/IgG) en cultivos (libres de parásitos) y sueros.

La observación de conjugados (partícula/ α -PPDK) unidas a la bolsa flagelar fue corroborada por microscopía electrónica de barrido y transmisión (figura 31 y 32), donde también se visualizan conjugados que se unen a gemaciones (vesículas) que emergen de la membrana flagelar de los epimastigotes e incluso los conjugados (partícula/ α -PPDK) parecen estar unidos en dos puntos diferentes, membrana flagelar-conjugado-bolsa flagelar. No obstante, es difícil concluir que se trate de exosomas y/o ectosomas, ya que las vesículas unidas a los conjugados podrían fusionarse a la membrana si la tensión superficial es baja.

Al igual que los epimastigotes, se intentó capturar la forma tripomastigote sanguínea pero con partículas conjugadas a IgG (α -ENO, α -FM de *T. cruzi* y las IgG de una paciente chagásico crónico), los resultados obtenidos fueron muy pobres, siendo necesario la incubación de los tripomastigotes con las partículas a temperaturas muy bajas y por más tiempo para finalmente obtener solo unos pocos tripomastigotes unidos a partículas (figura 29). Es probable que el bajo rendimiento de captura de tripomastigotes se debiera a la gran movilidad de los tripomastigotes y donde este efecto es más fuerte que la afinidad del anticuerpo conjugado por el antígeno y además por la alta densidad de la partícula, impidiendo el acercamiento a la membrana plasmática del parásito.

A pesar de que todos los conjugados fueron capaces de reconocer los antígenos recombinantes y naturales, la sensibilidad podría haber aumentado siempre que los anticuerpos hubiesen sido purificados a homogeneidad, sin embargo con el tipo de partículas que se trabajó es difícil incrementar significativamente la sensibilidad, debido a que no se pudo orientar de forma correcta la porción Fc del anticuerpo con los grupos epoxi de la partículas. Unas partículas magnéticas que pueden incrementar la sensibilidad son aquellas que tengan enlazadas a la proteína A y/o G, las cuales unen a los anticuerpos por la porción Fc y de esa forma garantizar que todos los anticuerpos unidos, tienen la porción Fab libre para reconocer a los antígenos (<https://www.lifetechnologies.com/ve/en/home.html>).

La estabilidad de IgG unidas a partículas fue probada realizando inmunoensayos tipo ELISA con partículas conjugadas a IgG/ α -Pgr24, estas demostraron ser estables y reconocer al el antígeno durante un periodo de 5 meses (figura 34), incluso sin ser almacenados en tampón especial para almacenamiento (diluyente de conjugado kit *Cruzielisa*), sino simplemente en un tampón fosfato salino y azida de sodio. Esto quiere decir, que este tipo de complejos (partícula/anticuerpo) pueden ser utilizados para la estandarización de un kit para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

VII. CONCLUSIONES

- La estrategia de conjugación permitió obtener partículas unidas a IgG con la eficiencia reportada por la casa comercial BIOCLONE Inc.
- La unión partícula/anticuerpo ocurre principalmente por la formación de un enlace covalente. Sin embargo, existe la posibilidad de que se formen otros tipos de enlace más débiles con otras regiones de la partícula desprovistas de grupos epoxi o de cristales de SiO₂.
- Al menos una parte de la población de IgG conjugadas a partículas, tienen la Fab disponible para el acceso e interacción con los antígenos.
- Las interacciones inespecíficas con las partículas o con algunos de los componentes adheridos a ellas, son relativamente bajas. Sin embargo se sugiere la utilización de un agente de bloqueo adicional como la caseína.
- Los conjugados partículas/IgG capturaron antígenos recombinantes y naturales de forma específica.
- El empleo de complejos partícula/anticuerpo para la captura de antígenos naturales en muestras de lisados de parásitos, podría no resultar efectiva debido a la gran cantidad de proteasas que podrían degradar el anticuerpo.
- Complejos partícula/ α -PPDK lograron capturar vesículas de secreción/excreción de *T. cruzi* a partir de sueros, esto representa una evidencia más contundente de la presencia del parásito en el hospedador, que la detección de anticuerpos α -*T. cruzi*, con lo que se podría mejorar los sistemas de diagnóstico actualmente utilizados.
- Los conjugados partícula/anticuerpo (α -ENO, α -Pgr24, α -PPDK y α -FM) se unieron a la forma epimastigote del parásito principalmente en la bolsa flagelar. Sin embargo conjugados partícula/ α -ENO también se unen en a otros sitios de la membrana plasmática. Este resultado concuerda con la localización reportada de la enolasa.
- La unión de conjugados a tripomastigotes sanguíneos fue ineficiente debido a la gran movilidad del parásito. Esto sugiere, que para la detección del parásito en fase aguda, es mejor otra vía como la captura de vesículas de secreción/excreción.
- Las partículas sensibilizadas con IgG α -Pgr24 fueron sensibles a los antígenos recombinantes, incluso después de 5 meses de almacenados a 4°C, pudiendo utilizarse este sistema para la estandarización de un kit de diagnóstico para todas la fases de la enfermedad.

VIII. PERSPECTIVAS

- Probar otras partículas comercialmente disponibles, que logren conjugar a la IgG por la región Fc, por ejemplo partículas con proteína A/G.
- Evaluar tampones de conjugación alternativos al tampón fosfato salino 20 mM pH 11, variando pH y fuerza iónica, y evitar la precipitación de los anticuerpos durante la conjugación.
- Estandarizar, por medio de titulación, la concentración de IgG requerida para la conjugación anticuerpo/partícula y evitar problemas como impedimento estérico o uniones inespecíficas al momento de utilizar los complejos.
- Emplear anticuerpos purificados o monoclonales en el diseño de los conjugados anticuerpo/partícula, para así mejorar la especificidad del sistema y evitar la unión de otras moléculas.
- Utilizar alternativas como agitación con el vortex, para eliminar la remanencia magnética de las partículas después de someterlas a un campo magnético, ya que la sonicación promueve el desprendimiento de cristales de SiO₂ y por consiguiente la pérdida de anticuerpos.
- Realizar un estudio del perfil proteico de vesículas capturadas con complejos partícula/ α -PPDK o α -Pgr24, durante la fase aguda y crónica de la enfermedad en animales experimentales y pacientes. Con la intención de evaluar si existen diferencias del patrón de proteínas liberadas durante el desarrollo de la enfermedad, y si este puede ser utilizado como herramienta para la estandarización de un sistema que permita discernir entre una fase y otra.
- Evaluar el comportamiento de conjugados partícula/anticuerpo, en la captura de exoantígenos en muestras de orina de animales o pacientes infectados con *T. cruzi*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Araujo, F. G., E. Chiari, y J. C. P. Dias. (1981). Demonstration of *Trypanosoma cruzi* antigen in serum from patients with Chagas' disease. *Lancet* ii: 246-249.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Smith J. (1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. Editorial Wiley. 1: 27-28, 11:22-24.

Avilán, L., Gualdrón-López, M., Quiñones, W., González-González, L., Hannaert, V., Michels, P. A. M., & Concepción, J.-L. (2011). Enolase: A Key Player in the Metabolism and a Probable Virulence Factor of Trypanosomatid Parasites—Perspectives for Its Use as a Therapeutic Target. *Enzyme Research*, 2011, 1–14. <http://doi.org/10.4061/2011/932549>.

Basquiera, A. L., Sembaj, A., Aguerri, A. M., Omelianiuk, M., Guzmán, S., Barral, J. M., y Salomone, O. A. (2003). Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and of parasitaemia detected by polymerase chain reaction. *Heart*, 89(10), 1186–1190.

Bayer-Santos, E., Aguilar-Bonavides, C., Rodrigues, S. P., Cordero, E. M., Marques, A. F., Varela-Ramirez, A., y Almeida, I. C. (2013). Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Secretome: Characterization of Two Populations of Extracellular Vesicles and Soluble Proteins. *Journal of Proteome Research*, 12(2), 883–897. <http://doi.org/10.1021/pr300947g>.

Berrizbeitia, M., Ndao, M., Bubis, J., Gottschalk, M., Ache, A., Lacouture, S., 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), 291296. doi:10.1128/JCM.44.2.291-296.2006.

Camargo E. (1964). Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic *Trypanosoma* in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 6:93-100.

Cançado, J. R. (1999). Criteria of Chagas disease cure. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 331–335.

Carlier, Y., y Torrico, F. (2003). Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 767–771.

Cedillos, R. A., Torrealba, J. W., Tonn, R. J., Mosca, W., y Ortegón, A. (1982). El xenodiagnóstico artificial en la enfermedad de Chagas. *Bol Of Sanit Panam*, 93, 240–249.

Choi, D.-S., Kim, D.-K., Kim, Y.-K., y Gho, Y. S. (2013). Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *PROTEOMICS*, 13(10-11), 1554–1571. <http://doi.org/10.1002/pmic.201200329>.

Choi, D.-S., Kim, D.-K., Kim, Y.-K., y Gho, Y. S. (2014). Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes: *PROTEOMICS OF EXTRACELLULAR VESICLES*. *Mass Spectrometry Reviews*, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1002/mas.21420>.

Clayton, A., Court, J., Navabi, H., Adams, M., Mason, M. D., Hobot, J. A., y Jasani, B. (2001). Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 247(1), 163–174.

Cocucci, E., y Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>.

Concepción, J.L., Gonzales-Pacanowska, D. y Urbina, J.A. (1998). 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: subcellular localization and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 352(1):114-120.

Corral, R.S.; A Orn y S. Grinstein. (1992). Detection of soluble exoantigens of *trypanosoma cruzi* by a dot immunobinding assay. *American Journal Of Tropical Medicine y Hygiene*. 46(1): 31-38

Coura, J. R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 113–122.

Coura, J. R., y De Castro, S. L. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1), 3–24.

Coura, J. R., y Viñas, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 465(n7301_suppl), S6–S7.

De Souza, W. (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1, 17–36.

Dias, J.C.P. (2000). Epidemiologia p. 48-74. En: Brener, Z., Andrade, Z.A., Barral-Netto (Editores), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Segunda edición. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, Brasil.

Domingo-Sananes M. (2004). Ubicación Subcelular, purificación, caracterización y estudios de interacción proteína-proteína de la enolasa de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de pregrado. Universidad de Los Andes. Departamento de Biología.

Duffy, T., Bisio, M., Altcheh, J., Burgos, J. M., Diez, M., Levin, M. J., y Schijman, A. G. (2009). Accurate Real-Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas Disease Patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(4), e419. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000419>.

Elgert, K. D. (2009). Immunology: understanding the immune system. John Wiley & Sons.

Engstler, M., Pfohl, T., Herminghaus, S., Boshart, M., Wiegertjes, G., Heddergott, N., y Overath, P. (2007). Hydrodynamic Flow-Mediated Protein Sorting on the Cell Surface of Trypanosomes. *Cell*, 131(3), 505–515.

Field, M. C., y Carrington, M. (2009). The trypanosome flagellar pocket. *Nature Reviews Microbiology*, 7(11), 775–786. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2221>

Figuera, L., Acosta, H., Gómez-Arreaza, A., Dávila-Vera, D., Balza-Quintero, A., Quiñones, W., y Avilán, L. (2013). Plasminogen binding proteins in secreted membrane vesicles of *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 187(1), 14–20. <http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.11.002>.

Frank, F. M., Fernández, M. M., Taranto, N. J., Cajal, S. P., Margni, R. A., Castro, E., Thomaz-Socol, V. y E. L. Malchiodi (2003). Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitology*, 126, pp 31-39. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182002002585>.

Frasch, A., Affranchino, J., Ibañez, C., Reyes, M., Macina, R., Luquetti, A., y Pettersson, U. (1988). Analysis of cloned *Trypanosoma cruzi* proteins that are antigenic during the acute and chronic phase of Chagas' disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83. doi:10.1590/S0074-02761988000500020.

Freilij, H. L., Corral, R. S., Katzin, A. M., y Grinstein, S. (1987). Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(1), 133–137.

Gomes, Y. M., Lorena, V., y Luquetti, A. O. (2009). Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 115–121.

González-Marcano, E. (2012). Caracterización bioquímica y molecular de la piruvato fosfato dikinasa (PPDK) de *Trypanosoma cruzi*. Tesis doctoral. IVIC.

González-Marcano, E., Mijares, A., Quiñones, W., Cáceres, A., y Concepción, J. L. (2014). Post-translational modification of the pyruvate phosphate dikinase from *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology International*, 63(1), 80–86. <http://doi.org/10.1016/j.parint.2013.09.007>.

Hamilton RG. (1987). Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. *Clin Chem* 33:1070-5.

Hay, F. C., Westwood, O. M. R., Nelson, P. N., y Hudson, L. (2002). Practical immunology. Malden, MA: Blackwell Science.

Hofmann, I., Schnölzer, M., Kaufmann, I., y Franke, W. W. (2002). Symplekin, a constitutive protein of karyo-and cytoplasmic particles involved in mRNA biogenesis in *Xenopus laevis* oocytes. *Molecular Biology of the Cell*, 13(5), 1665–1676.

Junqueira, A. C., Chiari, E., y Whicker, P. (1996). Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(2), 129–132.

Katzin, A.M.; Marcipar, A.; Freilij, H.; Corral, R. y J. F. Yanovsky. (1989) Rapid determination of *Trypanosoma cruzi* urinary antigens in human chronic Chagas' Disease by agglutination test. *Experimental Parasitology*. p. 208-15

Koga, K., Matsumoto, K., Akiyoshi, T., Kubo, M., Yamanaka, N., Tasaki, A., y col (2005). Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Research*, 25(6A), 3703–3707.

Krautz, G.M., Kissinger, J.C., y Krettli, A.U. (2000). The Targets of the Lytic Antibody response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today*, 16, 31-34.

Krettli AU y Brener Z. (1982). Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J Immunol* 128: 2009-2012.

Kuby Janis (2003). Immunology. fifth edition. W.H. Freeman & Company.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–5.

Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, L. y Randall, R. (1951). Protein measurement with folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Luqueti A.O, Rassi A (2000). Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editores. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 345-376.

Machado-de-Assis, G. F., Silva, A. R., Do Bem, V. A. L., Bahia, M. T., Martins-Filho, O. A., Dias, J. C. P., y Lana, M. (2012). Posttherapeutic Cure Criteria in Chagas' Disease: Conventional Serology

followed by Supplementary Serological, Parasitological, and Molecular Tests. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(8), 1283–1291. <http://doi.org/10.1128/CVI.00274-12>.

Marcilla, A., Martin-Jaular, L., Trelis, M., de Menezes-Neto, A., Osuna, A., Bernal, D., y del Portillo, H. A. (2014). Extracellular vesicles in parasitic diseases. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(0). <http://doi.org/10.3402/jev.v3.25040>.

Mathivanan, S., Ji, H., y Simpson, R. J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73(10), 1907–1920. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>.

Mathivanan, S., Lim, J. W., Tauro, B. J., Ji, H., Moritz, R. L., y Simpson, R. J. (2010). Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Molecular and Cellular Proteomics*, 9(2), 197–208.

Mizutani, K., Terazawa, R., Kameyama, K., Kato, T., Horie, K., Tsuchiya, T., y col. (2014). Isolation of prostate cancer-related exosomes. *Anticancer Research*, 34(7), 3419–3423.

Moncayo, A. (2003). Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(5), 577–591.

Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Beer Stolz, D., Sullivan, M. L. G., Karlsson, J. M., y Morelli, A. E. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*, 119(3), 756–766. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-02-338004>.

Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A., y D'Souza-Schorey, C. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *Journal of Cell Science*, 123(10), 1603–1611. <http://doi.org/10.1242/jcs.064386>.

Nakazawa, M., Rosa, D. S., Pereira, V. R., Moura, M. O., Furtado, V. C., Souza, W. V., y Gomes, Y. M. (2001). Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 8(5), 1024–7. doi:10.1128/CDLI.8.5.1024-1027.2001.

Neal R. y Miles R. (1970). Indirect hemagglutination test for Chagas' disease with a simple method for survey work. *Rev. Med. Trop.*; 12: 325-8.

Opperdoes, F., y Borst, P. (2001). Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: The glycosome. *FEBS Letters*, 80(2). doi:10.1016/0014-5793(77)80476-6.

Oksvold, M. P., Neurauter, A., y Pedersen, K. W. (2015). Magnetic Bead-Based Isolation of Exosomes. In M. Sioud (Ed.), *RNA Interference* (Vol. 1218, pp. 465–481). New York, NY: Springer New York. Retrieved from http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1538-5_27.

Olsvik, O., Popovic, T., Skjerve, E., Cudjoe, K. S., Hornes, E., Ugelstad, J., y Uhlen, M. (1994). Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(1), 43–54.

Ouaissi, A., Aguirre, T., Plumas-Marty, B., Piras, M., Schöneck, R., Gras-Masse, H., y Capron, A. (1992). Cloning and sequencing of a 24-kDa *Trypanosoma cruzi* specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 75(1), 11–7.

Pinto, A. Y. das N., Valente, S. A., Valente, V. da C., Ferreira Junior, A. G., y Coura, J. R. (2008). Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(6), 602–614.

Portela-Lindoso, A. A. B., y Shikanai-Yasuda, M. A. (2003). Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Revista de Saúde Pública*, 37(1), 107–115.

Quiñones W. y Concepción J. (1996). Identificación y caracterización de proteínas y lípidos presentes en la membrana glicosomal de *Trypanosoma cruzi* de fase exponencial y estacionaria. Tesis, facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

Quiñones, W., Peña, P., Domingo-Sananes, M., Cáceres, A., Michels, P. A. M., Avilan, L., y Concepción, J. L. (2007). *Leishmania mexicana*: Molecular cloning and characterization of enolase. *Experimental Parasitology*, 116(3), 241–251. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.01.008>.

Rabinowits, G., Gerçel-Taylor, C., Day, J. M., Taylor, D. D., y Kloecker, G. H. (2009). Exosomal MicroRNA: A Diagnostic Marker for Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, 10(1), 42–46. <http://doi.org/10.3816/CLC.2009.n.006>.

Radisic, M., Iyer, R. K., y Murthy, S. K. (2006). Micro-and nanotechnology in cell separation. *International Journal of Nanomedicine*, 1(1), 3.

Raposo, G., y Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. <http://doi.org/10.1083/jcb.201211138>.

Rassi Jr, A., Rassi, A., y Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402.

- Safarik, I., y Safarikova, M. (2004).** Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology*, 2(1), 7.
- Sanchez-Sancho, F., Campillo, N. E., y Paez, J. A. (2010).** Chagas disease: progress and new perspectives. *Current Medicinal Chemistry*, 17(5), 423–452.
- Schmunis, G. A. (1997).** Tripanosomíase americana. Retrieved from <http://books.scielo.org/id/nf9bn/pdf/dias-9788575412435-02.pdf>.
- Schuster, M., Wasserbauer, E., Ortner, C., Graumann, K., Jungbauer, A., Hammerschmid, F., y Werner, G. (2000).** Short cut of protein purification by integration of cell-disrupture and affinity extraction. *Bioseparation*, 9(2), 59–67.
- Silva-Barrios S. (2010).** Clonación, expresión y evaluación de proteínas antigénicas recombinantes de *Leishmania infantum*. Tesis de pregrado. Universidad de Los Andes. Departamento de Biología.
- Silveira-Lacerda, E., Silva, A., Junior, S., Souza, M., Kesper, N., Botelho-Filho, A., y Umezawa, E. (2004).** Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox Sanguinis*, 87(3), 204–207. doi:10.1111/j.1423-0410.2004.00571.x.
- Silverman, J. M., Clos, J., de' Oliveira, C. C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Reiner, N. E. (2010).** An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *Journal of Cell Science*, 123(6), 842–852. <http://doi.org/10.1242/jcs.056465>.
- Simpson, R., y Mathivanan, S. (2012).** Extracellular Microvesicles: The Need for Internationally Recognised Nomenclature and Stringent Purification Criteria. *Journal of Proteomics y Bioinformatics*, 05(02). <http://doi.org/10.4172/jpb.10000e10>.
- Souto, R. P. and Zingales, B. (1993).** Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology* 62, 45–52. doi: 10.1016/0166-6851(93)90176-X.
- Stadlmann, J., Pabst, M., Kolarich, D., Kunert, R., y Altmann, F. (2008).** Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides. *PROTEOMICS*, 8(14), 2858–2871. <http://doi.org/10.1002/pmic.200700968>.
- Steiger, R. F., Opperdoes, F. R., y Bontemps, J. (1980).** Subcellular fractionation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms with special reference to hydrolases. *European Journal of Biochemistry*, 105(1), 163–175.
- Tanowitz, H. B., Kirchhoff, L. V., Simon, D., Morris, S. A., Weiss, L. M., y Wittner, M. (1992).** Chagas' disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(4), 400–419.

TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis, & Weltgesundheitsorganisation (Eds.). (2012). Research priorities for chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis: technical report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization.

Tyler, K., y Engman, D. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31(5-6), 472-481. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00153-9

Umezawa ES, Shikanaiyasuda MA, Da Silveira JF, Cotrim PC, Paranhos G, y col (1993). *Trypanosoma cruzi*: Detection of a Circulating Antigen in Urine of Chagasic Patients Sharing Common Epitopes with an Immunodominant Repetitive Antigen. *Experimental Parasitology* 76: 352–357.

Umezawa, E. S., Bastos, S. F., Camargo, M. E., Yamauchi, L. M., Santos, M. R., Gonzalez, A., y col. (1999). Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5), 1554–1560.

Umezawa, E. S., Shikanai-Yasuda, M. A., Gruber, A., Pereira-Chioccola, V. L., y Zingales, B. (1996). *Trypanosoma cruzi* defined antigens in the serological evaluation of an outbreak of acute Chagas disease in Brazil (Catolé do Rocha, Paraíba). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(1), 87–93.

Umezawa, E., Nascimento, M., Kesper, N., Coura, J., Borges-Pereira, 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), 2143–7.

Urbina, J. A., y Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*, 19(11), 495–501. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.001>.

Velásquez-Olivares D. (2012). Identificación de las fuentes sanguíneas de los triatominos de acuerdo al grado de intervención humana en el Estado Barinas. Tesis de pregrado. Universidad de Los Andes. Departamento de Biología.

Vielma R. (2005). Diagnóstico de la enfermedad de Chagas utilizando como antígeno la proteína recombinante de 24 kDa (Pgr24). Tesis de pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes Mérida Venezuela.

Wincker, P., Telleria, J., Bosseno, M.F., Cardoso, M.A., Marques, P., Yaksic, N., Aznar, C., Liegeard, P., Hontebeyrie, M., Noireau, F., Morel, C.M. y Brenière, S.F. (1997). PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. *Parasitology* (in press).

Woo, P. T. (1969). The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Canadian Journal of Zoology*, 47(5), 921–923.

Wu, X.-Z., Huang, T., Mullett, W. M., Yeung, J. M., y Pawliszyn, J. (2001). Determination of isoelectric point and investigation of immunoreaction in peanut allergenic proteins–rabbit IgG antibody system by whole-column imaged capillary isoelectric focusing. *Journal of Microcolumn Separations*, 13(8), 322–326.

Yabsley, M. J., Brown, E. L., & Roellig, D. M. (2009). Evaluation of the Chagas Stat-Pak tm Assay for Detection of *Trypanosoma cruzi* Antibodies in Wildlife Reservoirs. *Journal of Parasitology*, 95(3), 775–777. <http://doi.org/10.1645/GE-1734.1>

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., y Machado, C. R. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051–1054.

www.bdigital.ula.ve