



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN



PERFIL ANTIGÉNICO DE EXTRACTOS PROTEICOS SOLUBLES DE DOS CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Martínez AM¹, Infanzón B², Rojas A², Aria L², López L², Meza T²,
Arévalo I², Acosta ME²

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de
Asunción

² Departamento de Producción, Instituto de Investigaciones en
Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

Financiado por CONACYT 14-inv-162

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE NUEVAS PRUEBAS SEROLÓGICAS DE PRODUCCIÓN LOCAL
PARA DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS Y DENGUE

Introducción

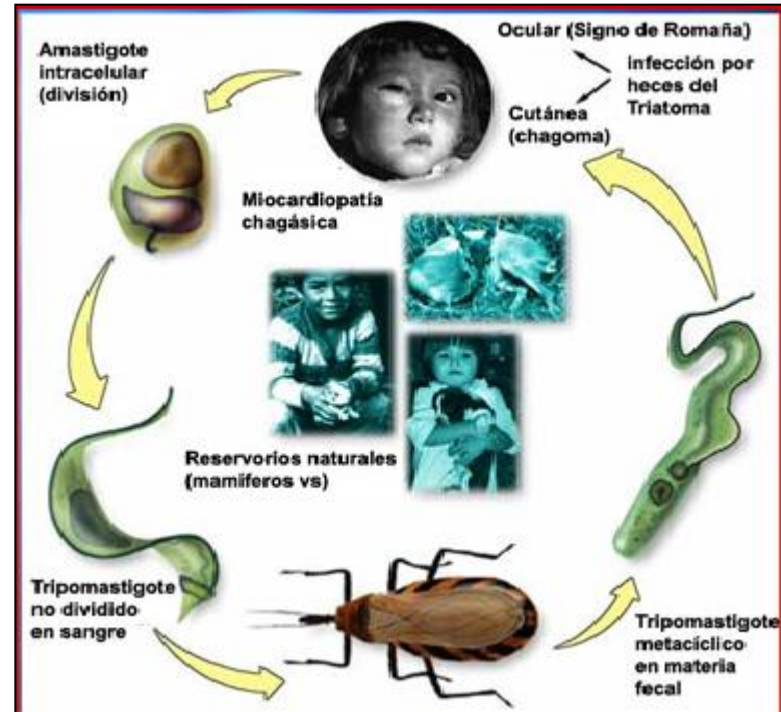
Enfermedad de Chagas:

- Enfermedad parasitaria más importante en Latinoamérica

En Paraguay: 150.000 personas infectadas

- Las poblaciones del *Trypanosoma cruzi* que circulan en Paraguay han mostrado una gran diversidad genética, la cual ha sido evaluada usando diferentes metodologías y técnicas

• Acosta N, et al 2013



T. cruzi: amplia diversidad biológica identificables por marcadores genéticos, moleculares e inmunológicos que podrían diferenciarse en su capacidad antigénica.

Se clasifica en 6 unidades discretas de tipificación (UTDs): TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI. (Zingales *et al.* 2009)

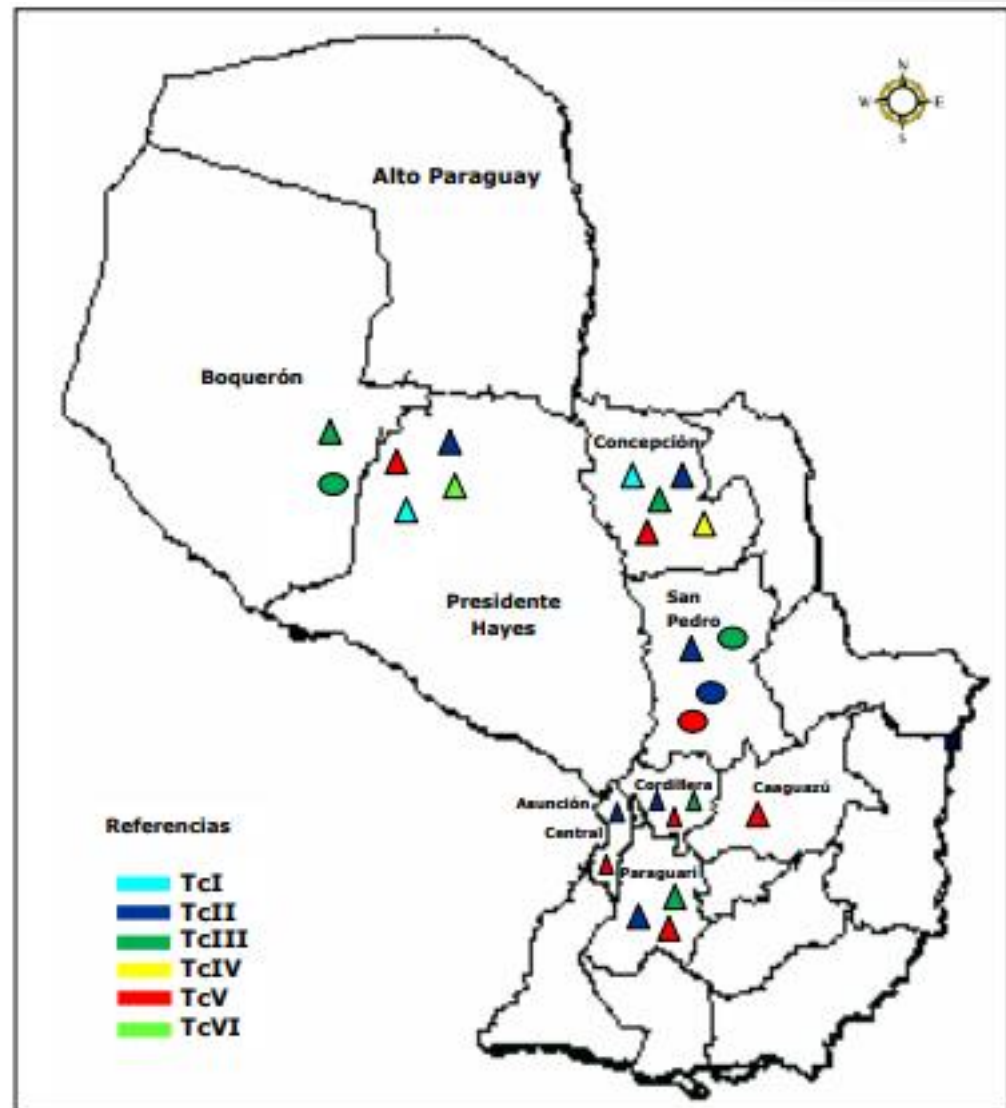


Figura 2. Distribución de las unidades discretas de tipificación (UTDs) del *Trypanosoma cruzi* en el Paraguay. Los triángulos indican ciclo doméstico y peridoméstico, los círculos ciclo selvático.

Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Fase aguda

Parasitemia elevada

- Microscopía
- Hemocultivo
- Xenodiagnóstico
- Métodos moleculares

Fase crónica

Parasitemia escasa

- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)
- Hemaglutinación indirecta (HAI)
- ELISA

No existe una técnica considerada *gold standard*

OMS: diagnóstico por al menos dos métodos con principio diferente

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar el **perfil antigénico** de los extractos proteicos solubles de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar el **patrón de proteínas** de los extractos solubles de *T. cruzi* obtenidos a partir de cada cepa mediante SDS-PAGE.
- Determinar la **capacidad antigénica** de los extractos solubles de las cepas con un panel de sueros de pacientes positivos y negativos para Chagas.

Materiales y métodos

Observacional,
descriptivo, de
corte
transversal

Cepas empleadas:
Y (Ypsilon) (TcII),
CL Brener (TcVI),
Cepa Paraguaya
(TcII)

Cepa Y:
. Ciclo completo
(Y Lote 74),
ciclo incompleto
(Y Lote 73)

Prueba de reactividad

5 sueros de pacientes
positivos Chagas IgG

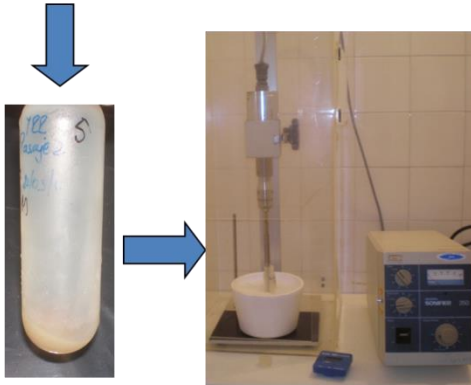
4 sueros de pacientes
negativos

2 controles positivos
(IICS)

1 control
negativo(IICS)

Procedimientos

Cultivo en medio LIT
(*Liver Infusion Tryptose*)
suero fetal bovino al 10%



1×10^7 parásitos /ml

Sonicador Branson Sonifer 450

Lisado (6 ciclos de 1 min en frío)

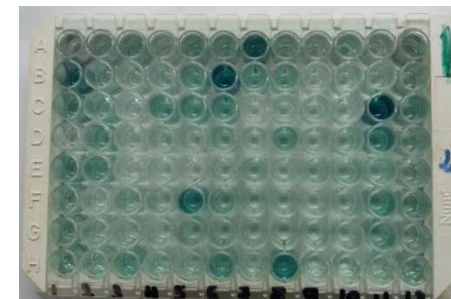
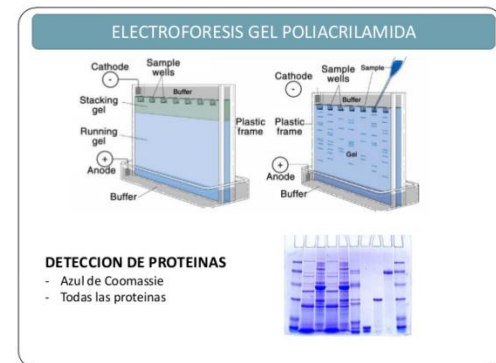


Cultivo Dpto M.Tropical(IICS)
Preparación de los extractos solubles
Sonicación
Bradford

Perfil proteico por SDS-PAGE
Gel del 12%
Técnica de Laemmli

Determinación de la capacidad antigénica
1-ELISA indirecto
2-Western blot
Protocolo de Towbin

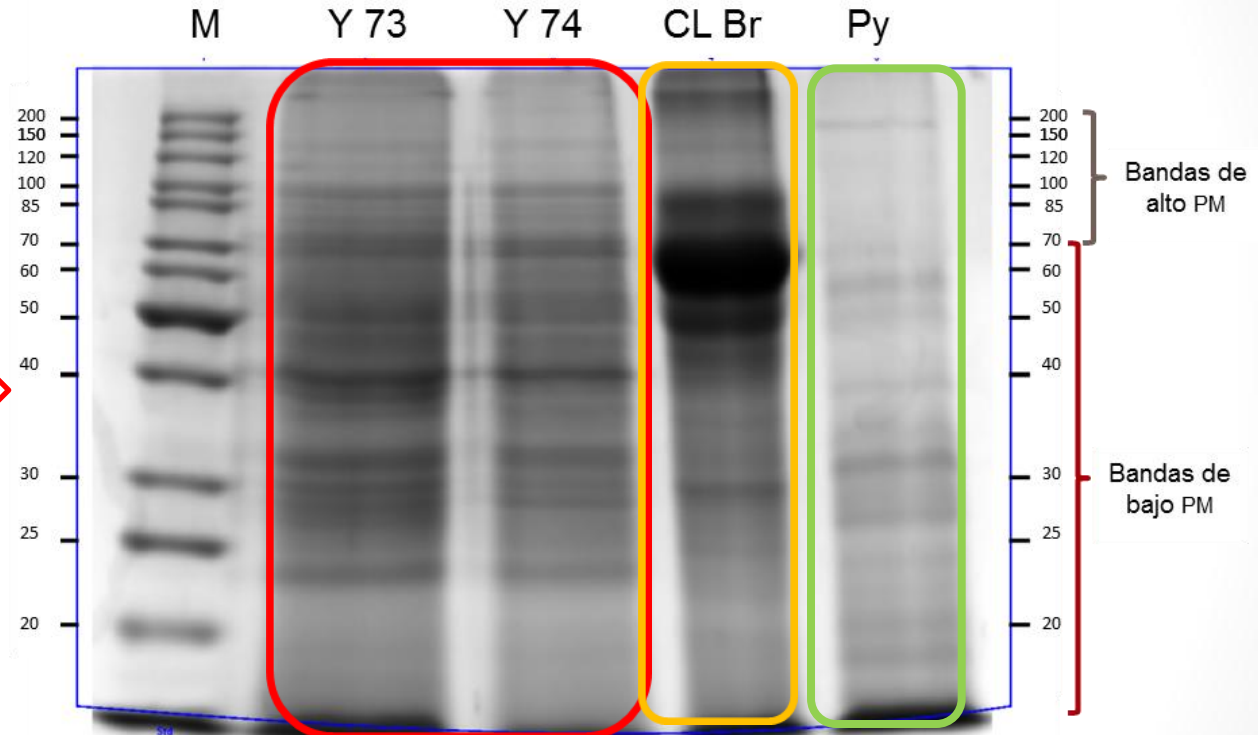
Muestra	Concentración (mg/mL)
Y Lote 73	0,306
Y Lote 74	2,010
CL Brener	0,640
Py	0,05



Resultados y discusión

Equipo Gel Doc EZ (Bio-Rad, USA) Programa: Image Lab 5,2,1 (Bio-rad, USA)

Perfil de proteínas mediante SDS-PAGE



CL Brener: menores de 200 y Banda mayoritaria de 62,5 kDa

E/ 20 y 150 kDa
Se destacan menores de 100 y entre 24 a 41 kDa mayor intensidad

Py: Menor conc, bandas 57,33,31,27kDa

Entre 24 y 40 kDa presentes en todos

Puerto F et al 1996 similitud en 5 cepas de Yucatan rangos de 199 a 10, proteínas antigénicas con sueros 57, 47 y 42 kDa . Vásquez A et al 2015 TESA rangos de 100 a 20 , siendo de 18.0 kDa, mayor reactividad antigénica en los TESA de bajo peso molecular

Perfil de proteínas mediante SDS-PAGE

N° de banda	Y Lote 73		Y Lote 74		CL Brener		Py	
	PM ^a	% Int ^b	PM ^a	% Int ^b	PM ^a	%Int ^b	PM ^a	%Int ^b
1	> a 200	3,1	> a 200	1,4	> a 200	3,4	184,4	4,8
2	137	0,9	140,4	1,2	> a 200	1,8	67,5	5,4
3	114,2	0,5	99,4	6,1	135,6	0,4	57,2	12,7
4	97,3	5,3	87,9	2,2	84,9	14,1	51,2	8,4
5	79	3,7	82,4	3,2	62,5	48,0	38,5	5,5
6	73	6,0	71,7	7,4	51	14,9	33,7	10,0
7	70,1	4,9	69,5	5,9	44,6	5,5	31,3	21,8
8	61,1	3,1	61,4	4,7	41	2,4	27	13,9
9	54,9	3,5	55	5,8	35,9	0,4	23,7	3,3
10	52,8	5,5	52,2	3,7	31,8	1,0	20	6,3
11	48	2,4	47	1,9	29,6	3,9	< a 20	7,9
12	40,6	8,5	41,8	11,7	27,2	1,5		
13	38,8	3,5	39,6	2,5	25,3	1,5		
14	37,1	1,4	37,4	1,7	< a 20	1,2		
15	32,5	10,4	32,9	9,7				
16	30,2	8,9	30,6	6,3				
17	28,8	12,9	29,4	9,1				
18	24	11,6	24,3	11,7				
19	< a 20	3,9	< a 20	3,8				

Equipo Gel Doc EZ
(bio-Rad,USA)
Programa: Image
Lab 5,2,1(Bio-
rad,USA)

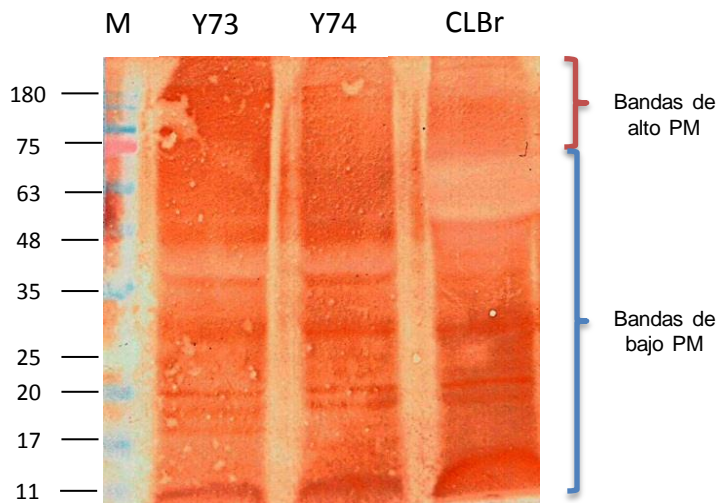
- Estudio de la capacidad antigénica mediante ELISA indirecto IgG

Código del suero	Resultado inicial ^a	Lote 73		Lote 74		CL Brener		Py	
		Abs	Res ^b	Abs	Res ^b	Abs	Res ^b	Abs	Res ^b
C II	P	1,426	P	1,326	P	1,339	P	1,030	P
C I	P	0,702	P	0,708	P	0,676	P	0,431	P
C Neg	N	0,083	N	0,104	N	0,113	N	0,066	N
M1 ^c	P	1,424	P	1,376	P	1,386	P	1,634	P
M2 ^c	P	1,390	P	1,434	P	1,296	P	1,561	P
M3 ^c	P	1,389	P	1,482	P	1,275	P	1,542	P
M4 ^c	P	1,413	P	1,466	P	1,386	P	1,571	P
M5 ^c	P	1,372	P	1,321	P	1,350	P	1,636	P
M6 ^d	N	0,341	I	0,346	I	0,320	I	0,266	I
M7 ^d	N	0,236	N	0,219	N	0,253	N	0,241	N
M8 ^d	N	0,538	I	0,464	I	0,402	I	0,518	I
M9 ^d	N	0,205	N	0,193	N	0,281	N	0,130	N
Puntos de corte		0,283		0,304		0,314		0,266	

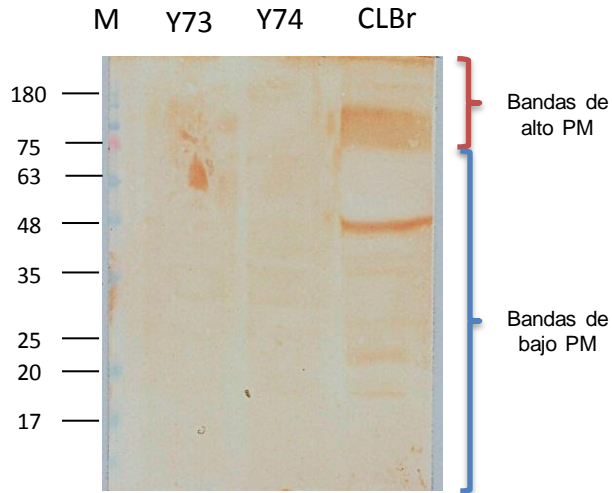
OMS: resultado debe necesariamente ser confirmado con otro método basado en un principio diferente

- Estudio preliminar de la funcionalidad antigénica mediante inmunodetección (*Western blot*)

Reacción con suero chagásico



Reacción con control -



Todos los extractos evaluados:
Reacción con suero chagásico
Prot de **bajo PM**

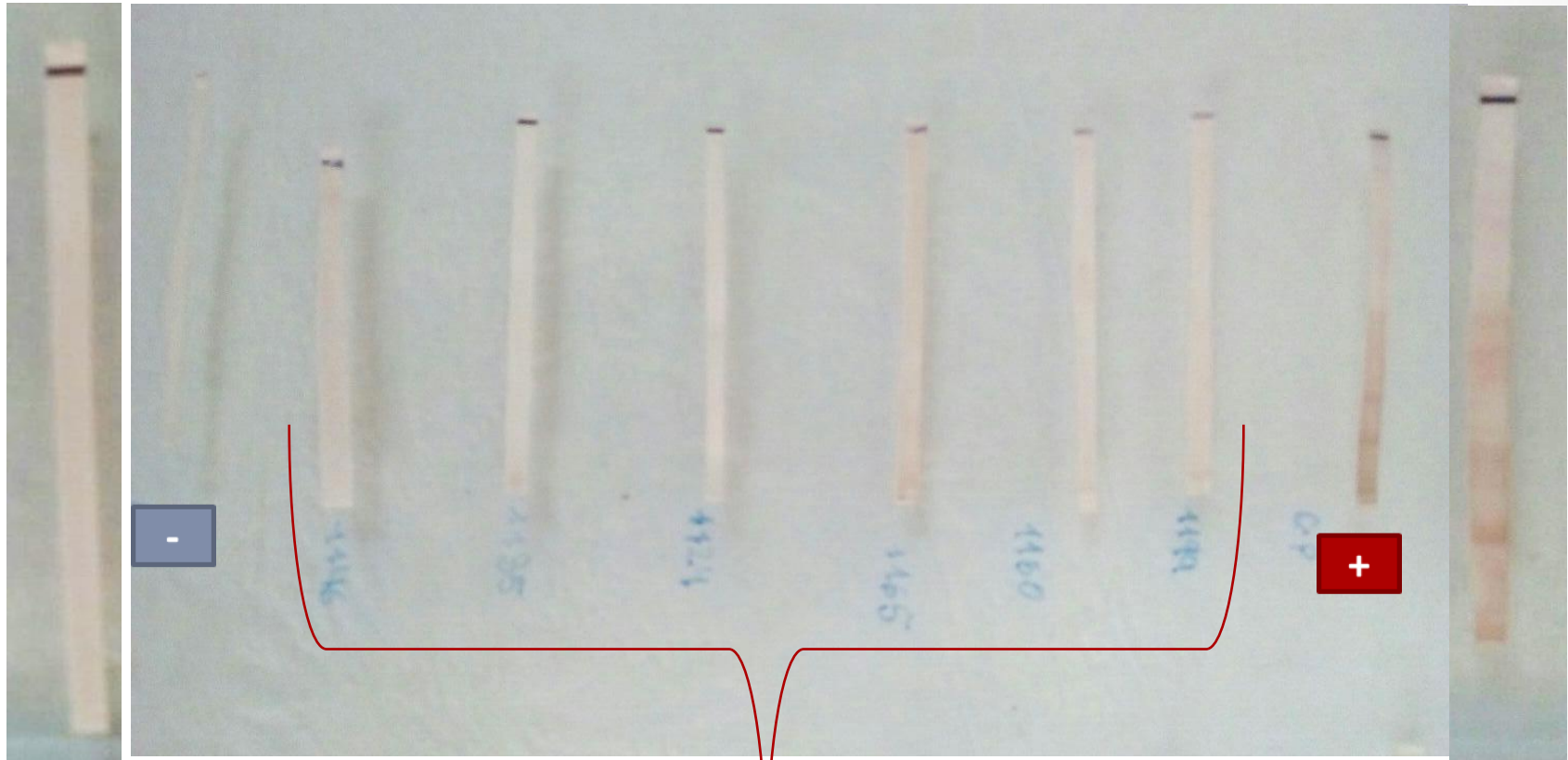
CL Brener:
Reacción inespecífica
con control -

Bandas comunes a Y Lote 73 y 74: 18, 38 y 48 kDa

Bandas comunes a los 3 extractos: 19, 20 y 25 kDa

Potencial para fines diagnósticos

Y lote 73 Ciclo incompleto

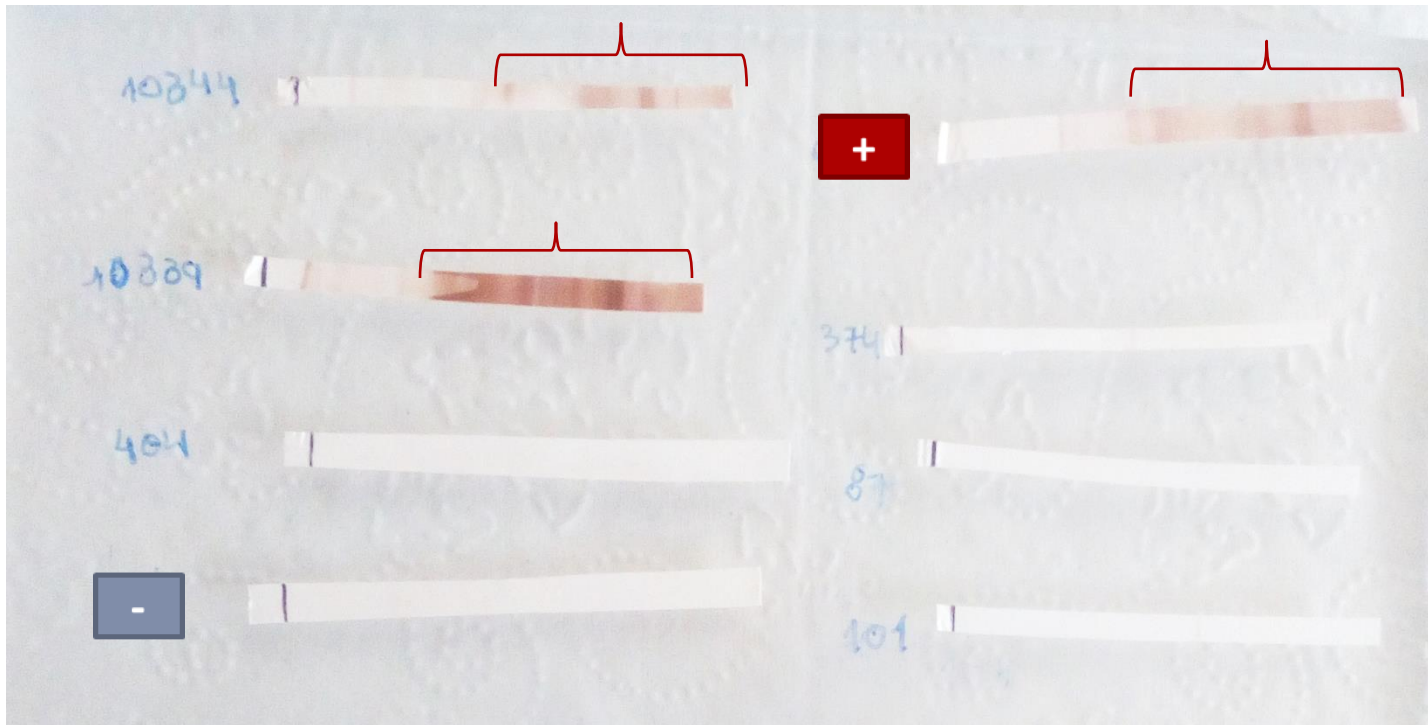


Control
negativo

Sueros negativos

Control
positivo

Y lote 73 Ciclo incompleto



Lima D et al 2007 diferencia en perfil de proteínas y antigenicidad debido a condiciones de mantenimiento diferentes

Conclusiones

Perfil proteico:

- Expresión de proteínas de alto y bajo peso molecular presentando mayor intensidad :
- **Y lote 73 y 74: 24,28,32,41 kDa**
- **CLBrener: 51,62,84 kDa**
- **PY: 27,31,33,51 kDa**

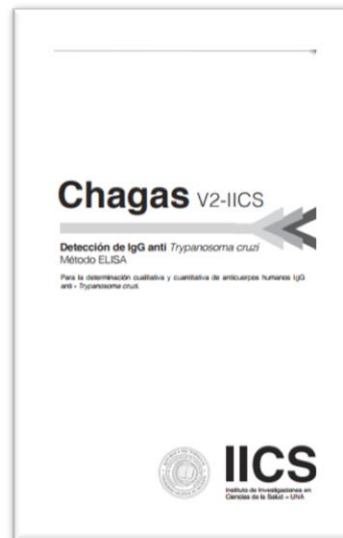
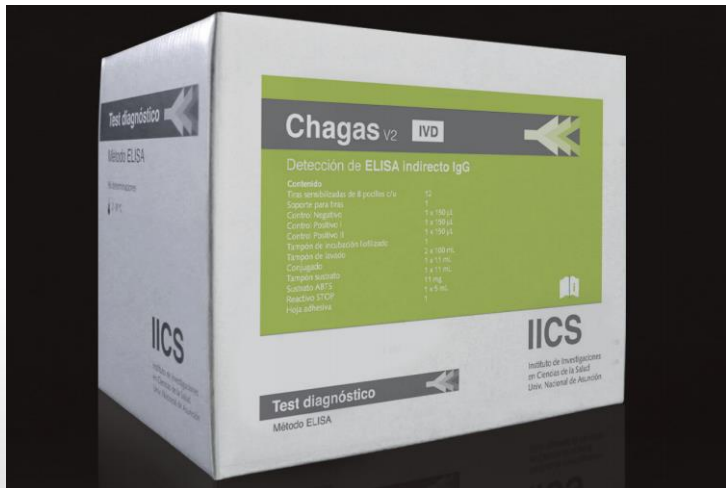
ELISA:

- **Actividad antigénica:** mediante el test con sueros chagásicos y no chagásicos.
- Importancia de la **verificación** de un resultado positivo y del **diagnóstico diferencial**.

Western blot:

- **Antigenicidad** de proteínas de **bajo PM** cepa Y (19, 20 ,25 18, 38 y 48 kDa)frente sueros chagásicos

Gracias por su atención !!



Kits diagnóstico para Chagas

IICS
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud - UNIA

¿Qué es la enfermedad de Chagas?

Es una enfermedad parasitaria tropical, generalmente crónica, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitida por triatómidos (vinchucas).

IICS
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud - UNIA

DIRECCIÓN
Dr. Cecilio Báez o/ Dr. Gaspar Villamayor
2160 Campus Universitario
San Lorenzo, Paraguay
www.iics.unia.py
produccion@iics.unia.py
percepcion@iics.unia.py