

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Estudio preliminar de la prevalencia de cardiopatía chagásica en la provincia de
Manabí, Ecuador y caracterización molecular y biológica de aislados TcI de
*Trypanosoma cruzi***

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas

ANDREA ZURITA LEAL

Quito, 2011

Yo, Dr. Jaime Costales, certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Andrea Zurita Leal ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Jaime Costales

DIRECTOR DE LA DISERTACIÓN

Quito, 24 de Octubre de 2011

AGRADACIMIENTOS

Al Dr. Jaime Costales, director de la disertación, por sus enseñanzas y motivación.

Al Dr. Mario Grijalva y a todo el equipo que conforma el Centro en Investigación de Enfermedades Infecciosas; especialmente al Lcdo. Cesar Yumiseva por su ayuda en la elaboración de los mapas.

Al Ing. Julio Sánchez por su ayuda en el diseño de los métodos estadísticos.

A la Dra. Iliana Alcocer y la MSc. Alexandra Narváez por sus sugerencias.

A mi gran amiga Fernanda Latorre, por brindarme su apoyo incondicional durante esta investigación.

A mis padres, Mario Zurita y Patricia Leal, y a mi hermana, Fernanda Zurita por estar siempre a mi lado y enseñarme a luchar por mis sueños.

A todos mis amigos y colegas que colaboraron en este estudio.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	5
3.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> , AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS ...	6
3.2.1 CICLO DE VIDA DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
3.2.2 TRANSMISIÓN.....	8
3.2.3 VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
3.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	9
3.4 DIAGNÓSTICO.....	10
3.5 MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL HOSPEDERO DURANTE LA INFECCIÓN CON <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
3.6 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	14
3.7 OBJETIVOS.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1 ESTUDIO SEROEPIDEMIOLÓGICO PILOTO EN PACIENTES CARDIACOS EN MANABÍ.....	16
4.1.1 VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE “WESTERN BLOT”	17
4.2 OBTENCIÓN DE EPIMASTIGOTES	19
4.2.1 AISLADOS ECUATORIANOS PROVENIENTE DE VECTORES	19

4.2.2 OTROS AISLADOS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO	20
4.2.3 MANTENIMIENTO DE CULTIVOS DE EPIMASTIGOTES.....	20
4.3 CULTIVO CELULAR <i>IN VITRO</i>	21
4.4 OBTENCIÓN TRIPOMASTIGOTES.....	22
4.4.1 INFECCIÓN DE RATONES BALB/C.....	22
4.5 INFECCIÓN DE CULTIVOS CELULARES.....	23
4.5.1 INFECCIÓN DE CÉLULAS DE RIÑÓN DE MONO (LL)	23
4.5.2 INFECCIÓN DE CÉLULAS DE FIBROBLASTO HUMANO (HFF)	23
4.6 TINCIÓN CON 4,6-DIAMINO-2-FENILINDOL	24
4.7 EXTRACCIÓN DE ADN.....	25
4.7.1 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE	25
4.7.2 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CULTIVO DE EPIMASTIGOTES.....	26
4.8 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL PARÁSITO <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
4.8.1 AMPLIFICACIÓN DEL ADN SATÉLITE DE PARÁSITOS SANGUÍNEOS, PROVENIENTES DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÓNICOS	27
4.8.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS ANALIZADOS.....	28
(TLG 2362, TRC 2376 y “El Salvador”).....	28
4.8.2.1 AMPLIFICACIÓN DEL DOMINIO D7 DEL GEN RIBOSOMAL 24S α CON INICIADORES D71/D72.....	28
4.8.2.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES NUCLEARES GLUCOSA FOSFATO ISOMERASA (GPI)	29
4.8.2.3 DIGESTIÓN DEL AMPLIFICADO CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN <i>HhaI</i>	29

4.8.2.4 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE LA PROTEÍNA DE SHOCK	
TÉRMINICO 60 (HSP60)	30
4.8.2.5 DIGESTIÓN DEL AMPLIFICADO DE HSP60 CON LA ENZIMA DE	
RESTRICCIÓN EcoRV	30
4.8.3 GELES DE AGAROSA	31
4.9 TINCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES MEDIANTE EL TINTE GIEMSA	31
4.10 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE	
“WESTERN BLOT”	32
4.10.1. LAVADO PARA REUTILIZACIÓN DE MEMBRANAS	33
5. RESULTADOS	34
5.1 ESTUDIO SEROEPIDEMIOLÓGICO EN PACIENTES CARDIACOS EN	
MANABÍ	34
5.2 OBTENCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES A PARTIR DE CULTIVOS DE	
EPIMASTIGOTES.....	35
5.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PARÁSITOS SANGUÍNEOS DE	
PACIENTES CHAGÁSICOS DE LA PROVINCIA DE MANABÍ.....	36
5.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	
(TLG 2362, TRC 2376, “El Salvador”)	36
5.5 MEDICIÓN DE TRIPOMASTIGOTES	37
5.6 INFECTIVIDAD DE AISLADOS ANALIZADOS	38
5.7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA FOSFORILASA DE	
NUCLEOTIDOS PURINADOS (PNP) EN FIBROBLASTOS HUMANOS	
INFECTADOS CON <i>Trypanosoma cruzi</i>	38

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	40
6.1 ESTUDIO SEROEPIDEMIOLÓGICO EN PACIENTES CARDIACOS EN MANABÍ	42
6.2 OBTENCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES A PARTIR DE CULTIVOS DE EPIMASTIGOTES.....	44
6.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PARÁSITOS SANGUÍNEOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS DE LA PROVINCIA DE MANABÍ.....	45
6.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE TRIPOMASTIGOTES (TLG 2362, TRC 2376, “El Salvador”)	47
6.5 LONGITUD DE TRIPOMASTIGOTES E INFECTIVIDAD DE LOS AISLADOS	48
6.6 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE PNP EN LAS CÉLULAS INFECTADAS	50
6.7 LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	52
7. RECOMENDACIONES	53
9. FIGURAS	60
10. TABLAS.....	78
11. ANEXOS	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
Figura 2. Fotografía de un cassette de STAT-PAK con muestra sanguínea de pacientes....	62
Figura 3. Mapa de la provincia de Manabí.....	63
Figura 4. Fotografía de un casete de STAT-PAK con muestra sanguínea de pacientes sero-positivos.	64
Figura 5. Comprobación de la reactividad de los sueros de pacientes chagásicos crónicos cardiacos, mediante la técnica de “Western Blot” ..	65
Figura 6. Amplificación de ADN satélite de <i>Trypanosoma cruzi</i> aislado de pacientes chagásicos crónicos cardiacos..	66
Figura 7. Amplificación del gen ribosomal 24S α (D71/D72).....	67
Figura 8. Amplificación del gen GPI y los productos de restricción con la enzima <i>HhaI</i>	68
Figura 9. Amplificación del gen Hsp60 y productos de restricción con la enzima <i>EcoRV</i>	69
Figura 10. Tripomastigotes pertenecientes al aislado “El Salvador”	70
Figura 11. Tripomastigotes pertenecientes al aislado TLG 2362.....	71
Figura 12. Tripomastigotes pertenecientes al aislado TRC 2376.....	72
Figura 13. Diferencia en el tamaño de tripomastigotes.	73
Figura 14. Fotografías representativas de células de fibroblasto humano infectadas con los distintos aislados analizados.	74
Figura 15. Porcentaje de infectividad <i>in vitro</i> de las cepas analizadas.....	75
Figura 16. “Western blot” para PNP y actina en células HFF infectadas por <i>T. cruzi</i>	76
Figura 17. Densidad de las bandas de PNP cada 24, 48 y 72h.....	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de anticuerpo primario utilizado en la técnica de “Western Blot” .	79
Tabla 2. Información general de los participantes del proyecto piloto de detección de la enfermedad de Chagas en pacientes cardiacos	80
Tabla 3. Información general sobre los pacientes sero-positivos.....	81
Tabla 4. Comprobación de la reactividad de los sueros de los pacientes positivos,utilizando distintos kits comerciales de ELISA.....	82
Tabla 5. Descriptivos de la ANOVA pertenecientes al experimento de longitud de tripomastigotes.....	83
Tabla 6. Prueba estadística ANOVA de un factor para longitud	84
Tabla 7. Prueba estadística de Tukey: diferencias entre longitud	85
Tabla 8. Tabla de descriptivos de la ANOVA pertenecientes al experimento de infectividad de los aislados analizadas.	86
Tabla 9.Prueba estadística ANOVA de un factor para infectividad de los aislados analizadas	87
Tabla 10.Prueba estadística de Tukey: diferencias entre infectividad de los aislados analizados	88

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Documentos utilizados durante la investigación con sujetos humanos	90
Anexo 2. Soluciones utilizadas en la técnica de “Western Blot”	94
Anexo 3. Solución de White.....	104
Anexo 4. Solución salina tamponada con fosfato (PBS 1 X)	105
Anexo 5. Hemocultivo	106
Anexo 6. Preparación de medio infusión de hígado triptosa (LIT).....	108
Anexo 7. Cultivo para crecimiento celular suplementado con suero fetal bovino.....	109
Anexo 8. Infección de ratones Balb/c	110
Anexo 9. Cultivo de células HFF en placas de seis pocillos	111
Anexo 10. Infección de células HFF con tripomastigotes	112
Anexo 11. Preparación de paraformaldehído al 4%	113
Anexo 12. Preparación de buffers utilizados en la extracción de ADN a partir de fenol cloroformo.....	114
Anexo 13. Amplificación de templado de ADN con el Kit Repli-g Ultra Fast	116
Anexo 14. Tinción GIEMSA.....	117
Anexo 15. Verificación de resultados de pacientes seropositivos	121

1. RESUMEN

La enfermedad de Chagas (ECh), causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, se caracteriza por ocasionar cardiopatías y daños en el sistema digestivo. En el Ecuador, está presente en la Costa, Amazonía y en las regiones subtropicales de la Sierra; se estima que aproximadamente 165 a 170 mil personas se encuentran infectadas con *T. cruzi* en el país. Sin embargo, a pesar de que los daños cardiacos son el más común y perjudicial efecto de la enfermedad de Chagas, en nuestro país se desconoce la prevalencia de cardiopatía chagásica.

Por ello, se realizó un estudio piloto sobre la seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en las unidades de cardiología de hospitales de la provincia de Manabí. Se buscó caracterizar algunas de las propiedades biológicas de los parásitos que circulan en nuestro país, como características morfológicas, infectividad *in vitro*, y capacidad de inducir cambios en la expresión génica de las células infectadas *in vitro*. En el estudio piloto sobre cardiopatía chagásica en Manabí, encontramos que alrededor del 2% de pacientes que participaron en el estudio son reactivos en pruebas serológicas para Chagas. Ni los cardiólogos ni los pacientes estaban al tanto de esta infección. Esto demuestra la necesidad de estudios más amplios sobre cardiopatía chagásica en nuestro país. Se deseaba aislar parásitos de estos pacientes para estudiar sus propiedades biológicas. Dado que esto no fue posible (por la baja parasitemia que presentan los pacientes crónicos), estos estudios se realizaron empleando parásitos aislados a partir de vectores en la provincia de Manabí, y un aislado proveniente de un paciente con cardiopatía chagásica crónica de origen salvadoreño. Estos tres aislados fueron caracterizados molecularmente, y se determinó que todos pertenecen al linaje TcI. A pesar de ello, se encontró una amplia variación en cuanto al largo de los tripomastigotes (rango 7,14 μm - 11,36 μm), a la infectividad *in vitro* que

presentan (rango 24,33 % - 61,33%). Asimismo se evaluó la capacidad de estos aislados de inducir la expresión del gen de la fosforilasa de nucleósidos purinados (PNP) en las células que infectan, la cual ha sido reportada utilizando la “cepa Y” de *T. cruzi*; una cepa de laboratorio que corresponde al genotipo TcII. Se reportó, que los tres aislados estudiados, pertenecientes al linaje TcI, son capaces de inducir la expresión de PNP.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, cardiopatía chagásica, expresión génica, PNP

2. ABSTRACT

Chagas disease, caused by the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*, causes cardiopathy and digestive track damages. In Ecuador, it is present in the Coast, Amazon and subtropical regions of the Andean highlands, and approximately 165 to 170 thousand people are estimated to be infected with *T. cruzi* in the country. However, despite cardiac damages being the most common and harmful effect of chronic Chagas disease, the prevalence of chagasic cardiomyopathy is unknown in our country. Therefore, a small pilot project was conducted to investigate Chagas disease seroprevalence in the cardiac wards of Manabí province hospitals. We also intended to characterize some of the biological properties of parasites circulating in Ecuador, such as morphological characteristics, *in vitro* infectivity and the ability to induce changes in gene expression in *in vitro* infected cells. In the study in cardiac wards in the Manabi province, we found that ~2 % of the participants were reactive in serological tests for Chagas. Neither the treating cardiologist nor the patients were aware of this infection, demonstrating the need of further studies in chagasic cardiomyopathy in our country. Our intention was to isolate parasites of these patients to study their biological properties. Since this was not possible (because of the low parasitemia chronic patients present), these studies were conducted using parasites isolated from vectors of Manabí province and an isolate from a patient from El Salvador suffering chronic Chagas cardiopathy. Molecular characterization of the three isolates indicates that all of them belong to the TcI lineage. However, we found a significant variation in the length of the trypomastigotes (range 7,14 - 11,36 μm) and in the *in vitro* infectivity (range 24,33 % - 61,33%). Furthermore, the ability of these isolates to induce the expression of the purine nucleoside phosphorylase (PNP) gene in the cells they infect was evaluated. *T. cruzi* Y-strain, a laboratory strain that corresponds to the genotype TcII, has been

previously reported to be able to induce PNP expression. Here we report that recently isolated TcI parasites are also able to induce the expression of PNP.

Key Words: *Trypanosoma cruzi*, Chagasic cardiomyopathy, gene expression, PNP

3. INTRODUCCIÓN

3.1 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas (ECh), causada por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi*, se caracteriza por ocasionar cardiopatías y daños en el sistema digestivo. Está presente en Centro y Sur América; aunque en países como Chile, Brasil y Uruguay se ha reducido notablemente la incidencia de la enfermedad debido a la conformación de programas de control (Guhl, 2007). En el Ecuador, está presente en la Costa, Amazonía y en las regiones subtropicales de la Sierra; siendo Guayas, Manabí, El Oro y Loja las provincias con mayor incidencia de la enfermedad. Se estima que aproximadamente 165 a 170 mil personas se encuentran infectadas con *T. cruzi* en el país, de las cuales 1300 mueren cada año (Aguilar *et al.*, 2006).

En la provincia de Manabí, se han reportado casos cuyos síntomas parecen corresponder a los de la ECh desde el año 1530 (Aguilar *et al.*, 1999). En esta misma provincia, se conoce que la población de los cantones Portoviejo, Manta, Montecristi, Chone, Flavio Alfaro, Jipijapa, Puerto López, Sucre, Bolívar, Junín, Rocafuerte, Pedernales, Olmedo, El Carmen y Paján, entre otros, vive con un alto riesgo de contagio debido a la presencia de vectores de la ECh (Abad y Aguilar, 2002); siendo las especies más comunes de triatomíneos *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius ecuadoriensis*, pero también están presentes *Pastrongylus rufotuberculatus*, *P. geniculatus* y *P. howardi* (Aguilar *et al.*, 1999).

3.2 *Trypanosoma cruzi*, AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas y su agente causal fueron descubiertos en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas. Carlos Chagas describió al parásito y demostró que este cumplía una parte de su ciclo de vida en hospederos mamíferos y otra en insectos vectores, los cuales luego fueron reconocidos como miembros de la subfamilia Triominae (Abad y Aguilar, 2000).

A lo largo de su ciclo de vida, *T. cruzi* asume diferentes estadios morfológicos, los cuales se conocen como epimastigote, tripomastigote metacíclico y amastigote. Estos se diferencian principalmente por la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo (Wiser, 2007). El cinetoplasto, el cual se encuentra ubicado en la mitocondria, es un organelo presente únicamente en los tripanosomátidos; este comprende de una red conformada por dos tipos de moléculas circulares de ADN conocidas como minicírculos (0,5 a 10 kb) y maxicírculos (20 a 40 kb) (Lukeš *et al.*, 2002). Los minicírculos contienen genes para ARNs pequeños, los cuales están involucrados en la conformación de ARNs mensajeros (De Souza, 1999); mientras que los maxicírculos contienen genes para ARNs ribosomales y proteínas (Lukeš *et al.*, 2002). En los tripomastigotes el cinetoplasto se encuentra en posición posterior al núcleo, en los epimastigotes se encuentra en la parte anterior del núcleo; mientras que en los amastigotes, los cuales no tienen flagelo libre y son esféricos, el cinetoplasto se encuentra cerca del núcleo (Wiser, 2007). Este parásito también se caracteriza por poseer zonas repetitivas conocidas como ADN satélite; las cuales pueden variar en tamaño y número de copias dependiendo de la cepa (Liarte *et al.*, 2009).

3.2.1 CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* incluye varias etapas que ocurren tanto en el interior de los insectos hematófagos que actúan como vectores y en hospederos mamíferos. En el tracto digestivo del vector, *T. cruzi* se encuentra en el estadio morfológico conocido como epimastigote, el cual se multiplica por fisión binaria. Al llegar al intestino posterior del insecto, los parásitos se transforman en tripomastigotes metacíclicos. Un corto tiempo después de alimentarse de la sangre de un mamífero, el vector defeca, depositando sus heces en las inmediaciones de la herida causada por la picadura. Las heces contienen una gran cantidad de tripomastigotes metacíclicos altamente infecciosos que acceden al torrente sanguíneo del hospedero mamífero a través de la herida causada por la picadura del vector. Los parásitos invaden las células del huésped y se transforman en amastigotes, los cuales se multiplican intracelularmente para luego dar origen a nuevos tripomastigotes. Estos pueden invadir nuevas células o ser ingeridos por otros chinchorros y reiniciar el ciclo (WHO, 2002) (Figura 1).

Inicialmente, *T. cruzi* tenía un ciclo netamente selvático en donde los huéspedes eran mamíferos silvestres tales como marsupiales, roedores, perezosos y primates (Jansen *et al.*, 1999). La tala de bosques y la posterior colonización de las áreas deforestadas por parte del ser humano, ha provocado que los vectores que se encuentran en la proximidad de las viviendas puedan ganar acceso a ellas. De este modo, la infección de humanos y animales domésticos se ha vuelto posible (Coura, 2007).

Los materiales con los cuales están construidas las viviendas en áreas rurales pobres, tales como adobe, ramas y paja, al igual que la acumulación de escombros y nidos

de gallinas, crean refugios para los vectores y favorecen su interacción con el ser humano (Abad y Aguilar, 2002).

3.2.2 TRANSMISIÓN

La enfermedad de Chagas puede ser transmitida por varias vías tales como: contacto con las heces contaminadas de insectos hematófagos de la familia Reduviidae, transfusión de sangre o transplantes de órganos contaminados con *T. cruzi*, ingesta de comida contaminada, y transmisión congénita (WHO, 2002).

El contacto con las heces contaminadas del vector es el causante del 80% de los casos, siendo la transfusión de sangre el segundo modo de infección más común con el 16% de los casos; la infección congénita es responsable de un 2% de los casos (Abad y Aguilar, 2000).

3.2.3 VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi posee una alta diversidad genética, y se han distinguido dos linajes principales, conocidos como TcI y TcII. Estos se diferencian con respecto al gen del RNA ribosomal de 24S α , isoenzimas y el gen mini-exón. El linaje TcI posee isoenzimas zimodemo 1; mientras que el gen RNA ribosomal 24S α y mini-exon pertenecen al grupo 2 (De Freitas *et al.*, 2006). El linaje TcII con respecto a las isoenzimas pertenece al zimodemo 2; mientras que el gen RNA ribosomal 24S α y mini-exon pertenecen al grupo 1 (De Freitas *et al.*, 2006). *T. cruzi* también se caracteriza por poseer secuencias repetitivas en su genoma, conocidas como ADN satélite; las cuales son utilizadas para diferenciar

entre linajes (Gonzalez *et al.*, 1984). La presencia de la repetición tándem de 195 pb permite distinguir al linaje TcII con respecto al TcI (Liarte *et al.*, 2009). El linaje TcII se divide en 5 sublinajes (TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId y TcIIe) (De Freitas *et al.*, 2006); por su parte el linaje TcI también es altamente variable (Llewellyn *et al.*, 2009; Ocaña *et al.*, 2010) y algunos autores han sugerido la necesidad de subdividirlo (Guhl, 2011).

En los últimos años la estructura poblacional de *T. cruzi* ha sido ampliamente estudiada, mediante análisis moleculares, lo que ha permitido obtener mayor información sobre los distintos linajes y sublinajes. Debido a estos nuevos conocimientos se ha propuesto realizar un cambio en la nomenclatura del parásito, dividiendo los linajes TcI y TcII en unidades discretas de tipaje (DTUs); de este modo cambiando la nomenclatura a: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI (Zingales *et al.*, 2009).

Estudios moleculares han demostrado que los linajes TcI, TcII, TcV, TcVI se encuentran asociados con el ciclo doméstico (Llewellyn *et al.*, 2009). Mientras que el linaje TcIII está mayormente relacionado con el ciclo selvático (Miles *et al.*, 2009). El linaje que predomina en la parte norte de Sur América es el linaje TcI, tanto en ciclo silvestre como doméstico (Añez, *et al.*, 2004; Ramírez, *et al.*, 2010). Igualmente, en Norte América y en países de Centro América tales como México, el linaje predominante es el TcI (Bosseno *et al.*, 2002 y Roelling *et al.*, 2008)

3.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La Ech consta de dos fases: aguda y crónica. En la fase aguda se presentan síntomas como dolor de cabeza, fiebre, malestar general y desorientación; otra

característica son anomalías cardíacas tales como taquicardia, disminución del voltaje del complejo QRS, bloqueo aurículo-ventricular y cambio en las ondas T, son evidentes en el electrocardiograma. Estos síntomas desaparecen después de cuatro a ocho semanas, sin causar problemas secundarios. Por ello, es difícil diagnosticar la fase aguda. La única manifestación física que permite reconocer la enfermedad en esta etapa es por el signo de Romaña. Este se genera por el contacto del parásito con la conjuntiva del ojo, provocando un edema debido a la acumulación de fluidos linfáticos (WHO, 2002).

La fase crónica puede presentarse de distintas formas: indeterminada, cardíaca y/o digestiva. En la forma indeterminada, la cual es asintomática, se presenta acumulación de células inflamatorias en el miocardio; pero esto tan solo puede ser observado mediante biopsia. La forma cardíaca presenta inflamación del miocardio, aneurisma del ventrículo izquierdo, trombosis mural, disnea, dolor torácico y cardiomegalia por dilatación o por hipertrofia. En la forma digestiva se generan heridas en el plexo mientérico a lo largo de todo el tracto digestivo, afectando mayormente al colón y esófago. Los daños causados por las forma cardíaca de la enfermedad ocurren en 30% de las personas infectadas y pueden resultar en incapacidad para trabajar, o inclusive la muerte (WHO, 2002).

3.4 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la fase aguda se realiza a través de microscopía directa, esto se debe a que en esta etapa los parásitos, en el estadio de tripomastigotes, se encuentran libres en la sangre por lo cual se los puede observar fácilmente (WHO, 2002).

Durante la fase crónica existe un número reducido de parásitos en la sangre, ya que estos han invadido los órganos. Entre las mejores técnicas para diagnosticar la enfermedad están PCR de secuencias específicas para el parásito y la serología. Las técnicas serológicas más empleadas son “Western Blot”, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) e inmunofluorescencia indirecta (IFI) (WHO, 2002).

La prueba STAT-PAK® (Chembio Diagnosis System, Medford, NY, USA), es ampliamente utilizada debido a su habilidad para detectar anticuerpos contra *T. cruzi* (Ponce *et al.*, 2005). Esta prueba consiste en un cassette y un diluyente. El cassette contiene antígenos del parásito inmovilizados sobre una membrana, además de una proteína capaz de unirse específicamente a anticuerpos; la cual se encuentra asociada a partículas pigmentadas (Luquetti *et al.*, 2003). Esta prueba posee un control interno, el cual reconoce inmunoglobulinas IgG; formando una línea de color púrpura, comprobando su buen funcionamiento (Figura 2).

Al colocar la muestra en la zona designada, esta fluye a través de la membrana gracias al diluyente; al existir anticuerpos específicos contra *T. cruzi*, se forma un complejo proteína-anticuerpo. Este complejo se une al antígeno formando una segunda franja de color púrpura; (Figura 2) (Luquetti *et al.*, 2003). La presencia de esta banda indica que el individuo ha tenido contacto con el parásito.

Esta prueba facilita el diagnóstico serológico de la enfermedad, especialmente en zonas rurales en donde los centros de salud no poseen los recursos económicos ni los implementos necesarios para realizar las pruebas anteriormente mencionadas (Ponce *et al.*, 2005).

3.5 MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL HOSPEDERO DURANTE LA INFECCIÓN CON *Trypanosoma cruzi*

Durante la fase intracelular del ciclo de *T. cruzi*, las células hospederas muestran importantes cambios en la expresión de sus genes. Estos cambios son más evidentes a partir de las 24 horas de infección intracelular, posiblemente porque el escape de los parásitos de la vacuola parasitófora y su posterior transformación en amastigotes en el citoplasma de la célula hospedera podrían ser los eventos que los inicien (Vaena de Avalos *et al.*, 2002). Por un lado, la modulación de la expresión génica de las células huéspedes se deben al inicio de la respuesta inmune por parte de las células infectadas, mientras que por otro posiblemente reflejan modulación génica inducida por el parásito para su propio beneficio.

Existe evidencia que un alto número de genes de las células huésped, entre ellos interferón β (Chessler *et al.*, 2008), colágeno I (Unnikrishnan *et al.*, 2004), genes responsables de la dinámica del tejido conectivo (CTGF) (Unnikrishnan *et al.*, 2004) y el gen fosforilasa de nucleósidos fosforilados (PNP) (Costales *et al.*, 2009), son modulados durante la infección intracelular de *T. cruzi*. En este estudio se escogió analizar la expresión del gen PNP en respuesta a la infección por aislados TcI.

Como ya se explicó anteriormente, la modulación de los genes es más significativa 24 h después de la infección intracelular (Vaena de Avalos *et al.*, 2002). Un número menor de genes, tales como los de la familia interferón I, se activan casi inmediatamente con el ingreso del parásito a la célula. Un claro ejemplo es el gen interferón β (IFN- β); el cual se expresa a partir de las dos primeras horas de infección,

existiendo un aumento drástico de sus transcriptos a las 16 h post infección (Chessler *et al.*, 2008). Este gen es de suma importancia ya que al expresarse activa citoquinas anti-virales, células asesinas naturales y varios otros genes que en conjunto contribuyen a la respuesta inmune contra el parásito (Vaena de Avalos *et al.*, 2002).

La enzima fosforilasa de nucleósidos purinados es esencial en el metabolismo de purinas, esta permite la transformación de inosina y guanosina a hipoxantina (Knutse, 2009). Al existir deficiencia de esta enzima en el ser humano se genera un ambiente tóxico, de este modo impidiendo el desarrollo de las células T, afectando el sistema inmune (Knutse, 2009). *T. cruzi* carece de esta enzima, haciendo imposible la producción de nucleótidos purinados por su propia cuenta (Landfear *et al.*, 2004). Se ha demostrado que cuando *T. cruzi* infecta fibroblastos humanos intracelularmente, la expresión del gen PNP es inducida (Costales, *et al.*, 2009). Dado que el parásito requiere de los productos de la enzima PNP (nucleótidos purinados) para su desarrollo y replicación, es probable que el parásito induzca la actividad de PNP para favorecer su propia supervivencia (Costales *et al.*, 2009).

Cabe recalcar que la información actualmente disponible acerca de la modulación de la expresión génica en las células hospederas se ha obtenido utilizando la “cepa Y” de *T. cruzi*, que corresponde al genotipo TcII (Vaena de Avalos *et al.*, 2002). Dadas las diferencias entre los distintos genotipos de *T. cruzi*, sería muy interesante recabar información con cepas de parásito pertenecientes al genotipo TCI, que son abundantes en el Ecuador. Además, dado que la “cepa Y” de *T. cruzi* ha sido mantenida en cultivo en laboratorio por más de medio siglo, sería de gran importancia obtener información sobre cepas que estén en circulación actualmente, ya que estas reflejarían

mejor la realidad de las infecciones actuales, debido a que las cepas de laboratorio pueden perder virulencia o variar sus características con el tiempo.

3.6 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Este estudio permite obtener información en dos aspectos importantes para entender la biología de la enfermedad de Chagas en el Ecuador: a) la prevalencia de la ECh en la provincia de Manabí, así como el genotipo de los parásitos que circulan en los pacientes chagásicos crónicos, b) el tipo y la intensidad de modulación génica que los linajes de *T. cruzi*, que circulan en la provincia de Manabí, inducen en las células humanas.

3.7 OBJETIVOS

A. General

- Evaluar la capacidad de los parásitos circulantes en la provincia de Manabí para inducir cambios en la expresión génica de las células humanas, a través de la técnica de “Western Blot”.
- Caracterizar los parásitos aislados en la provincia de Manabí, mediante el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

B. Específicos

- Mediante un estudio piloto, evaluar serológicamente la incidencia de anticuerpos contra *T. cruzi* entre los pacientes que asisten al área de cardiología de los principales hospitales de la ciudad de Portoviejo; empleando la prueba rápida STAT-PAK®.
- Aislamiento de cepas de *T. cruzi* circulantes en Manabí, mediante su reproducción en hemocultivos (idealmente provenientes de pacientes crónicos cardíacos de los hospitales de Portoviejo; en el caso que no sea posible el aislamiento de parásitos provenientes de pacientes se trabajará con aislados de insectos vectores).
- Caracterizar molecularmente los aislados de la provincia de Manabí
- Evaluar la capacidad de los parásitos *T. cruzi*, que circulan en Manabí, para inducir la expresión de la enzima fosforilasa de nucleósidos purinados en células humanas infectadas *in vitro*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ESTUDIO SEROEPIDEMIOLÓGICO PILOTO EN PACIENTES CARDIACOS EN MANABÍ.

Se realizó un estudio piloto en el área de cardiología de los hospitales Verdi Cevallos Balda y el Hospital del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social (IESS) de Portoviejo, entre las fechas 22 de junio al 3 de julio de 2009. El estudio constó de 95 participantes; reclutando 20 y 75 individuos respectivamente. Los procesos de investigación que involucran sujetos humanos se realizaron de acuerdo a procedimientos previamente aprobados por el comité de ética de la Universidad de Ohio. Esta investigación fue liderada por el Dr. Jaime Costales, investigador principal del Centro en Investigaciones en Enfermedades Infecciosas (CIEI) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

A todos los potenciales participantes se les informó sobre el propósito del estudio, sus beneficios y posibles riesgos. Los individuos que decidieron formar parte de la investigación firmaron un documento de consentimiento (Anexo 1a) y respondieron a una encuesta sero-epidemiológica (Anexo 1b). Se proporcionó una ficha al médico tratante en donde debía marcar los síntomas del paciente (Anexo 1c).

Posteriormente en los hospitales, se realizaron pruebas STAT-PAK® (Chembio, Medford, NY, USA) a todos los participantes. Para ello se desinfectó la yema del dedo anular de cada paciente con etanol al 70%, se realizó una punción con una lanceta estéril

desechable, se eliminó la primera gota de sangre limpiándola con papel estéril y se tomaron 10 µl de sangre con una pipeta plástica que el kit provee para tal efecto. La sangre se colocó en la zona designada para la muestra en el cassette STAT-PAK®; se agregaron seis gotas de diluyente y se esperó 15 minutos. Al existir la presencia de anticuerpos contra el protozoario *T. cruzi* se observó dos líneas en la membrana del STAT-PAK; de lo contrario tan solo se observó una línea, la cual corresponde al control (Figura 2).

Al ser reactivo el paciente, se realizó otra prueba rápida para confirmar el resultado; posteriormente se tomaron muestras de sangre venosa para obtener suero (tubos separadores de suero, 10 ml) (Vacutainer®, Franklin Lakes, NJ, USA) y para posterior extracción de ADN (tubos con EDTA, 5 ml) (Vacutainer®, Franklin Lakes, NJ, USA). Finalmente, se inocularon tubos conteniendo medio de cultivo bifásico con tres gotas de sangre; al existir la presencia del parásito en la muestra sanguínea estos se multiplicaran ya que poseen los nutrientes necesarios para su desarrollo y supervivencia.

4.1.1 VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE “WESTERN BLOT”

Se comprobó la presencia de anticuerpo contra la ECh, en el suero del paciente, mediante la técnica de “Western Blot”. Para obtener el antígeno se contó mediante el uso del hemocitómetro 1×10^7 parásitos, a los cuales se los centrifugó a 13000 xg por 10 minutos; se los lavó por dos ocasiones con tampón fosfato salino 1X (PBS). A estos se le agregó buffer de muestra, el cual se lo precalentó a 100 °C, de este modo lisando los parásitos.

Para los geles de poliacrilamida; primeramente se preparó el gel de separación al cual se le adicionó 50 µl de n-butanol para permitir su rápida polimerización; una vez polimerizado se agregó el gel de apilamiento (Anexo 2a).

Se insertó el gel en la cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se prosiguió a cargar el antígeno. Se dejó correr aproximadamente por una hora a 100 V.

Una vez que las proteínas fueron separadas electroforéticamente, se las transfirió a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) para analizarlas por inmunoblot. Para hacer posible la transferencia proteica, se colocó al gel junto a la membrana de PVDF en el interior de la cámara de electrotransferencia (Bio Rad Miniprotean III), la cual contenía un litro de buffer de transferencia (Anexo2b). La transferencia se realizó a 350 miliamperios por dos horas. Para observar si el paso de las bandas proteicas a la membrana ocurrió, se empleó tinción con rojo Ponceau.

Posteriormente, la membrana se colocó por una hora en solución de bloqueo, la cual consiste en tampón tris salino 1X (TBS) (Anexo 2b) con leche en polvo libre de grasas (Kroger, Cincinnati, OH, USA) al 5%. Culminado el bloqueo, la membrana se incubó durante 24h con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo en una concentración de 1:1000; en este caso el anticuerpo primario fue el suero del paciente.

Posteriormente, se lavó la membrana con buffer de lavado (TBS 1X con Tween al 0,05%), por cuatro ocasiones durante cinco minutos cada una y se la incubó por una hora con el anticuerpo secundario, Goat Anti-Human IgG (Biosource International, Camarillo,

CA, USA), el cual se encontraba diluido en el buffer de bloqueo en una concentración 1:1000.

La membrana fue nuevamente lavada cuatro veces y se reveló con sustrato 3-amino-9 etil carbazol (AEC) (Anexo 2b) en tampón acetato de sodio 0,1M, pH5 y 10 µl de peróxido de hidrógeno al 0,3%.

4.2 OBTENCIÓN DE EPIMASTIGOTES

4.2.1 AISLADOS ECUATORIANOS PROVENIENTE DE VECTORES

Para la realización de este estudio se utilizaron dos aislados, los cuales fueron denominados TLG 2362, TRC 2376. Dichos aislados se obtuvieron a partir de contenido intestinal de triatominos de la especie *Rhodnius ecuadoriensis*. Estos fueron colectados en la provincia de Manabí, en las comunidades de Ligüiqui y Río Canoa respectivamente (Figura 3); durante la salida de campo realizada por el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

El proceso de extracción del contenido intestinal de los triatominos se realizó en una cámara de bioseguridad. Los insectos fueron sacrificados y desinfectados sumergiéndolos por dos minutos en la solución de White (Anexo 3). Empleando tijeras esterilizadas, se cortó la parte distal del cuerpo del insecto, y se presionó el abdomen del mismo con pinzas estériles para extraer el contenido intestinal. Este último se recogió con una micropipeta y se mezcló con 200 µl de PBS 1X (Anexo 4) y se inoculó en medios de cultivo bifásico para el aislamiento de *T. cruzi*. Este medio de cultivo consiste en 1 ml de

agar sangre (Anexo 5a) y 1 ml de sobrenadante líquido (Anexo 5b), colocados en tubos de vidrio sin aditivo (Vacutainer ®, Franklin Lakes, NJ, USA). Los frascos fueron almacenados en una incubadora a 25 °C y revisados semanalmente para observar si existe crecimiento de parásitos.

4.2.2 OTROS AISLADOS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO

Se utilizó una cepa humana proveniente de un paciente chagásico crónico de origen salvadoreño (aislado “El Salvador”), el cual presentaba la forma cardíaca de la enfermedad. Este aislado fue obtenido en Boston, Massachusetts, Estados Unidos, por el Dr. Jaime Costales.

Este aislado fue enviado al Ecuador en 1 ml de cultivo infusión de hígado triptosa (LIT). Para su internalización se siguió todas las normas internacionales de bioseguridad y se obtuvo los permisos solicitados por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador.

4.2.3 MANTENIMIENTO DE CULTIVOS DE EPIMASTIGOTES

Para el mantenimiento de las cepas se utilizó el medio LIT suplementado con 1% de gentamicina (GIBCO® Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% de penicilina/estreptomicina (SIGMA, St. Louis, MO, USA) y 10% de suero bovino fetal (FBS) (Hyclone, Whaltam, MA, USA) inactivado a 56 °C por 30' (Anexo 6).

Aproximadamente 50 µl de los aislados de epimastigotes (TLG 2362, TRC 2376, cepa humana) fueron inoculados en 30 ml de LIT en frascos de cultivo estériles de 10 ml

(Corning). Los cultivos fueron revisados en un microscopio invertido semanalmente, para verificar el crecimiento de parásitos; los cultivos fueron revisados y subcultivados mensualmente.

4.3 CULTIVO CELULAR *IN VITRO*

Se emplearon células de fibroblasto humano (HFF) y células de riñón de mono (LL-MCK2). Estas se encontraban criopreservadas en nitrógeno líquido, por lo cual fueron descongeladas y colocadas en frascos de cultivo celular de 75 ml (Axygen), que contenían 10 ml de Medio Eagle modificado por Dubbelco (DMEM) (Hyclone, Whaltam, MA, USA); suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina (SIGMA, St. Louis, MO, USA), 10% de FBS inactivado (Hyclone, Whaltam, MA, USA) y piruvato al 2,2% (Anexo 7). La preparación del medio para células infectadas con tripomastigotes es similar, la única diferencia es la concentración de FBS la cual es 2%. A los cultivos celulares se los colocó en una incubadora (Mettler, Scwabach, Bavaria, Alemania) a 37 °C con 5% de CO₂.

El medio de cultivo fue cambiado cada dos días; y se realizaron subcultivos cada semana. Para ello, las células fueron lavadas por tres ocasiones con PBS 1X estéril, y fueron desprendidas del frasco mediante tratamiento con 1 ml de tripsina-EDTA por cinco minutos a 37 °C. Seis gotas de las células suspendidas en tripsina (aproximadamente 7×10^5 células) fueron sembradas en un nuevo frasco de cultivo con 10 ml de DMEM-10.

4.4 OBTENCIÓN TRIPOMASTIGOTES

4.4.1 INFECCIÓN DE RATONES BALB/C

Ratones BALB/c hembras de seis semanas de edad fueron inoculadas con 1×10^8 parásitos, provenientes de cultivos de epimastigotes en la fase estacionaria. Dichos cultivos contienen una pequeña proporción de tripomastigotes metacíclicos, los cuales pueden iniciar la infección. Se emplearon cultivos de epimastigotes de tres aislados de *T. cruzi* (Humana, TLG 2362, TRC 2376).

Previo a la inoculación se cuantificó los parásitos presentes en los cultivos con un hemocitómetro. Posterior a esto fueron lavados y resuspendidos en 200 μ l de PBS; dicho volumen fue inoculado en cada ratón vía intraperitoneal empleando jeringas de 1 ml con agujas de 26x1/2 pulgadas de diámetro (Anexo 8). Los ratones infectados fueron manejados bajo estrictas normas de bioseguridad.

La presencia de tripomastigotes en los ratones infectados fue determinada mediante examen microscópico de muestras de sangre obtenidas por punción caudal. La primera revisión se realizó cinco días después de la infección y el examen se repitió cada dos días hasta encontrarse tripomastigotes.

4.5 INFECCIÓN DE CULTIVOS CELULARES

4.5.1 INFECCIÓN DE CÉLULAS DE RIÑÓN DE MONO (LL)

Se sacrificó a los ratones que presentaban tripomastigotes en su torrente sanguíneo por asfixia con CO₂ y se extrajo aproximadamente 1 ml de sangre por punción cardiaca. Esta sangre fue asépticamente colocada en un frasco de cultivo celular conteniendo células LL, para permitir que los tripomastigotes las infectaran. La sangre estuvo en contacto con el cultivo celular por 24 h, culminado este periodo se lavó las células con PBS 1X estéril para eliminar la sangre y los coágulos que esta había formado, y se aumentó 10 ml de DMEM-2. Los parásitos se multiplicaron en las células infectadas, produciendo primero amastigotes intracelulares y luego tripomastigotes, los cuales fueron empleados para infectar células HFF.

4.5.2 INFECCIÓN DE CÉLULAS DE FIBROBLASTO HUMANO (HFF)

Las infecciones de células HFF fueron realizadas en placas de seis pocillos. Se colocó un cubreobjeto circular estéril de 12 mm de diámetro (Fisherbrand) en dos de los pocillos de la placa. Estos cubreobjetos están hechos con vidrio tratado para cultivo de tejidos, el cual permite que las células crezcan sobre ellos. De esta manera, al terminarse el experimento, las células que están sobre estos cubreobjetos pueden ser fijadas y teñidas con 4',6-diamidino-2-fenillindol (DAPI) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para determinar el porcentaje de infección mediante microscopía de fluorescencia.

Un total de $1,2 \times 10^5$ células fueron colocadas en cada pocillo de la placa (Anexo 9). Se permitió que las células se adhirieran por 24 h y se las infectó con los distintos aislados del parásito. Se agregaron $1,2 \times 10^7$ tripomastigotes derivados de cultivo celular de células LL resuspendidos en medio DMEM-2 en cada uno de tres pocillos de la placa (incluyendo uno de los que contenía cubreobjetos), correspondiendo a una multiplicidad de infección de 100 (100 parásitos por cada célula). Se permitió que los parásitos infectaran las células por dos horas a 37 °C en la incubadora de CO₂. Posteriormente, los parásitos fueron removidos mediante tres lavados con PBS estéril y se añadieron 2 ml de medio de DMEM-2 a cada pocillo (Anexo 10). Los tres pocillos restantes, los cuales solo contenían células, fueron empleados como controles. Estas fueron lavadas con PBS 1X, y se les cambió a medio DMEM-2; con la diferencia de que no tuvieron contacto con parásitos. A 24, 48 y 72 horas después de la infección, tanto un pocillo de células infectadas, como uno de control fueron lavados y se extrajeron las proteínas para analizar la expresión génica. Para la extracción de proteínas se colocaron 100 µl de buffer de muestra, el cual fue precalentado a 100 °C por cinco minutos, y se prosiguió a remover las células mecánicamente raspando la superficie del pocillo con raspadores plásticos estériles. Se colocó el contenido en un tubo de microcentrifuga y se calentó por diez minutos a 100 °C.

4.6 TINCIÓN CON 4,6-DIAMINO-2-FENILINDOL

El 4,6-diamino-2-fenilindol abreviado como DAPI, es un agente intercalante que se une específicamente al ADN. Al ser expuesto a la luz UV emite fluorescencia a una longitud de onda de 461 nm, la cual corresponde al color azul, permitiendo visualizar, mediante microscopía de fluorescencia, las estructuras celulares que contienen ADN, tal como los núcleos celulares y los cinetoplastos de *T. cruzi*.

Como se mencionó anteriormente, la tinción con DAPI se utilizó para medir la infectividad *in vitro* de cada cepa/aislado estudiado. Los cubreobjetos conteniendo células que se obtuvieron de las placas de seis pocillos fueron lavados con PBS 1X por tres ocasiones y fueron fijados con paraformaldehído al 4% (Anexo 11), por 15 minutos a temperatura ambiente. Si la tinción no fue realizada inmediatamente, los cubreobjetos fueron almacenados en la solución fijadora a 4 °C. Después de la fijación, los cubreobjetos fueron lavados con PBS 1X, y montados en portaobjetos con cincocomicrolitros de medio de montaje conteniendo DAPI y se dejó secar por un día. Bajo el microscopio de fluorescencia se realizó el conteo de 100 células por cubreobjeto, de un total de seis repeticiones.

4.7 EXTRACCIÓN DE ADN

4.7.1 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE

La extracción de ADN de pacientes se realizó directamente de la muestra de sangre empleando el kit DNAzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo el protocolo de extracción recomendado por el fabricante. Se realizó ciertas modificaciones en el protocolo, que consistieron en la inclusión de ciclos de centrifugación en el proceso de lavado de la muestra.

A 100 µl de sangre se agregó 1 ml de DNAzol; se pipeteo suavemente para homogenizar la muestra y de este modo facilitar la lisis. Se agregaron 500 µl de etanol al 100% por cada mililitro de DNAzol; y se mezcló invirtiendo el tubo. Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante tres minutos e inmediatamente se centrifugó a 4000

x g por dos minutos. Se lavó el precipitado con 800 µl de etanol al 75%; y se lo centrifugó a 4000 x g por dos minutos. Nuevamente se adicionaron 800 µl de etanol al 75% y se centrifugó a velocidad máxima durante un minuto. Finalmente, se removió el etanol y se disolvió el precipitado con 200 µl de NaOH 8 mM. La muestra se almacenó a -20 °C.

4.7.2 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CULTIVO DE EPIMASTIGOTES

La extracción de ADN de las cepas provenientes del contenido intestinal de vectores y de la cepa del paciente salvadoreño, se realizó a partir del cultivo de epimastigotes con la técnica de fenol-cloroformo. Para la extracción con fenol-cloroformo se utilizaron cultivos que tuvieran 1×10^7 a 1×10^8 parásitos. Se colocó el cultivo de epimastigotes en un tubo cónico de 50 ml y se los centrifugó a 1300 x g por 10 minutos. Se re-suspendió el pellet en un mililitro de PBS estéril y se colocó en tubos de microcentrífuga. Los parásitos fueron precipitados mediante centrifugación a 500 x g por 10 minutos. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con el tampón Tris-EDTA-Litio (TELT) (Anexo 12a), se mezcló invirtiendo el tubo por cuatro ocasiones y se dejó reposar por cinco minutos a temperatura ambiente. Se agregó fenol-cloroformo (1:1), se mezcló y se centrifugó nuevamente a 500 x g por cinco minutos. Esto permitió la formación de dos fases; con ayuda de una micropipeta se removió la fase acuosa, la cual se colocó en un nuevo tubo. El ADN fue precipitado por adición de etanol absoluto, y el pellet fue lavado por dos ocasiones, antes de ser disuelto en buffer tris EDTA (TE) (Anexo 12b). Finalmente, el ARN fue eliminado mediante tratamiento por 30 minutos a 37 °C con RNAsa A. Las muestra fueron almacenadas a -20 °C (Medina-Acosta, 1993).

4.8 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL PARÁSITO *Trypanosoma cruzi*

4.8.1 AMPLIFICACIÓN DEL ADN SATÉLITE DE PARÁSITOS SANGUÍNEOS, PROVENIENTES DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÓNICOS

Se amplificó el templado de ADN para conocer a que linaje pertenecen los parásitos provenientes de pacientes chagásicos, de los hospitales de Portoviejo. Debido al bajo número de parásitos circulantes en la sangre, fue necesario una amplificación genómica con el kit Repli-g de Qiagen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Anexo 13). Este kit, permite la amplificación uniforme de todo el DNA que se encuentra en la muestra.

Se prosiguió a elaborar una PCR con iniciadores específicos, utilizando como templado el producto de la amplificación con el kit Repli-g. Los iniciadores utilizados fueron Diaz 7 (5' CGCAAACAGATATTGACAGAG 3'), Diaz 8 (5' TGTTACACACTGGACACCAA 3') y TcSat4 (5' GCAGCCGCCGCTCGAAA ACTATCC 3') (Liarte *et al.*, 2009). La reacción tuvo un volumen final de 10 µl, la cual consistió de: 5 µl de GoTaq Green Mastermix Promega (5 U de *Taq* polimerasa, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂), 0,8 µl de cada primer (5 pmol), 0,6 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de agua ultra pura y 1 µl de la muestra de ADN (Liarte *et al.*, 2009).

La amplificación se realizó en el termociclador (MJ Research) empleando el siguiente perfil térmico: denaturación inicial 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos a 95 °C por

20 segundos (denaturación), 60 °C por 10 segundos (anillamiento), 72 °C por 15 segundos (extensión); finalmente 72 °C por 5 minutos lo cual permite la elongación final.

4.8.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS ANALIZADOS (TLG 2362, TRC 2376 y “El Salvador”)

4.8.2.1 AMPLIFICACIÓN DEL DOMINIO D7 DEL GEN RIBOSOMAL 24S α CON INICIADORES D71/D72

Para la amplificación del dominio D7 se utilizó los iniciadores sentido D71 (5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3') y antisentido D72 (5' TTTTCAGAATGGCCGAACAGT 3') (Brisse *et al.*, 2001). La reacción tuvo un volumen final de 15 μ l, la cual consistió de: 7,5 μ l de GoTaq Green Mastermix Promega (5 U de *Taq* polimerasa, 200 μ M de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂), 1 μ l de cada primer (50 pmol), 1 μ l de MgCl₂ (25 mM), 4,5 μ l de agua ultra pura y 1 μ l de la muestra de ADN (Lewis *et al.*, 2009).

La amplificación se realizó en el termociclador (MJ Research) empleando el siguiente perfil térmico: denaturación inicial 94 °C por tres minutos, 27 ciclos a 94°C por un minuto (denaturación), 60 °C por 1 minuto (anillamiento), 72 °C por 1 minuto (extensión); finalmente 72 °C por 5 minutos (elongación final) (Lewis *et al.*, 2009).

4.8.2.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES NUCLEARES GLUCOSA FOSFATO ISOMERASA (GPI)

Se realizó la amplificación utilizando los iniciadores sentido (5' GGC-ATG-TGA-AGC-TTT-GAG-GCC-TTT-TTC-AG 3') y antisentido (5' TGT-AAG-GGC-CCA-GTG-AGA-GCG-TTC-GTT-GAA-TAG-C 3'); la reacción tuvo un volumen final de 19 µl, la cual consistió de 10 µl de GoTaq Green Mastermix Promega (5 U de *Taq* polimerasa, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂), 1 µl de cada iniciador (50 pmol), 2 µl de Mg Cl₂ (25 mM), 5 µl de agua ultra pura y 1 µl de ADN (Lewis *et al.*, 2009).

La amplificación se realizó en el termociclador (MJ Research) empleando el siguiente perfil térmico: denaturación inicial 94°C por 3 minutos, 4 ciclos a 94 °C por 30 segundos (denaturación), 64 °C por 30 segundos (anillamiento) y 72 °C por 1 minuto (extensión); 27 ciclos a 94 °C por 1 minuto (denaturación), 60 °C por 1 minuto (anillamiento), 72 °C por 1 minuto (extensión) y 72 °C por 5 minutos (elongación final) (Lewis *et al.*, 2009).

4.8.2.3 DIGESTIÓN DEL AMPLIFICADO CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN *HhaI*

Para la digestión del amplificado de GPI se utilizó la enzima de restricción *HhaI* (Promega), la cual reconoce la secuencia 5' GCGC 3'. Para elaborar la digestión se preparó una reacción con un volumen final de 20 µl; la cual contenía: 10 µl del amplificado, 0,5 µl de la enzima de restricción, 0,2 µl de BSA, 2 µl de buffer 10X y 7,3 µl de agua ultra pura. Se colocó la reacción en el termociclador por 2 horas durante 37 °C.

4.8.2.4 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE LA PROTEÍNA DE SHOCK TÉRMICO 60 (HSP60)

Se amplificó un segmento del gen de la proteína HSP60 utilizando los iniciadores sentido (5' GTG-GTA-TGG-GTG-ACA-TGT-AC 3') y antisentido (5' CGA-GCA-GCA-GAG-CGA-AAC-AT 3'). Para elaborar la PCR se hizo una reacción con volumen final de 20 µl, la cual consistió en: 10 µl de GoTaq Green Mastermix Promega (5 U de *Taq* polimerasa, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂), 1 µl de cada iniciador (50 pmol), 0,4 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de agua ultra pura y 1,5 de ADN (Lewis *et al.*, 2009).

La amplificación se realizó en el termociclador (MJ Research) empleando el siguiente perfil térmico: denaturación inicial 94°C por 3 minutos, 4 ciclos a 94 °C por 30 segundos (denaturación), 64 °C por 30 segundos (anillamiento) y 72 °C por 1 minuto (extensión); 27 ciclos a 94 °C por 1 minuto (denaturación), 60 °C por 1 minuto (anillamiento), 72 °C por 1 minuto (extensión) y 72 °C por 5 minutos (elongación final) (Lewis *et al.*, 2009).

4.8.2.5 DIGESTIÓN DEL AMPLIFICADO DE HSP60 CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN *EcoRV*

Para la digestión del amplificado de HSP60 se utilizó el kit de Promega, el cual contiene la enzima de restricción *EcoRV*; esta reconoce la secuencia 5' GATAT 3'. Para elaborar la digestión se preparó una reacción de volumen final 20 µl; la cual contenía: 10 µl del amplificado, 0,5 µl de la enzima de restricción, 0,2 µl de BSA, 2 µl de buffer 10X y

7,3 µl de agua ultra pura. Se colocó la reacción en el termociclador por 2 horas durante 37 °C.

4.8.3 GELES DE AGAROSA

Una vez realizadas las amplificaciones específicas se elaboró geles de agarosa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) al 2% para el amplificado con los iniciadores D71/D72 y Diaz7/Diaz8/TcSat4; al 1,5% para el amplificado con los iniciadores HSP60, GPI y sus respectivas digestiones. En cada pocillo se cargó 15 µl del producto de la PCR; para poder conocer el peso molecular se cargó junto a las muestras un marcador de peso de 50 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en el caso del amplificado del dominio D7 y se utilizó un marcado de peso de 1 kb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para el resto de amplificados. El gel se tiñó con el tinte SYBR® Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), al cual se lo expuso a un transiluminador, permitiéndonos visualizar las bandas.

4.9 TINCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES MEDIANTE EL TINTE GIEMSA

En una placa de seis pocillos, se sembraron 1×10^5 células Ll por pocillo. Se colocaron tres cubreobjetos circulares estériles de 12 mm de diámetro (Fisherbrand) en cada uno de los pocillos. Se fijaron las células durante 24 horas y se las infectó colocando 1×10^7 parásitos por pocillo durante cuatro horas. Posteriormente, los pocillos se lavaron por dos ocasiones con PBS 1X (Anexo 4). Se dejaron secar los cubreobjetos y se prosiguió a fijar las células infectadas con metanol durante tres segundos. Se dejaron secar los cubreobjetos y se agregaron 2ml de la solución de trabajo Giemsa (Anexo 14a) en cada pocillo. Se desechó la solución después de 10 minutos y se eliminó el exceso del tinte con

el buffer de trabajo Giemsa (Anexo 14b). Se secó los cubreobjetos y se los colocó en portaobjetos; los cuales contenían cinco microlitros de buffer de montaje. Las placas fueron observadas en el microscopio y fotografiadas, de este modo haciendo posible la medición de los parásitos (micrómetros) con el software Cell F (Olympus®). Se midieron 30 parásitos por cada aislado, con los valores obtenidos se obtuvo la media del tamaño de los tripomastigotes.

4.10 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE “WESTERN BLOT”

La regulación de la expresión génica se analizó a partir de la técnica de “Western Blot” mediante la cuantificación de las bandas proteicas. En este experimento se utilizó como control la proteína actina. El protocolo es igual que el descrito en el numeral 4.1.1; en lo que se diferencian es en el antígeno y anticuerpos utilizados.

El antígeno se elaboró a partir de las células infectadas con las distintas cepas, durante 24, 48 y 72 horas. Para la preparación del mismo, se agregaron 100 µl de buffer de muestra a 100 °C (Anexo 2a), tanto en un pocillo conteniendo células infectadas como en un pocillo control; se removieron las células con raspadores de plástico estériles y se colocó el contenido en un tubo. Inmediatamente, las muestras fueron hervidas a 100 °C por 10 minutos. Estas muestras se almacenaron a -20 °C y se utilizaron para realizar la electroforesis proteica.

Los anticuerpos primarios empleados reconocen las proteínas actina y PNP; los cuales fueron diluidos en tampón de bloqueo. Se probaron distintas concentraciones de los

mismos (Tabla 1). Como anticuerpo secundario se utilizó el Anti-Rabbit IgG marcado con peroxidasa (Promega, Madison, WI, USA); se lo diluyó en una concentración de 1:500 en la solución de bloqueo.

Se cuantificó las bandas mediante el programa ImageJ 1.44 (desarrollado por: Ferreira y Rasband, 2011); el cual permite comparar la densidad entre distintas bandas proteicas; mediante la cuantificación de pixeles presentes.

4.10.1. LAVADO PARA REUTILIZACIÓN DE MEMBRANAS

Con el objeto de probar las membranas de PVDF con un segundo anticuerpo, estas fueron lavadas por dos minutos en agua destilada, dos minutos en alcohol al 70% y en alcohol al 95% hasta que desaparezcan las bandas de sustrato AEC. Posteriormente, se sumergió la membrana en una solución para eliminar los anticuerpos. Esta solución consiste en un gramo de SDS, 350 μ l de β -mercaptoetanol y 50 ml de TBS-Tween 0,05%; y se incubó con la membrana durante 30 minutos a 60 °C. Posterior a esto, se sumergió nuevamente la membrana en alcohol al 95%, etanol al 70 % y por último en agua destilada. Al finalizar los lavados la membrana fue sumergida en el buffer de bloqueo para poder ser incubada nuevamente con el anticuerpo primario.

5. RESULTADOS

5.1 ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO EN PACIENTES CARDIACOS EN MANABÍ

El estudio seroepidemiológico piloto realizado en la provincia de Manabí, incluyó 95 participantes reclutados en dos hospitales distintos: el Hospital del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social (IESS) y el Hospital Regional Verdi Cevallos Balda del Ministerio de Salud Pública del Ecuador, ambos ubicados en la ciudad de Portoviejo. Todos los participantes pasaron por el proceso de consentimiento informado de acuerdo a las normas internacionales y siguiendo un protocolo aprobado por el comité de ética de la Universidad de Ohio. En el Hospital Verdi Cevallos Balda se realizó la prueba rápida STAT-PAK[®] a 20 individuos, mientras que en el hospital del IESS se realizó a 75 individuos. Un resumen de los datos epidemiológicos de este grupo de pacientes se encuentra en la Tabla 2. Es importante mencionar que la gran mayoría de estos individuos (86%) reconocieron los vectores de la enfermedad de Chagas, al mostrarles fotografías de los mismos. Dos participantes (2,1%) presentaron reactividad en la prueba STAT-PAK[®] (Figura 4). En ambos casos fueron pacientes de sexo femenino, de 48 y 61 años de edad, nacidas en Manabí (Tabla 3). Ambas residen en el cantón Portoviejo en la localidad de San Ignacio de Colón y en la ciudad de Portoviejo (Figura 3), respectivamente; siendo estos los únicos lugares en donde han vivido. Ambas pacientes se encontraban en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, una de ellas en la forma cardiaca de la enfermedad, mientras que la otra en la forma indeterminada.

Para confirmar estos resultados, se obtuvieron muestras de suero sanguíneo de los pacientes seropositivos. Se realizaron tres pruebas tipo ELISA en paralelo, con kits de proveedores comerciales (Tabla 4). Estas pruebas, que fueron realizadas en el CIEI, confirmaron los resultados obtenidos por las pruebas rápidas empleadas en los hospitales. Adicionalmente se corroboró los resultados mediante el análisis del suero por “Western Blot” (Figura 5). Finalmente, una alícuota de suero de cada paciente seropositivo fue enviada al Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez”, en donde se realizó una confirmación adicional de los resultados, mediante otra prueba de ELISA (Anexo 15).

5.2 OBTENCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES A PARTIR DE CULTIVOS DE EPIMASTIGOTES

Debido a que no fue posible aislar parásitos en hemocultivo de pacientes chagásicos crónicos; se prosiguió al aislamiento de tripomastigotes a partir de cultivos de epimastigotes provenientes de vectores y del aislado no ecuatoriano (“El Salvador). Del aislado “EL Salvador” se obtuvo tripomastigotes sanguíneos al primer intento; con respecto a los aislados provenientes de vectores únicamente se obtuvo tripomastigotes sanguíneos de dos (TLG 2362 y TRC 2376) de diez aislados. Con respecto a TLG 2362 y TRC2376 se realizó tres inoculaciones a ratones antes de obtener tripomastigotes sanguíneos.

5.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PARÁSITOS SANGUÍNEOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS DE LA PROVINCIA DE MANABÍ

Una muestra de 3 ml de sangre venosa 1:1 en guanidina fue obtenida de cada una de las pacientes seropositivas. Con el ADN total extraído de estas muestras se amplificaron secuencias correspondientes al ADN satélite empleando los primers Diaz 7, Diaz 8 y TcSat 4. Al correr los productos amplificados en geles de agarosa, se obtuvieron tres bandas: de 111pb, 195 pb y 300 pb (Figura 6). La banda de 195 pb diferencia al linaje TcII de TcI.

5.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE *Trypanosoma cruzi* (TLG 2362, TRC 2376, “El Salvador”)

Inicialmente, se había planeado realizar los estudios posteriores (mediciones de tripomastigotes, determinaciones de infectividad celular, y análisis de modulación génica de fosforilasa de nucleótidos) empleando cultivos provenientes de pacientes seropositivos de las unidades de cardiología de los dos hospitales de Portoviejo. Dado que no fue posible obtener cultivos de estos parásitos, debido a que no se reprodujeron en hemocultivo, se emplearon tres aislados distintos; los cuales estaban disponibles en el CIEI: TLG 2362 (asilado de la localidad de Liguíqui en la provincia de Manabí), TRC 2376 (asilado de Río Canoa en la provincia de Manabí) y una cepa de un paciente cardíaco salvadoreño aislada por el Dr. Costales en Boston.

Los parásitos pertenecientes a estos tres aislados fueron caracterizados mediante análisis del dominio D7 del gen ribosomal 24 S α RNA, el gen GPI y el gen HSP60. La

amplificación del dominio D7 del gen ribosomal 24 Sα con los primers D71/D72, produjo una banda de 110 pb (Figura 7); correspondiente al linaje TcI.

Los resultados obtenidos tanto con GPI como HSP60 concordaron con esta interpretación inicial: los productos de amplificación del gen GPI, digeridos con la enzima *HhaI*, generaron dos bandas en los geles de agarosa de 817 pb y 447 pb (Figura 8). Mientras tanto, los productos de amplificación del gen HSP60, digeridos con *EcoRV*, produjeron tan solo una banda de 432 pb (Figura 9).

El patrón de bandeo, observado con los amplificados de los distintos genes, demuestran que las tres cepas estudiadas pertenecen al mismo linaje de *T. cruzi* (TcI).

5.5 MEDICIÓN DE TRIPOMASTIGOTES

A pesar de que todos los aislados empleados (TLG 2362, TRC 2376 y “El Salvador”) correspondieron al linaje TcI, diferencias morfológicas entre los tripomastigotes de cada aislado fueron evidentes. La medición de los tripomastigotes teñidos con GIEMSA (30 por cada aislado), nos permitió confirmar estas diferencias. Se pudo observar que los parásitos del aislado “El Salvador” son los de mayor tamaño con aproximadamente 11,36 micrómetros en promedio (Figura 10,13); seguido de TLG 2362 con 10,52 micrómetros (Figura 11, 13) y por último los parásitos pertenecientes al aislado TRC 2376 con una longitud de 7,14 micrómetros (Figura 12, 13). Se realizó una ANOVA de un factor (Tabla 5, 6) y la prueba de Tukey (Tabla 7); lo cual demostró que existen diferencias altamente significativas con respecto a la longitud de los tres aislados.

5.6 INFECTIVIDAD DE AISLADOS ANALIZADOS

Otro parámetro biológico de las tres distintas cepas que fue evaluado es la infectividad de tripomastigotes sobre células en cultivo *in vitro*. A pesar de que todos los aislados empleados fueron TcI, este parámetro también mostró gran diversidad.

La infectividad fue de 61,33 % para el aislado “El Salvador”; seguida de TLG 2362 con 49,5% y por último TRC 2376 con 24,33% (Figura 14, 15). Se realizó una ANOVA de un factor (Tabla 8, 9) y la prueba de Tukey para verificar si existe diferencias significativa entre ellos. Demostrando que no existe diferencias entre el aislado “El Salvador” y el aislado TLG 2362 (Tabla10); mientras que existe diferencias altamente significativas entre el aislado TRC 2376 y los dos anteriormente mencionados.

5.7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA FOSFORILASA DE NUCLEOTIDOS PURINADOS (PNP) EN FIBROBLASTOS HUMANOS INFECTADOS CON *Trypanosoma cruzi*.

Se conoce que la cepa Y de *T. cruzi* (TcII) activa la expresión del gen de la fosforilasa de nucleótidos purinados (PNP) en las células que infecta. Dadas las diferencias entre linajes de *T. cruzi*, se investigó si este fenómeno ocurre también con el linaje TcI, empleando los aislados TLG 2362, TRC 2376 y “El Salvador”. Para determinar si dichos aislados son capaces de inducir la expresión de PNP, se infectaron fibroblastos humanos y se midió la densidad proteica mediante “Western blot”; empleando el gen de la actina como control.

Las bandas reveladas con los anticuerpos contra actina y PNP poseen un peso molecular de 43 kDa (Figura 16) y 34 kDa respectivamente (Figura 16). Estos pesos moleculares corresponden a los valores teóricos para ambas proteínas. A partir de la inspección visual de las membranas, es evidente que la expresión de la PNP aumenta durante las 72 h de infección intracelular con *T. cruzi*. Al analizar las bandas con el programa Image J, nos permitió determinar que en las tres cepas analizadas, existe un aumento de la expresión génica al comparar las 24 h de infección con las 72 h de infección. En el caso del aislado “El Salvador” existió un incremento de la expresión en 2,27 veces, con el aislado TLG 2362 el incremento fue de 2,7 veces y con el aislado TRC 2376 existió un incremento de 3,68 veces (Figura 17).

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La enfermedad de Chagas es una de las enfermedades parasíticas con mayor importancia en Latinoamérica; generando un gran impacto socioeconómico (Dias, 1999) y constituyendo una de las principales causas de enfermedad cardíaca en esta región (Yacoub *et al.*, 2007).

En el Ecuador, existe desde el 2005 un programa de control del vector de la ECh. Sin embargo, todavía hay una alta incidencia de la enfermedad en provincias tales como El Oro, Guayas, Manabí, Los Ríos y Loja (Abad y Aguilar, 2002).

Trypanosoma cruzi, el agente causal de la enfermedad de Chagas, es una especie con alta variabilidad genética. Se reconocen seis linajes, denominados TcI-TcVI (Zingales *et al.*, 2009), los cuales tienen una distribución heterogénea en Latinoamérica (Miles *et al.*, 2009). En el Ecuador, el linaje predominante parece ser TcI, ya que es el único que ha sido reportado en estudios previos que han muestreado ampliamente vectores y reservorios en las provincias de Manabí y Loja (Ocaña, 2010; Ocaña *et al.*, 2010).

El linaje TcI es también genéticamente heterogéneo, estudios moleculares han demostrado que aislados de distintos países de Latinoamérica presentan diferencias entre ellos (Guhl y Ramírez, 2011). Asimismo, estudios realizados por el CIEI manifiestan que los aislados TcI en el ciclo domiciliarios/peridomiciliarios y selváticos de Loja en el Ecuador son distintos entre sí y de otros TcI de Sudamérica (Ocaña *et al.*, 2010). Estudios realizados en Colombia reportan que existen al menos cuatro sublinajes dentro de TcI, denominados TcIa-d, los cuales están asociados con distintos ciclos de transmisión de *T.*

cruzi (Ramírez *et al.*, 2011). Se ha reportado además un quinto sublinaje, TcIe que está presente en Bolivia (Cura *et al.*, 2010). Estos estudios han llevado a proponer que en próximas revisiones de la nomenclatura de esta especie, se discuta la posibilidad de crear nuevos linajes basados en las subdivisiones de TcI (Guhl y Ramírez, 2011).

En los últimos años se ha determinado que TcI está correlacionado con la aparición de daños cardíacos en los pacientes crónicos (Burgos *et al.*, 2010). Tan solamente un 30-40% de las personas infectadas, desarrollan este tipo de daño (WHO, 2002). En la última década, los estudios realizados por el grupo liderado por el Dr. Mario Grijalva, director del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas, han demostrado que la enfermedad de Chagas es un grave problema de salud pública en Ecuador (Grijalva *et al.*, 2003), todavía no existen estudios a profundidad sobre la prevalencia de casos cardíacos en el Ecuador ni sobre los linajes que los causan. Esta investigación pretende contribuir en la identificación de casos de cardiopatía chagásica en nuestro país y caracterizar los parásitos que la causan.

Por otro lado, las propiedades biológicas de parásitos TcI (TLG 2362, TRC 2376 y “El Salvador), tales como la longitud de los tripomastigotes, su infectividad *in vitro* y la inducción de expresión de genes de las células huésped fueron evaluadas. Se encontró que si bien los tripomastigotes provenientes de distintos aislados presentan diversidad en cuanto a su infectividad y su longitud, todos fueron capaces de activar el gen de la PNP en las células hospederas *in vitro*.

6.1 ESTUDIO SEROEPIDEMIOLÓGICO EN PACIENTES CARDIACOS EN MANABÍ

Como se mencionó anteriormente, sólo un 30-40% de los pacientes chagásicos crónicos desarrollan cardiopatía (WHO, 2002); la misma que se presenta generalmente en pacientes entre los 30 a 50 años de edad (Abad y Aguilar, 2002). Estos individuos se ven afectados de sobremanera ya que la enfermedad les impide realizar sus actividades diarias con normalidad y pierden su capacidad productiva (WHO, 2002). Los procesos de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes con ECh resultan en un alto costo para el país (Abad y Aguilar, 2002); por lo cual el plan de control debe ir a la mano con una campaña de prevención, para concientizar a la gente y generar una disminución drástica de la incidencia de la enfermedad.

El estudio piloto de detección de la ECh en los Hospitales Verdi Cevallos Balda y el Hospital del IESS de la provincia de Manabí; reclutó un total de 95 participantes, perteneciendo el 38% al sexo masculino y el 62% al sexo femenino. De este grupo se pudo determinar que algunos individuos han vivido en otras provincias, a más de la provincia de Manabí; entre estas se encuentran Bolívar, Esmeraldas, Guayas, Imbabura y Los Ríos. Guayas y Los Ríos son de las provincias con mayor incidencia de la enfermedad; mientras que las tres provincias restantes no se han encontrado indicios de la ECh (Aguilar *et al.*, 2006).

La reactividad de ambos pacientes fue comprobada primeramente con la prueba rápida STAT-PAK; estudios previos han reportado que es altamente confiable poseyendo una sensibilidad del 98,5% (Luquetti *et al.*, 2003). Posteriormente se realizó el ensayo de

inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA); el cual posee una sensibilidad entre el 95% al 99% (Luquetti *et al.*, 2003). A más de estas pruebas se realizó la técnica de “Western Blot”, la cual tiene el mismo principio que las dos anteriores; demostrar la presencia de anticuerpos contra la ECh. Es aconsejable realizar más de una prueba comprobatoria, de este modo se corrobora que no existió una reacción cruzada y que el paciente es seropositivo para *T. cruzi*.

Existe una alta probabilidad de que los individuos de este estudio hayan contraído la enfermedad en su provincia de origen, debido a que estos no han residido en otras regiones que no sea la provincia de Manabí. El 80% de los casos de pacientes chagásicos, se debe al contacto con heces contaminadas del insecto vector (Abad y Aguilar, 2000); por lo cual es muy posible que los pacientes se hayan infectado mediante esta vía.

Ambos pacientes reactivos, fueron reclutados en el Hospital del IESS de Portoviejo. En donde se evaluó a 75 participantes en una semana; lo cual nos indica que al mes se podrían estar evaluando un mayor número de pacientes chagásicos, en esta unidad de cardiología. Sin embargo debido a la falta de capacidad instalada de diagnóstico serológico de la ECh, estos casos no estarían siendo detectados.

Es importante mencionar que en ninguno de los dos casos, ni el paciente ni el cardiólogo tratante conocían que la posible causa de los daños cardiacos era la infección por *T. cruzi*, a pesar de que han estado bajo tratamiento por varios años. Esto ejemplifica la situación de la ECh en nuestro país: no existe la capacidad instalada en las instituciones de salud para diagnosticar casos crónicos, y los profesionales de la salud ven a la ECh como algo que no ocurre comúnmente. Sin embargo los resultados de este estudio piloto

demuestran la necesidad de estudios más amplios en las unidades de cardiología de los hospitales de las provincias endémicas del Ecuador.

Dado que el número de pacientes que contribuyeron este estudio piloto fue pequeño (95), es necesario realizar estudios de mayor cobertura tanto en el Hospital Verdi Cevallos Balda como en el Hospital del IESS. De este modo se podrá tener una medida más fidedigna de la prevalencia de la enfermedad en esta provincia. Incluso permitirá conocer los síntomas más comunes que presentan los pacientes chagásicos cardíacos crónicos, de este modo se podrá implementar pruebas serológicas a los individuos que sufran estos síntomas y descartar la infección por *T. cruzi* o efectivizar el tratamiento.

Para que este esfuerzo funcione es necesario una reestructuración en el sistema de salud pública a nivel de país; implementar pruebas serológicas en los hospitales y centros de salud que permitan detectar la ECh. De este modo, se podrá diagnosticar la enfermedad en la fase aguda; haciendo posible la eliminación del parásito del torrente sanguíneo.

6.2 OBTENCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES A PARTIR DE CULTIVOS DE EPIMASTIGOTES

El intento de aislar parásitos procedentes de pacientes chagásicos crónicos con la forma cardíaca, no fue exitoso. Esto se debe a que en la etapa crónica de la enfermedad la mayor parte de parásitos se encuentran en los órganos (WHO, 2002); tan solo un bajo porcentaje de estos están circulando por el torrente sanguíneo. Por lo cual la posibilidad de obtener parásitos de la muestra de sangre venosa es reducida.

Debido a esto se utilizó aislados provenientes de vectores (TLG 2362 y TRC 2376) y un aislado TcI no ecuatoriano (“El Salvador”); de los cuales fue factible la obtención de tripomastigotes. Esto se debe a que en el cultivo de epimastigotes, existe un bajo número de tripomastigotes los cuales infectan las células del ratón, permitiendo su multiplicación.

6.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PARÁSITOS SANGUÍNEOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS DE LA PROVINCIA DE MANABÍ

T. cruzi es un parásito genéticamente variable, y existen seis linajes principales distribuidos de manera irregular a través de América del Sur y Central. Estudios previos realizados por el CIEI en mamíferos y reducidos infectados por *T. cruzi*, han detectado únicamente el linaje TcI en la provincia de Manabí; a pesar de un gran esfuerzo de muestreo. Parecería, a partir de dichos estudios, que en el Ecuador existe únicamente o predominantemente el linaje TcI, al igual que se ha reportado para los otros países de la región Norte de Sudamérica. Debido a que no existe información sobre aislados provenientes de pacientes ecuatorianos; en este estudio se caracterizó parásitos sanguíneos de dos individuos de la provincia de Manabí.

En Colombia, se han realizado estudios en los cuales se han caracterizado parásitos de aislados de pacientes chagásicos crónicos; para esto se utilizaron distintos marcadores moleculares, amplificando regiones del miniexón, de ADN ribosomal y ADN satélite (Ramírez *et al*, 2010). En dicho país, el linaje TcI se encuentra mayormente asociado con pacientes chagásicos crónicos que sufren cardiopatías; a pesar de esto también fue posible encontrar, en menor proporción, parásitos perteneciente al DTU TcII y TcIV (Ramírez *et al*, 2010).

En nuestro caso no fue posible aislar cultivos parásitos provenientes de pacientes, por lo cual los análisis moleculares se realizaron a partir del ADN obtenido de la muestra sanguínea de cada individuo. Debido al bajo número de parásitos que se encontraban circulando en el torrente sanguíneo, no fue factible amplificar las regiones del minicóndrion y del ADN ribosomal, las cuales pretendíamos emplear para tipificar los parásitos. Dichas regiones de ADN no pudieron amplificarse empleando estrategias de amplificación genómica (Repli-g, Quiagen; GenomiPhi, GE Healthcare) como primer paso antes de la PCR. Fue posible la amplificación con los primers para ADN satélite de *T. cruzi*, posiblemente debido a que estas secuencias se encuentran en un alto número de copias y pueden amplificar inclusive si el número de parásitos en la muestra es muy bajo.

Los resultados obtenidos con esta prueba molecular sugieren que los parásitos que infectaron a los dos pacientes detectados no pertenecen al linaje TcI. Estos resultados son sorprendentes, ya que TcI es precisamente el único linaje de *T. cruzi* que se ha reportado previamente en el Ecuador.

El ensayo de ADN satélite fue desarrollado en el año 1999, cuando solamente se reconocían dos linajes en *T. cruzi*. Uno de ellos corresponde a TcI y el otro a un grupo que actualmente está subdividido en los linajes TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI, por lo cual no fue posible determinar con precisión a qué linaje pertenecen. Por esta razón, es de suma importancia lograr amplificar estas muestras con otros iniciadores, para conocer a qué DTU corresponden los parásitos que circulan en estos pacientes.

El conocer que estos dos aislados no pertenecen al linaje TcI ya es información relevante, debido a que esto implicaría que en los vectores también circulan parásitos de otros DTUs. Por lo cual este resultado es de suma importancia ya que sería el primer reporte de otro linaje, a más de TcI, en el Ecuador. Es necesario aislar más cepas provenientes de pacientes chagásicos, de este modo podríamos identificar que linaje predomina en el ciclo doméstico de *T. cruzi* y conocer si este diverge con el ciclo selvático, donde prevalece el linaje TcI.

6.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE TRIPOMASTIGOTES (TLG 2362, TRC 2376, “El Salvador”)

Inicialmente, se deseaba obtener cultivos de *T. cruzi* a partir de los pacientes. Aparte de facilitar la caracterización de los linajes de los parásitos (a partir de cultivos puede obtenerse abundante DNA, a diferencia de extracción de DNA directamente de las muestras clínicas), esto permitiría estudiar otras características biológicas, tales como morfología e infectividad. Dado que fue imposible obtener cultivos de parásitos a partir de los pacientes de este estudio, se evaluaron estas propiedades en parásitos TcI aislados de vectores (TLG 2362 y TRC 2376) y un aislado de un paciente chagásico cardiaco crónico de origen salvadoreño (“El Salvador”).

Como se mencionó anteriormente estudios previos realizados en el Ecuador, (específicamente en la provincia de Manabí y Loja), en donde se aislaron parásitos provenientes de vectores; indican que el linaje predominante es el TcI (Ocaña, 2010). Esto concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación; en donde los dos

aislados provenientes de vectores (TLG 2362 y TRC 2376), resultaron pertenecer al linaje TcI.

Estudios realizados en Norte América y en México han demostrado que en estas regiones, el linaje predominante tanto en el ciclo silvestre como doméstico, igualmente es TcI (Bosseno *et al.*, 2002 y Roelling *et al.*, 2008). Lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio, en donde los parásitos aislados del paciente proveniente de El Salvador, pertenecen al linaje TcI.

6.5 LONGITUD DE TRIPOMASTIGOTES E INFECTIVIDAD DE LOS AISLADOS

El parásito *T. cruzi* posee tres estadios morfológicos; los tripomastigotes representan la forma infectiva para el hospedero mamífero, siendo este el responsable de invadir las células. Estudios previos han demostrado que la morfología de los tripomastigotes es variable, estos presentan dos formas: delgadas y anchas; la forma predominante depende de cada cepa (Tyler y Engman, 2001). Al propagar tripomastigotes de los aislados estudiados en cultivo celular (fibroblasto humano), fue evidente que existían diferencias morfológicas entre ellos, especialmente en cuanto a la longitud.

Al medir los tripomastigotes, se observó una relación directa entre su longitud y su capacidad de infectar las células: el aislado con los tripomastigotes de mayor tamaño presentó una infectividad más alta y viceversa. Esto coincide con reportes anteriores de que la heterogeneidad morfológica de los parásitos tiene un impacto sobre el proceso de invasión celular. Manoel-Caetano y Silva, 2007 reportan que los parásitos delgados, los de

mayor tamaño, pueden ingresar más fácilmente a las células; ocurriendo lo contrario con los que presentan la forma ancha. Resultados similares han sido obtenidos en el CIEI con estos aislados en células distintas: fibroblastos de ratón. Esto sugeriría que la infectividad depende de las características de los parásitos y no del hospedero o el tipo de células al que infectan.

Es importante mencionar que las pruebas estadísticas demuestran que las condiciones experimentales fueron homogéneas para cada tratamiento; lo cual indica que no existieron variaciones entre los distintos tratamiento que pueda alterar los resultados obtenidos. Por lo cual el número de células infectadas depende únicamente del grado de infectividad, y no se debe a error experimental.

Los tripomastigotes expresan una gran cantidad de proteínas en su superficie, tales como mucinas (De Souza, 2010). Dichas proteínas les permiten interactuar con receptores en la superficie de las células huésped, activando diversas rutas de invasión celular y orquestando los eventos celulares que conllevan a la invasión (Burleigh y Woolsey, 2002). Si bien no tenemos ninguna evidencia para demostrarlo, especulamos que los parásitos con mayor superficie podrían ser capaces de crear un mayor número interacciones con los receptores de membrana, invadiendo eficientemente las células. Lo óptimo sería realizar una investigación que incluya un mayor número de aislados, de este modo confirmar que existe una relación directa entre la infectividad de las cepas y su tamaño.

6.6 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE PNP EN LAS CÉLULAS INFECTADAS

Los parásitos intracelulares alteran las células que invaden para crear circunstancias propicias para su propia sobrevivencia. Uno de los mecanismos empleados por los parásitos intracelulares para este propósito es la modificación de la expresión génica de las células que los albergan; induciendo la expresión de ciertos genes y reprimiendo la de otros. Estudios previos realizados por Vaena de Avalos *et al.* en el 2002, demuestran que *T. cruzi* modula la expresión génica de sus células hospederas. Estos estudios fueron realizados con la cepa “Y”, una cepa de laboratorio estándar, aislada hace varias décadas y que corresponde al genotipo TcII.

Uno de los genes cuya expresión es inducida durante la infección intracelular con *T. cruzi* es el gen de la PNP (Costales *et al.*, 2009). *T. cruzi* no posee la capacidad de sintetizar purinas (Landfear, *et al.*, 2004) y se cree que al inducir la síntesis de estas bases nitrogenadas, las cuales son esenciales para su desarrollo, se beneficiarían. El parásito puede tomar las bases purinadas mediante transportadores que posee en su superficie (Landfear, *et al.*, 2004). En nuestro caso el estudio de la modulación génica se realizó a nivel proteico, a partir del uso de la técnica de “Western Blot”. Como control se utilizó el gen para actina, esto se debe a que esta proteína cumple una serie de funciones de “house-keeping” en el interior de la célula; tales como división celular, migración celular, interviene en la regulación transcripcional, entre otras (Perrin y Ervasti, 2010). Por lo cual el gen de actina siempre se ve expresado en una intensidad más o menos constante. La expresión de PNP se analizó durante la infección de fibroblastos humanos (HFF) con los tres distintos aislados (TLG 2362, TRC 2376 y el aislado salvadoreño) pertenecientes al

linaje TcI, que se habían escogido para este estudio. En este caso, los tres aislados fueron homogéneos en cuanto a la inducción de la expresión de este gen, a pesar de la gran variabilidad que habían mostrado en cuanto a infectividad y morfología.

Con el anticuerpo PNP se observó bandas tenues, a pesar de esto fue factible cuantificarlas con el programa ImageJ 1.44. Con los tres aislados se pudo constatar que existe un aumento de la expresión génica a medida que avanza el tiempo de infección, lo cual concuerda con estudios previos. Se ha demostrado que los cambios en la modulación génica son más notorios a partir de las 24h (Vaena de Avalos, 2002); con el aislado TLG 2362 y el aislado “El Salvador”, se generó un aumento en la densidad proteica a partir de las 48h. Esto no se observó con la cepa TRC 2376, recién a las 72h hubo un incremento drástico de la proteína PNP.

Estas diferencias en la densidad proteica podrían estar relacionadas con los distintos niveles de infectividad de cada aislado. Al ser menos infectivo, un menor número de parásitos ingresaran a las células; de este modo influenciando en la modulación génica. Lo cual explicaría los resultados obtenidos con el aislado TRC 2376, el cual posee un nivel de infectividad del 24,33%, al ser menos infectivo no induce cambios significativos en la modulación génica a las 24h y 48h; haciéndose estos notorios recién a las 72h. Mientras tanto el aislado “El Salvador” y TLG 2362, los cuales poseen una infectividad del 61,33 % y 49,5% respectivamente, al ser más infectivos generan cambios más tempranamente en la célula hospedera.

6.7 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una de las mayores limitaciones de este estudio fue el inconveniente en aislar parásitos provenientes de pacientes chagásicos crónicos. Hubiera sido de suma importancia constar con estos aislados, para realizar un estudio más completo. Debido a la falta de aislados de pacientes, los análisis moleculares de los mismos se dificultó; no se pudo amplificar las regiones del miniexón y de ADN ribosomal, debido al bajo número de parásitos existentes en la muestra sanguínea.

La detección colorométrica en la técnica de “Western Blot” fue otra limitación; a pesar que este método es ampliamente utilizado, no es tan sensible. Por lo cual al existir una baja cantidad proteica, esta no va a ser visualizada.

7. RECOMENDACIONES

Es importante aislar parásitos de pacientes chagásicos crónicos y realizar su caracterización molecular; de este modo se podrá conocer en realidad que linaje predomina en el Ecuador. También se debe realizar estudios sobre la modulación génica con parásitos pertenecientes a los seis DTUs y comparar con la cepa control “Y,” esto nos permitirá conocer si existen diferencias significativas en la expresión génica debido a la variabilidad genética del parásito.

Se recomienda realizar la revelación de la membrana con otro método más sensible, tal como el método de quimioluminiscencia. De este modo a pesar que la señal proteica sea muy baja, esta va a ser captada y podrá ser analizada.

8. LITERATURA CITADA

Abad-Franch F y Aguilar, V.H.M. 2000. Control de la enfermedad de Chagas en el Ecuador.

Datos y Reflexiones para una política de Estado. Revista del Instituto Juan César García
10 (1-2):12-32.

Abad-Franch, F y Aguilar, VHM. 2002. Control de la enfermedad del Chagas en el Ecuador.

Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Quito, Ecuador.

Aguilar, M., Abad-Franch, F., Racines, J y Paucar, A. 1999. Epidemiology of Chagas disease in

Ecuador. A brief review. Mem inst Oswaldo Cruz. 94: 387-393.

Aguilar, M., Abad-Franch, F y Grijalva, M.J. 2006. En: Descentralización y gestión del control

de las enfermedades transmisibles en América Latina. Parte 4: La descentralización en el
sector salud y el control de la enfermedad de Chagas en el Ecuador (Z.E. Yadón, R.E.
Güter, F. Tobar y A.C. Medici, eds) pp. 285-324.

Añez, N., Crisante, G., da Silva, F., Rojas, A., Carrasco, H., Umezawa, E., Stolf, A., Ramírez,

J. y Teixeira, M. 2004. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from
Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. Tropical
Medicine and International Health 9(12):1319-1326.

Bosseno, M., Barnabé, C., Magallón, E., Loazno, K., Ramsey, J., Espinoza, B. y Brenière, S.

2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Mexico. Journal of Clinical
Microbiology 40(2):627-632.

Burleigh, B. y Woolsey, A.M. 2002. Cell Signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion.

Cellular Microbiology 4(11): 701-711.

Chessler, A.D., Ferreira, L.R., Chang, T.H., Fitzgerald, K.A y Burleigh, B. 2008. A Novel IFN

Regulatory Factor 3- Dependent Pathway Activated by Trypanosomes Triggers IFN-in
Macrophages and Fibroblast. The Journal of Immunology 181: 7917-7924.

- Costales, J.A., Daily, J.P y Burleigh, B.A. 2009. Cytokine-dependent and –independent gene expression changes and cell cycle block revealed in *Trypanosoma cruzi*-infected host cells by comparative mRNA profiling. *BMC Genomics* 10: 252.
- Coura, R.J. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102:113-122.
- Cura, CI., Mejía-Jaramillo, A.M, Duffy, T., Burgos, J.M., Rodruigero, M., Cardinal,M.V., , S., Gurgel-Gonçalves, R., Blanchet, D., De Pablos, L.M, Tomasini, N., Da Silva, A., Russomando, G., Cuba Cuba, C.A., Aznar, C., Abate, T., Levin, M.J., Osuna, A., Gürtler, R.A., Diosque, P., Solari, A., Triana-Chávez, O y Schijman, A.G. 2010. *T. cruzi* I genotypes in different geographic regions and transmission cycles based on microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced leader genes. *International Journal of Parasitology* 40(14): 1599- 1607.
- De Freitas, J., Pinto, A., Pimenta, J., Rodríguez, L., Gonçalves, V., Texeira, S., Chiari, E., Junqueira, À., Fernandes, O., Macedo, A., Machado, C y Pena, S. 2006. Ancestral Genomes, Sex, and the Population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*. 2: e24.
- De Souza, W. 1999. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 19-36.
- De Souza, W.,De Carvalho, T.M y Barrias, E.S. 2010. Review of *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology* 2010:1-18.
- Dias, J. 1999. The evolution of Chagas disease (American Tripanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz* 94:103-121.
- Guhl, F., 2007. Chagas disease in Andean Countries. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 102 (1): 29-37.

- Gonzalez, A., Prediger, E., Huecas, M.E., Nogueira, N y Lizardi, P.M. 1984. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: It use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Natural Academic Science* 81: 3356-3360.
- Grijalva, M.J., Escalante, L., Paredes, R.A., Costales, J.A., Padilla, A., Rowland, E.C., Aguilar, M.H y Racines, J. 2003. Seroprevalence and risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection in the Amazon region of Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69 (4): 380-385.
- Guhl, F y Ramírez, J.D. 2011. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Toward the needs of genetic subdivision? *Acta Tropica* 119: 1-4.
- Jansen, A.M., Santos, A.P., Lisboa, P.C., Cupolillo, E., Mangia, R.H y Fernandes, O.1999. The Sylvatic Cycle of *Trypanosoma cruzi*: a Still Unsolved Puzzle. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 203-204.
- Knutsen, A.P. 2009. Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/887823-overview> Acceso el: 21 mayo 2009.
- Landfear, S.M., Ullman B., Carter, N.S y Sanchez, M.A.2004. Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. *Eukaryotic Cell* 3:245-254.
- Lewis, M., Ma, J., Yeo, M., Carrasco, H., Llewellyn, M. y Miles, M. 2009. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81(6):1041-1049.
- Liarte, D. B., Murta, S.M.F., Steindel, M y Romanha, A.J. 2009. *Trypanosoma cruzi*: Multiplex PCR to detect and classify strains according to groups I and II. *Experimental Parasitology* 123: 283-291.

- Llewellyn, M.S., Lewis, M.D., Acosta, N., Yeo, M., Carrasco, H.J., Segovia, M., Vargas, J., Torrico, F., Miles, M.A y Gaunt, M.W. 2009. *Trypanosoma cruzi* IIC: Phylogenetic and Phylogeographic Insights from Sequence and Microsatellite Analysis and Potential Impact on Emergent Chagas Disease. PLoS Neglected Tropical Disease 3(9): e510. doi:10.1371/journal.pntd.0000510.
- Lukeš, J., Guilbride, L.D., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R y Englund, P. 2002. Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. Eukaryotic Cell 1:495-502.
- Luquetti, A., Ponce, C., Ponce, E., Esfandiari, J., Schijman, A., Revollo, S., Añez, N., Zingales, B., Ramgel-Aldao, R., Gonzalez, A., Levin, M.J., Umezawa, E.S y Da Silveira, J.F. 2003. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of CAHAGAS Stat Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 46: 265-271.
- Miles, M.A., Llewellyn, M.S., Lewis, M.D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., Gaunt, M.W y Mauricio, I.L. 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of the *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. Parasitology 136 (12): 1509- 1528.
- Manoel-Caetano, F.S y Silva, A.E. 2007. Cadernos de Saúde Pública 23(10):2263-2274.
- Ocaña, S. 2010. Determinación de los linajes y dinámica de la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en dos provincias endémicas para la Enfermedad de Chagas en Ecuador. Tesis de Doctorado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Ocaña-Mayorga, S., Llewellyn, S., Costales, J.A., Miles, M y Grijalva, M. 2010. Sex, subdivisión and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Southern Ecuador. PLoS Neglected Tropical Disease 4(12): e915. doi:10.1371/journal.pntd.0000915.

- Perrin, B.J y Ervast, J.M. 2010. The Actin Gene Family: Function Follows Isoform. *Cytoskeleton* 67: 630: 634.
- Ponce, C., Ponce, E., Vinelli, E., Montoya, A., de Aguilar, V., Gonzalez, A., Zingales, B., Rangel-Aldao, R., Levin, M.J., Esfandiari, J., Umezawa, E.S., Luquetti, A.O y Silveira, J.F. 2005. Validation of a Rapid and Reliable Test for Diagnosis of Chagas' Disease by Detection of *Trypanosoma cruzi*-Specific Antibodies in Blood of Donors and Patients in Central America. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 5065-5068.
- Ramírez, J.D., Guhl, F., Rendón, L.M., Rosas, F., Marin-Neto, J.A y Morillo, C.A. 2010. Chagas Cardiomyopathy Manifestations and *Trypanosoma cruzi* Genotypes Circulating in Chronic Chagas Patients. *PLoS Neglected Tropical Disease* 4(11): e899. doi:10.1371/journal.pntd.0000899.
- Ramírez, J.D, Duque, M.C y Guhl, F. 2011. Phylogenetic reconstruction based in Cytochrome b (Cyt b) gene sequences reveal distinct genotypes within Colombian *Trypanosoma cruzi* I Population. *Acta Tropica* 119: 61-65.
- Roelling, D.M, Brown, E.L, Barnabé, C. Tybayrenc, M, Steurer, F.J y Yabsley, M.J. 2008. Molecular Typing of *Trypanosoma cruzi* Isolate, Unites States. *Emerging Infectious Disease* 14 (7): 123-125.
- Tyler, K.M. y Engman, D.M. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal of Parasitology* 3: 472-481.
- Unnikrishnan, M y Burleigh, B. 2004. Inhibition of host connective tissue growth factor expression: a novel *Trypanosoma cruzi* – mediated response. *The FASEB Journal* 18: 1625-1635.
- Vaena de Ávalos,S., Balder, I.J., Fisher, M., Boothroyd, J.C y Burleigh, B.A. 2002. Immediate/Early Response to *Trypanosoma cruzi* Infection Involves Minimal Modulation of Host Cell Transcription. *The journal of biological chemistry* 277: 639-644.

WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease. 2002. Control of Chagas disease. Second Report.

Wiser, M.F. 2007. Kinetoplastids. [En línea] <<http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/kinet.html>> [Consultado: Diciembre 2010].

Yacoub,S., Mocumbia, A.O y Yacoub, M.H. 2008. Neglected tropical cardiomyopathies: Chagas Disease. Heart 94: 244-248.

Zingales, B., Andrade, S., Briones, M., Campbell, D., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A., Machado, C., Miles, M., Romanha, A., Sturm, N., Tibayrenc, M. y Schijman, A. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104(7):1051-1054.

9. FIGURAS



Figura 2. Fotografía de un cassette de STAT-PAK con muestra sanguínea de pacientes. A- Muestra negativa; B- Muestra positiva. Imagen cortesía de Josselyn García (CIEI).



Figura 3. Mapa de la provincia de Manabí. Ubicación de las comunidades, Liguiqui y Río Canoa, de donde proceden los aislados de vectores *T. cruzi*. Ubicación de las localidades de origen de los pacientes chagásicos crónicos. Imagen cortesía César Yumiseva (CIEI).

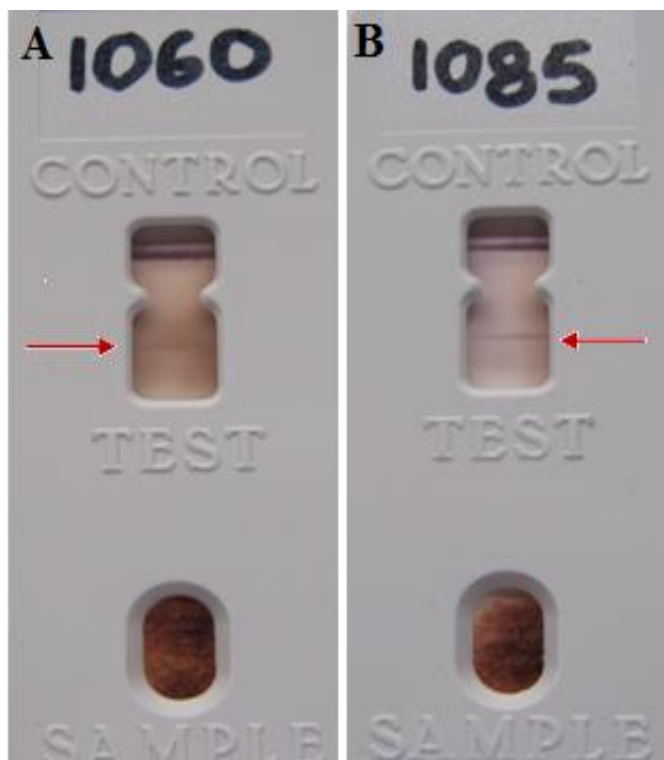


Figura 4. Fotografía de un casete de STAT-PAK con muestra sanguínea de pacientes sero-positivos. La banda que muestra la reactividad del paciente se encuentra señalada con una flecha. A-Paciente sero-positivo con con código 1060; Paciente sero-positivo con código 1085.

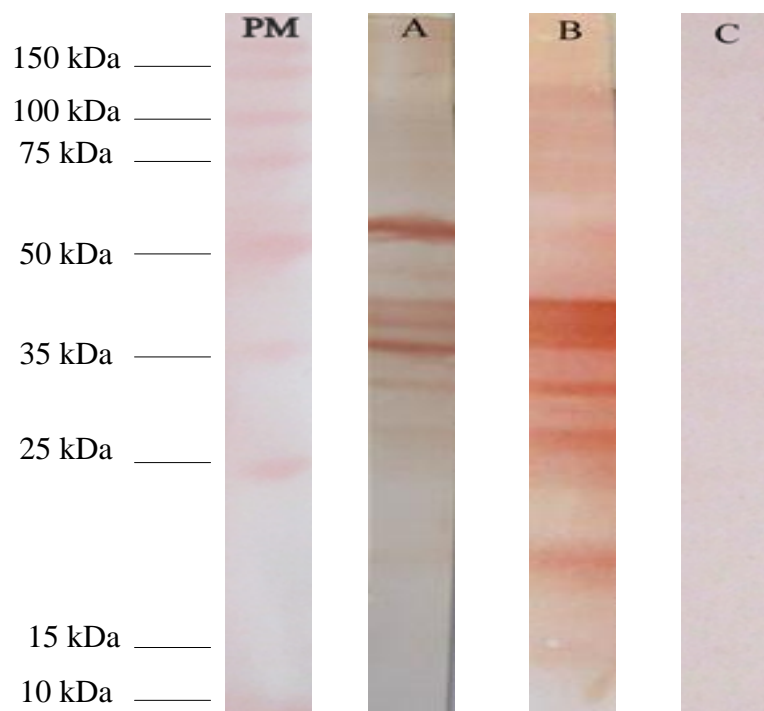


Figura 5. Comprobación de la reactividad de los sueros de pacientes chagásicos crónicos cardiacos, mediante la técnica de “Western Blot”. PM- Marcador proteico; A- suero de paciente con código 1060; B- suero de paciente con código 1085; C- control negativo.

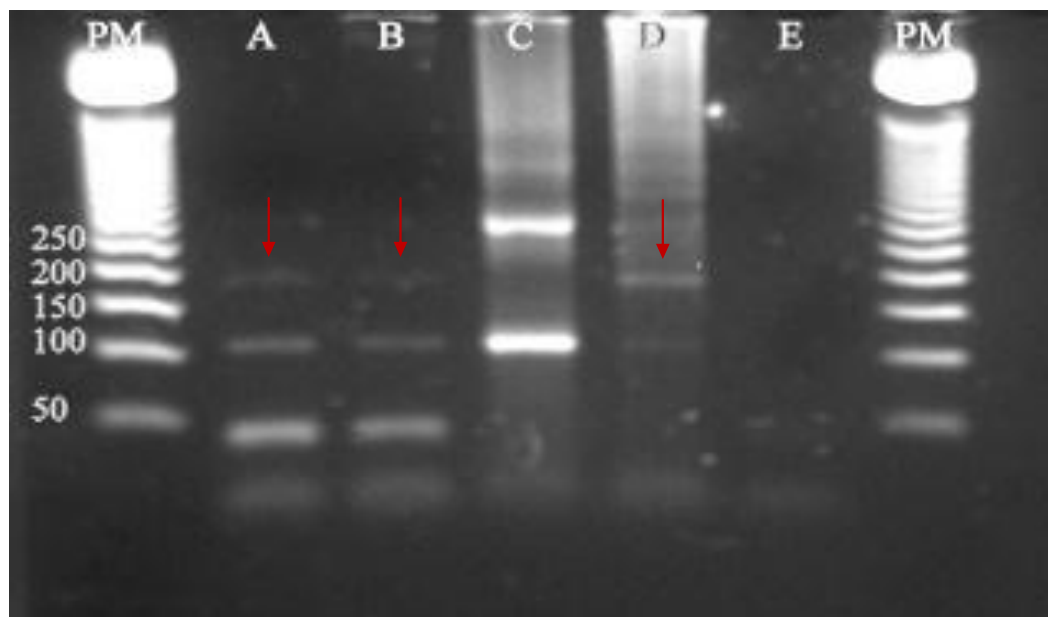


Figura 6. Amplificación de ADN satélite de *Trypanosoma cruzi* aislado de pacientes chagásicos crónicos cardiacos. A- paciente 1060; B-paciente 1085; C-control TcI aislado paciente chagásico; D- control TcII aislado de insecto vector; E- control negativo.

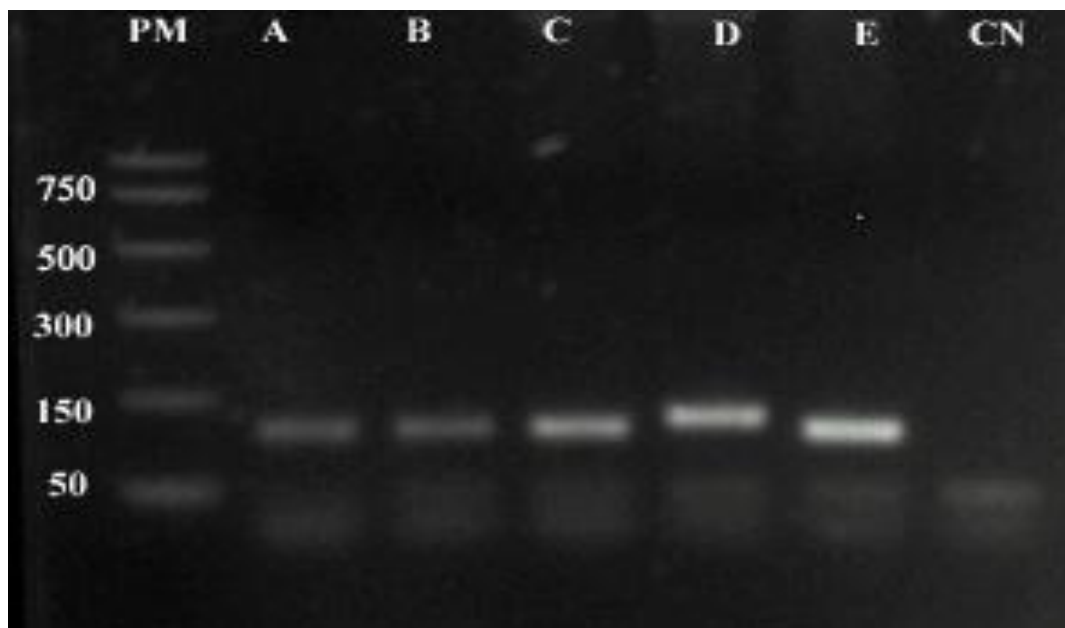


Figura 7. Amplificación del gen ribosomal 24S α (D71/D72). A-TLG2362; B-TRC 2376; C-aislado “El Salvador”; D-Cepa Y (TcII); E-Cepa Brazil (TcI).

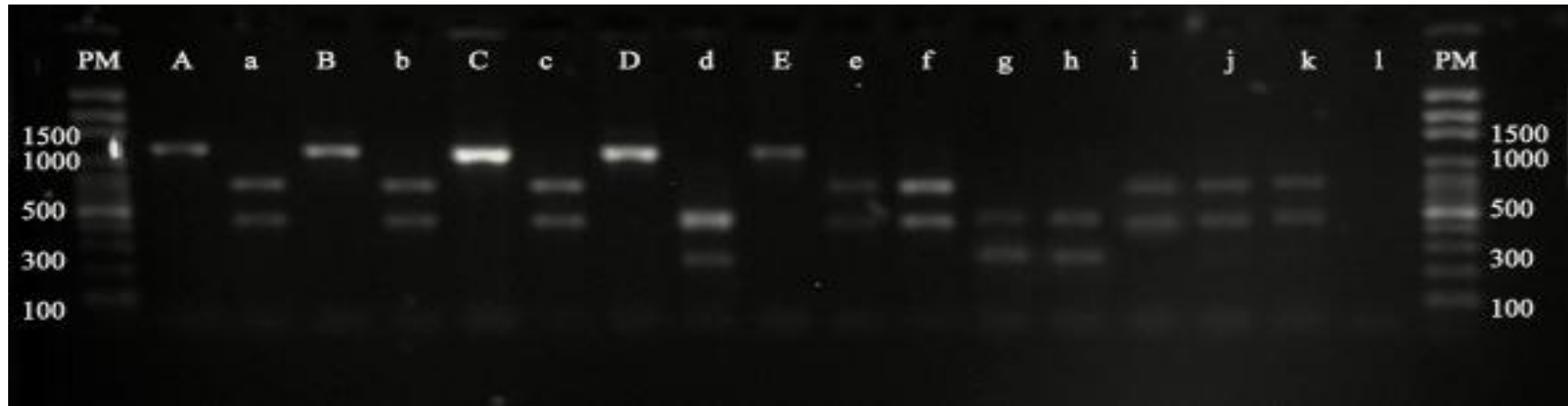


Figura 8. Amplificación del gen GPI y los productos de restricción con la enzima *HhaI*. A- TLG 2362; a- digestión de TLG 2362; B- TRC2376; b- digestión de TRC 2376 C- aislado “El Salvador”; c- digestión de la cepa humana; D- cepa Y; d-digestión de la cepa Y; E- cepa Brazil; c- digestión de la cepa Brazil; f- control TcI; g- control TcIIa (TcIV); h-control TcIIb (TcII); i- control TcIIc (TcIII); j- control TcIId (TcV); k- control TcIle (TcVI); l-control negativo.

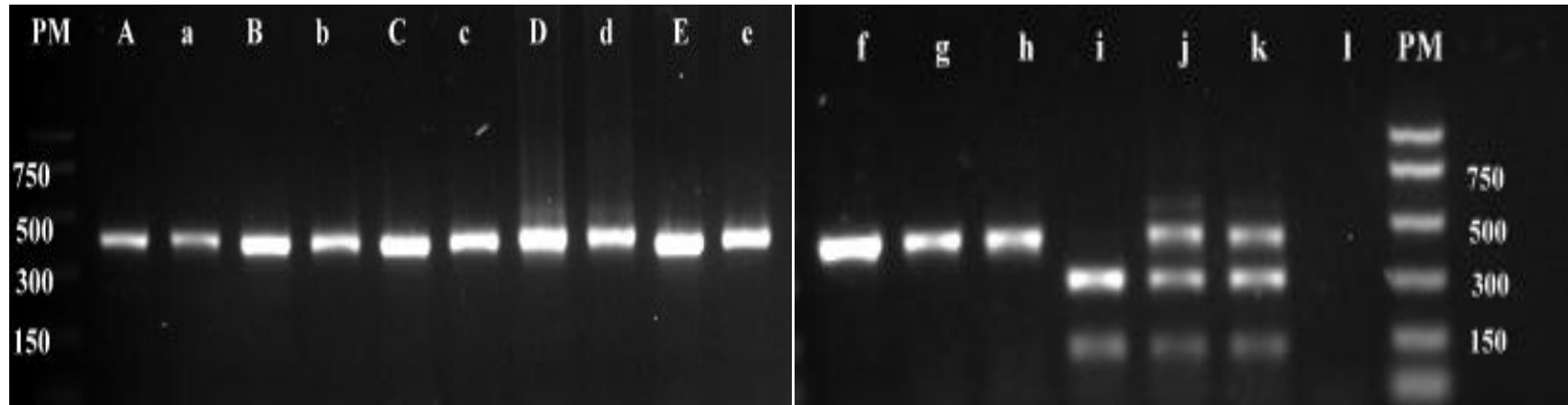


Figura 9. Amplificación del gen Hsp60 y los productos de restricción con la enzima *EcoRV*. A- TLG 2362; a- digestión de TLG 2362; B- TRC2376; b- digestión de TRC 2376 C- aislado “El Salvador”; c- digestión aislado “El Salvador”; D- cepa Y; d-digestión de la cepa Y; E- cepa Brasil; e- digestión de la cepa Brasil; f- control TcI; g- control TcIIa (TcIV); h-control TcIIb (TcII); i- control TcIIc (TcIII); j- control TcII d (TcV); k-control TcIIe (TcVI); l-control negativo.

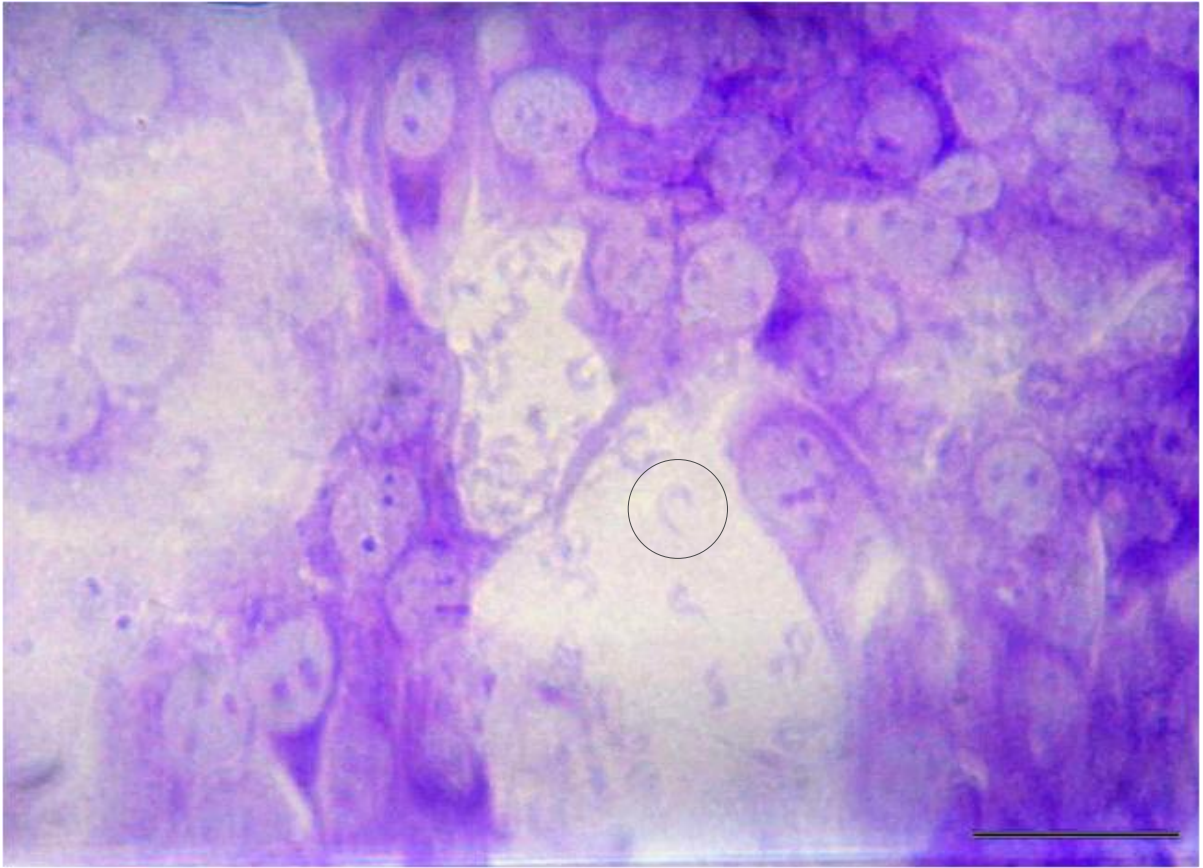


Figura 10. Tripomastigotes pertenecientes al aislado “El Salvador”. El círculo señala uno de los parásitos que fue medido para este estudio, la barra representa 20 μm .

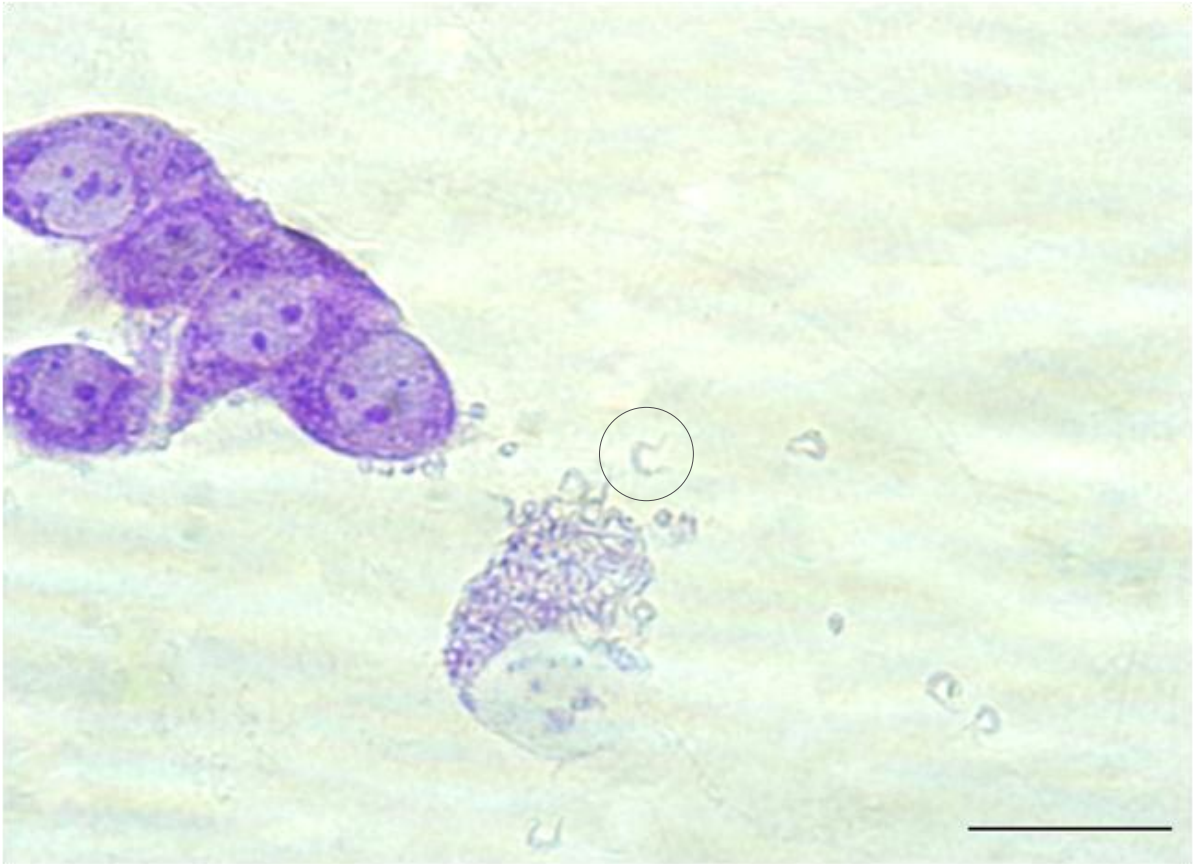


Figura 11. Tripomastigotes pertenecientes al aislado TLG 2362. El círculo señala uno de los parásitos que fue medido para este estudio, la barra representa 20 μm .

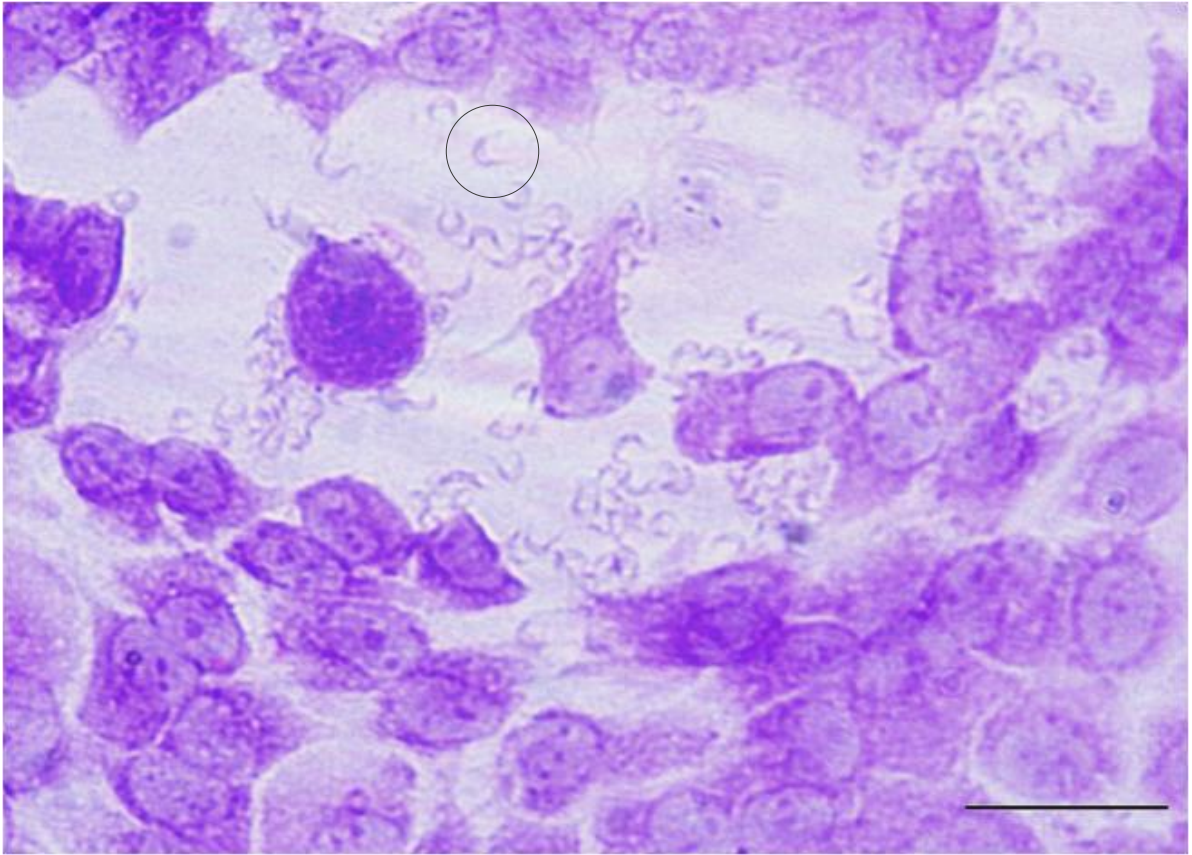


Figura 12. Tripomastigotes pertenecientes al aislado TRC 2376. El círculo señala uno de los parásitos que fue medido para este estudio, la barra representa 20 μm .

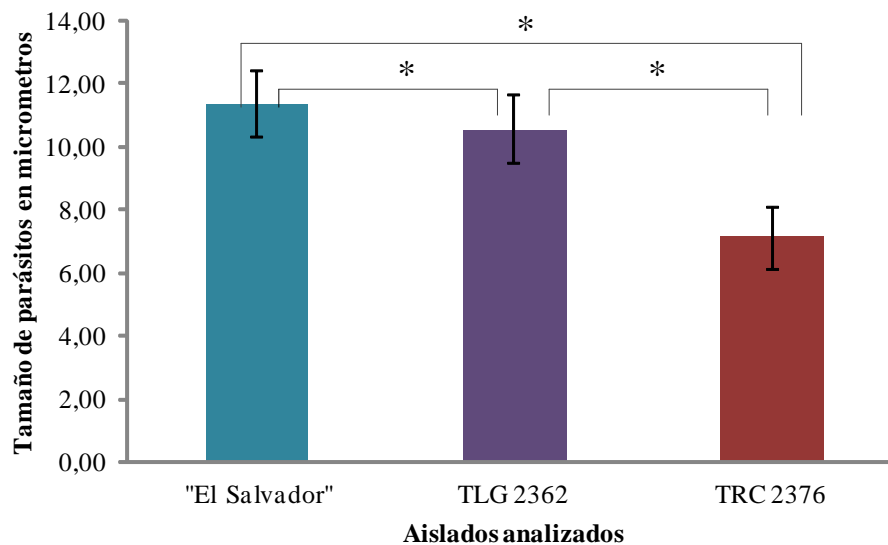


Figura 13. Diferencia en el tamaño de tripomastigotes. Las barras indican la media aritmética de la longitud de 30 tripomastigotes medidos con software Cell F y las líneas de desviación corresponden a la desviación estándar. * representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

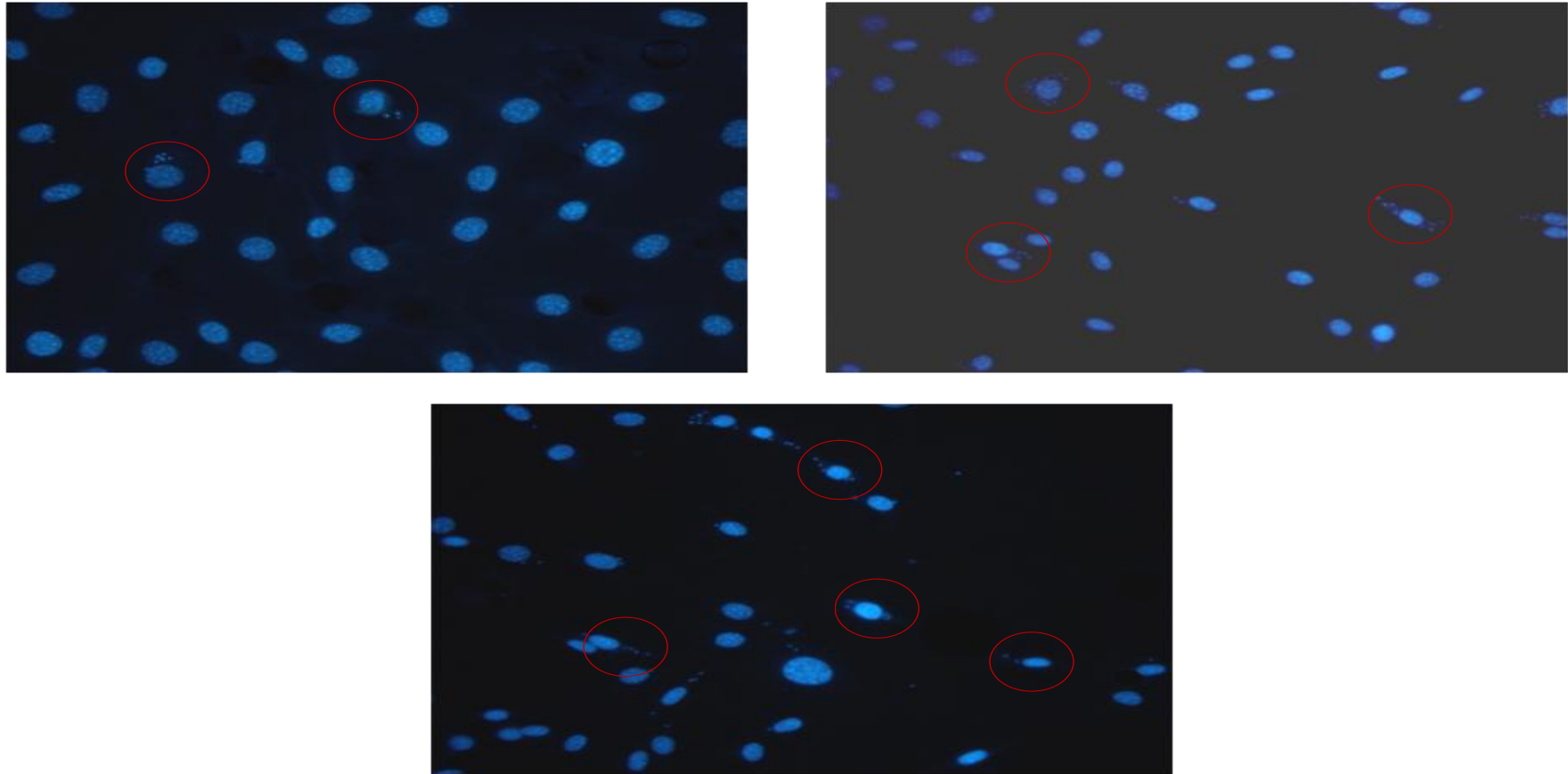


Figura 14. Fotografías representativas de células de fibroblasto humano infectadas con los distintos aislados analizados.

A-células infectadas con aislado TRC 2376; B- células infectadas con aislado TLG 2362; C-células infectadas con aislado “El Salvador”.

Algunas de las células infectadas se encuentran encerradas en círculos.

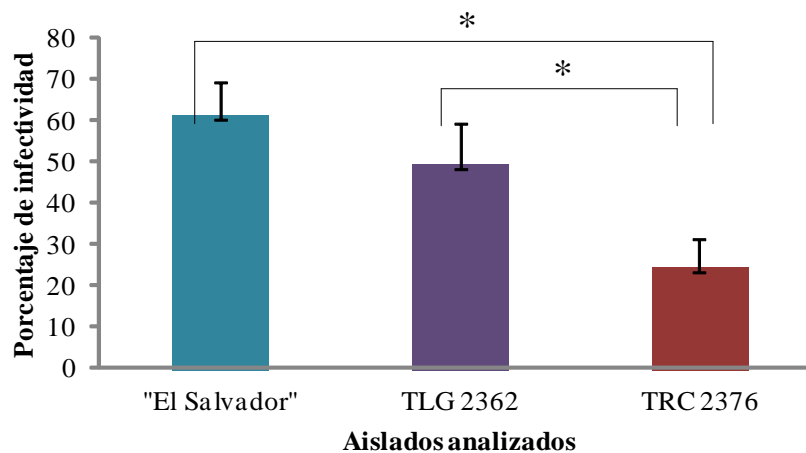


Figura 15. Porcentaje de infectividad *in vitro* de las cepas analizadas. Las barras indican la media de la infección en 600 células contadas en cada uno de los 3 experimentos. Las líneas de desviación corresponden a la desviación estándar. * representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

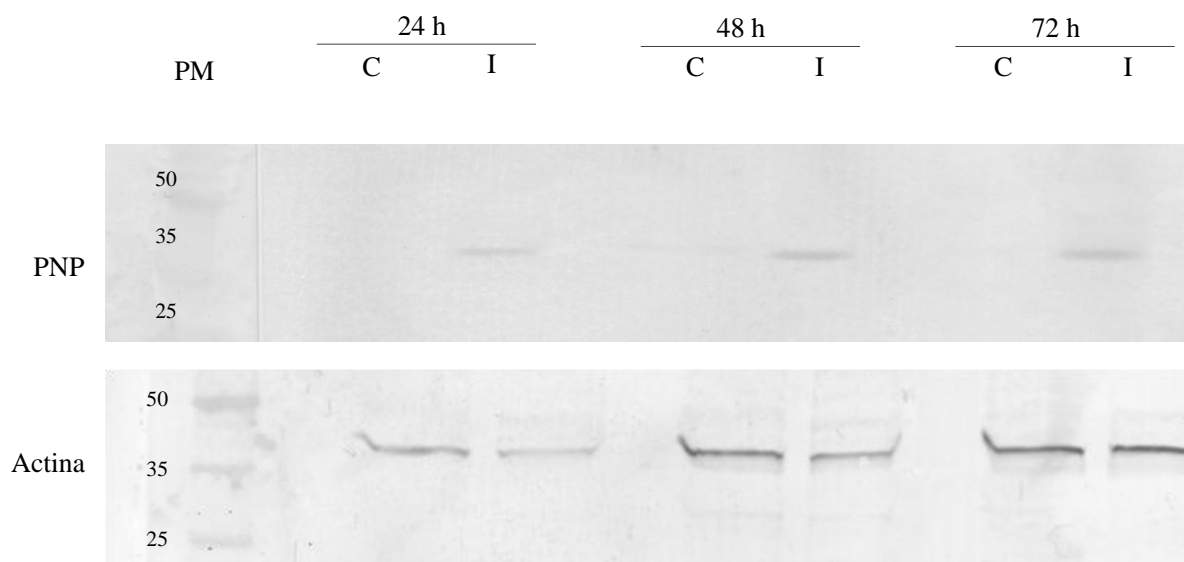


Figura 16. “Western blot” para PNP y actina en células HFF infectadas por *T. cruzi*.
C-Control negativo; I- Células infectadas.

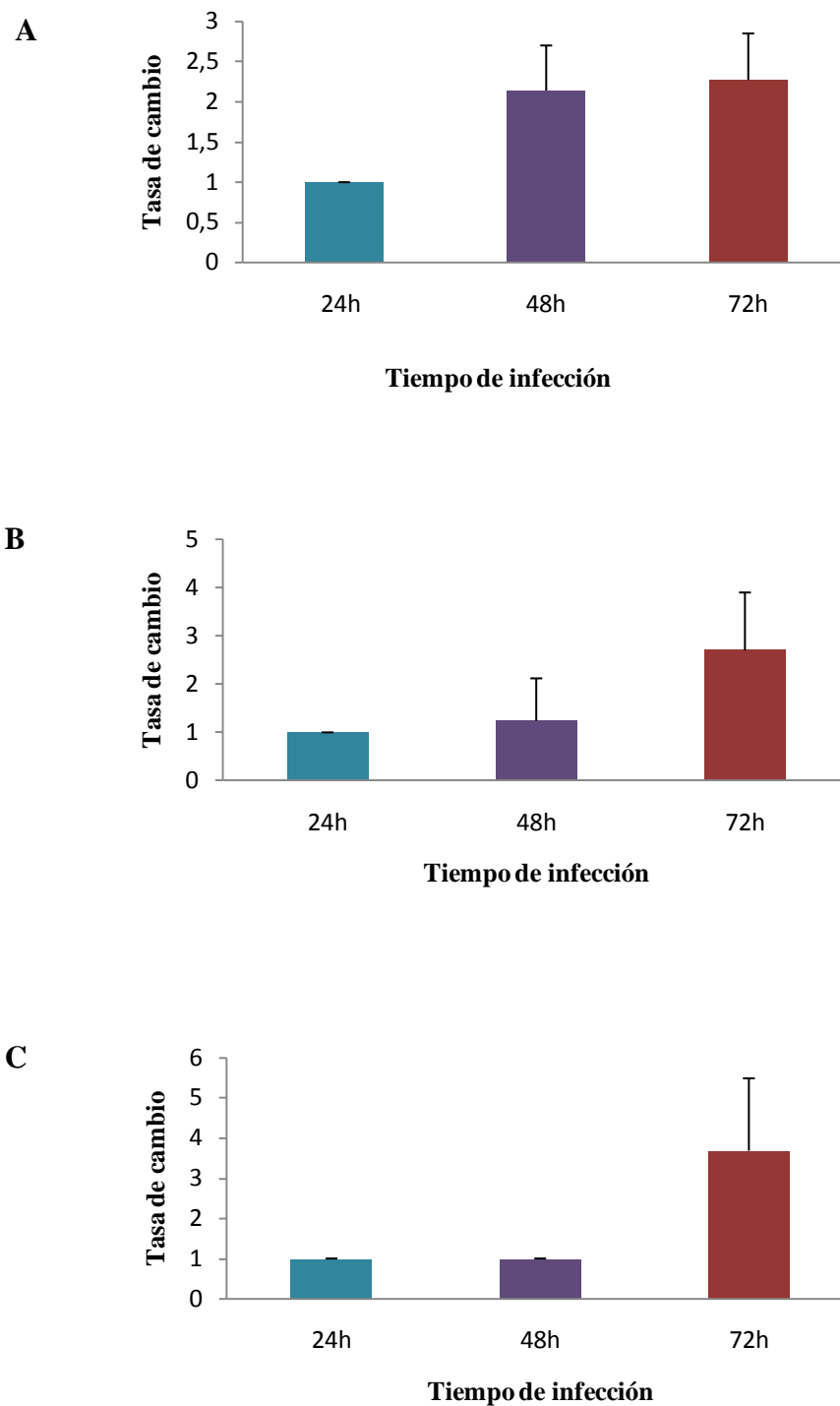


Figura 17. Densidad de las bandas de PNP cada 24, 48 y 72h. A- aislado “El Salvador”; B- aislado TLG2362; C- aislado TRC2376.

10. TABLAS

Tabla 1. Concentración de anticuerpo primario utilizado en la técnica de “Western Blot”

Aislado	Concentración de Anticuerpo primario	
	Actina	PNP
TRC 2376	1:100	1:100
TLG 2362	1:250	1:100
“El Salvador”	1:250	1:100

Tabla 2. Información general de los participantes del proyecto piloto de detección de la enfermedad de Chagas en pacientes cardiacos

Pacientes ♀	Pacientes ♂	Rango de edad	Provincia de nacimiento	Otras provincias en las que han vivido	% de participantes que reconocen el chinchorro	% de participantes sero-positivos
59	36	17-93	Bolívar Guayas Imbabura Los Ríos Manabí	Esmeraldas Pichincha Guayas	86%	2,1%

Tabla 3. Información general sobre los pacientes sero-positivos.

Código	Sexo	Edad	Lugar de Nacimiento			Otras provincias donde han vivido
			Localidad	Cantón	Provincia	
1060	F	48	San Ignacio de Colón	Portoviejo	Manabí	---
1085	F	61	Portoviejo	Portoviejo	Manabí	---

Tabla 4. Comprobación de la reactividad de los sueros de los pacientes positivos, utilizando distintos kits comerciales de ELISA.

Kits empleados	Punto de corte	Absorbancia muestra 1060	Absorbancia muestra 1085
Chagas EBRAM	0,417	1,339	1,175
Chagas Wiener	0,350	1,624	2,120
BioMérieux	0,252	1,576	N.R.
BioMérieux	0,227	N.R.	1,531

N.R.= No realizado

Tabla 5. Descriptivos de la ANOVA pertenecientes al experimento de longitud de tripomastigotes

Aislado	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					“El Salvador”	30		
TLG 2362	30	10,5150	1,16426	0,21256	10,0803	10,9497	8,02	13,30
TRC 2376	30	7,1427	0,99877	0,18235	6,7697	7,5156	5,73	9,96
Total	90	9,6736	2,12135	0,22361	9,2292	10,1179	5,73	13,79

Tabla 6. Prueba estadística ANOVA de un factor para longitud

Grupos	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	299,029	2	149,515	128,177	0,000
Dentro de grupos	101,483	87	1,166		
Total	400,513	89			

Tabla 7. Prueba estadística de Tukey: diferencias entre longitud

Aislado	N	Subconjunto para alfa =0.05		
		1	2	3
TRC 2376	30	7,1427		
TLG 2362	30		10,5150	
“El Salvador”	30			11,3630
Sig.		1,000	1,000	1,000

Tabla 8. Tabla de descriptivos de la ANOVA pertenecientes al experimento de infectividad de los aislados analizadas.

Aislado	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
TRC 2376	6	24,33	7,367	3,007	16,60	32,06	15	35
TLG 2362	6	49,50	10,213	4,169	38,78	60,22	40	67
“El Salvador”	6	61,33	8,802	3,593	52,10	70,57	48	72
Total	18	45,06	17,930	4,226	36,14	53,97	15	72

Tabla 9. Prueba estadística ANOVA de un factor para infectividad de los aislados analizadas

Grupos	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4284,778	2	2142,389	27,230	0,000
Dentro de grupos	1180,167	15	78,678		
Total	5464,944	17			

Tabla 10. Prueba estadística de Tukey: diferencias entre infectividad de los aislados analizados

Aislado	N	Subconjunto para alfa=0.05	
		1	2
TRC 2376	6	24,33	
TLG2362	6		49,50
“El Salvador”	6		61,33
Sig.		1,000	0,85

11. ANEXOS

Anexo 1. Documentos utilizados durante la investigación con sujetos humanos

1a. Formulario de consentimiento Informado

Proyecto Enfermedad Cardíaca Chagásica en el Ecuador
Ohio University, Universidad Católica del Ecuador y Ministerio de Salud Pública del Ecuador
Formulario de Consentimiento Informado.

Nombres _____ **Apellidos** _____

Hospital _____

Objetivo del Proyecto: Si usted ha venido a este hospital porque puede tener un problema cardíaco, queremos solicitarle su ayuda para que participe en un estudio sobre la enfermedad de Chagas. Esta enfermedad, que afecta a muchas personas del Ecuador, puede causar daños al corazón. Esa podría ser la causa de su problema cardíaco. Le pedimos su ayuda voluntaria para que participe en este estudio y nos permita tomar una muestra de sangre. Se examinará su sangre para ver si usted tiene el parásito que causa la enfermedad de Chagas y, si lo tiene, investigaremos qué variedad de este parásito es la que ha ocasionado su enfermedad. Su participación ayudará a obtener información valiosa que permitirá mejorar el cuidado médico y el tratamiento de las personas que sufren de esta enfermedad. Este estudio se hará en unas dos mil personas aproximadamente.

Participación voluntaria: Usted puede elegir libremente participar o no participar en absoluto en este proyecto de investigación. No habrá ningún tipo de penalización si usted no desea participar. Si se niega a participar Ud. no perderá ninguno de los beneficios de atención de salud que existen normalmente para Ud. Para que usted pueda participar en este proyecto, es necesario que usted entienda lo que se necesita de usted. Si usted acepta colaborar voluntariamente con nosotros, debe firmar (o poner su huella digital) en la línea disponible abajo en este formulario. Usted puede dejar de participar en este proyecto en cualquier momento sin necesidad de dar ninguna explicación. Aun si es que usted se retira del proyecto, su muestra de sangre será enviada al Instituto Nacional de Higiene si es que determinamos que usted está en riesgo de sufrir de la enfermedad de Chagas. No hay costo para participar en esta investigación. Si usted tiene dudas sobre la investigación o sobre sus derechos en este proyecto de investigación, por favor pregunte al entrevistador o contacte a las personas nombradas abajo.

Encuesta: Un entrevistador solicitará que usted responda a varias preguntas relacionadas con su historia médica y sobre usted mismo. Estas preguntas se refieren a varios factores asociados a la enfermedad de Chagas (tiempo estimado 5 minutos). Si usted prefiere no contestar alguna de las preguntas que el entrevistador le haga, usted está en plena libertad de hacerlo.

Datos clínicos: Pedimos su autorización para que su médico nos proporcione información sobre su estado de salud. Esta información nos será útil para conocer los efectos sobre el corazón que la enfermedad de Chagas pudiera tener en la gente de su provincia.

Toma de muestras de sangre: Personal entrenado tomará 10 gotas de sangre mediante un pinchazo en el dedo para una prueba rápida para la enfermedad de Chagas. Los resultados se le entregarán en 15 minutos. Una muestra más grande de sangre será tomada del brazo para obtener entre 3 y 10 ml de sangre (entre 1 y 3 cucharaditas) para que se confirmen los resultados por parte del Instituto Nacional de Higiene. Estas muestras serán examinadas por los médicos, de encontrarse que usted requiere tratamiento, será referido a las unidades del Ministerio de Salud. El El Instituto Nacional de Higiene le hará llegar los resultados de las pruebas a su médico en este hospital y al director de este proyecto, quienes le notificará a usted.

Otros exámenes que puede pedir su médico. Su médico podría también pedir que se le realice un electrocardiograma o ecocardiograma (exámenes del corazón), los cuales no tendrán costo para usted. Los resultados estarán disponibles un mes después de que se realicen los exámenes. Si es que el médico le ha realizado estos exámenes recientemente, no se le realizarán exámenes nuevos. Pedimos su autorización para que el doctor facilite los resultados de los exámenes al proyecto de investigación.

Tiempo estimado de duración: 2 minutos para toma de sangre por pinchazo del dedo; 5 minutos para toma de sangre del brazo, 10 minutos para información educativa. En el caso de que se requiera un electrocardiograma, aproximadamente una hora para la prueba.

Investigación: Este componente del proyecto utilizará parte de la información médica y parte de las muestras de sangre sin ninguna referencia a su nombre. Esta información será utilizada para estudiar la presencia de la Enfermedad de Chagas en su provincia, y los daños al corazón que podría causar. Además, se las empleará para probar una nueva prueba para detectar Chagas.

Confidencialidad: Toda la información que usted proporcione será mantenida confidencialmente y utilizada solamente para propósitos de la investigación sin conexión a su nombre, a excepción de sus pruebas de laboratorio, que pueden ser entregadas a su doctor en este hospital y a los médicos del Programa Nacional de

Chagas. Adicionalmente, si bien sus datos relacionados al estudio se mantendrán confidenciales, es posible que sea necesario que demos esta información a oficinas encargadas de proteger a los participantes en investigaciones.

Los resultados generales, serán compartidos con el Ministerio de Salud Pública del Ecuador y su comunidad.

Riesgos y beneficios: Los riesgos potenciales asociados a su participación en esta investigación son la pérdida de la confidencialidad de la información y molestias al sacar la sangre (es posible que haya una hinchazón o moretón leve en el sitio del pinchazo). El asignar un código a toda su información y desligarlo de cualquier referencia a la identificación personal reduce al mínimo este riesgo. La toma de muestras de sangre será realizada por profesionales debidamente entrenados, utilizando agujas y lancetas nuevas, siguiendo normas internacionales, lo que reducirá la posibilidad de molestias por la toma de sangre.

Los beneficios potenciales de su participación incluyen un incremento en el conocimiento sobre la enfermedad de Chagas y su prevención. En caso de que se determine que usted se encuentra en las etapas iniciales de la enfermedad, usted tendrá acceso gratuito a medicamentos para eliminar los parásitos que la causan. Si usted se encuentra en etapas más avanzadas, donde el medicamento no es indicado, la información obtenida permitirá que su cardiólogo decida el mejor curso de acción para manejar su enfermedad del corazón. Finalmente, la información que obtengamos facilitará la futura implementación de estrategias de control de la transmisión de la enfermedad de Chagas por parte del Ministerio de Salud, lo que tiene el potencial de mejorar la salud de su comunidad.”

Declaración general de consentimiento: “Declaro que he leído la información contenida en este documento, o que esta me ha sido leída. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y estas han sido satisfactoriamente contestadas. Decido participar voluntariamente en este estudio Al firmar abajo (o poner mi huella digital), declaro que los investigadores a cargo de este proyecto me han explicado los propósitos y los beneficios y riesgos de la investigación, y que los he entendido plenamente.

Firma (o huella digital) del participante o su representante legal. _____ Fecha: _____ de _____ del 200_

Firma del testigo (en caso de analfabetismo) _____ Fecha: _____ de _____ del 200_

Declaración de asentimiento (para menores entre 12 y 18 años de edad)

Yo, _____, tengo ____ años de edad, entiendo los objetivos de esta investigación y que es lo que se espera de mí. Por lo tanto acepto participar voluntariamente.

Firma, (o huella digital) del menor _____ Fecha: _____ de _____ del 200_

Si tiene preguntas sobre esta investigación por favor comuníquese con el Dr. Jaime Costales, CIEI Universidad Católica del Ecuador. Ave. 12 de Octubre 1076 y Roca. Tel. (02) 299 1700 ext. 1856. Fax. (02) 299 1689 Email: jacostalesc@puce.edu.ec.

1b. Encuesta sero-epidemiológica

FICHA DE INFORMACION SEROLOGICA Y EPIDEMIOLOGICA										
Estudio	B	0	3	Fecha nacimiento						
		M	F			Día	Mes	Año		
Sexo				Edad		Código individual				
Lugar de nacimiento										
Localidad				Cantón				Provincia		
Otros lugares en los que ha vivido										
Localidad				Cantón				Provincia		
Localidad				Cantón				Provincia		
Localidad				Cantón				Provincia		
				Sí		No				
Reconoce a los chinchorros?				<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>				
Tiene algún pariente con Chagas?				<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>				
Prefiere el STAT-PACK?				<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>				
RESULTADOS DE STAT PACK										
				P		N				
Resultado de prueba Stat Pak				<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>				
Segunda prueba Stat Pak				<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>				
Tercera prueba Stat Pak				<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>				
MUESTRAS DE SANGRE										
				Sí		No				
Tubo tapa roja (suero)				<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>				
Tubo tapa lila (sangre total)				<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>				
Tubo para cultivo				<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>				
Responsable	Nombres			Apellidos			Firma del responsable			

1c. Ficha de paciente

Ficha de Paciente												
Estudio	B	0	3		Código individual	1						
Centro	H	V	C	B	Fecha				2	0	0	9
						día	mes	año				
EVALUACIÓN DE PACIENTE. LA SIGUIENTE INFORMACIÓN DEBE SER LLENADA POR EL MÉDICO TRATANTE												
1. Nombre del médico tratante _____												
2.Cuál es el diagnóstico del paciente? _____												
3. Por favor marque con una "X" todos los síntomas que el paciente presenta												
Palpitaciones		<input type="checkbox"/>		Ortopnea		<input type="checkbox"/>						
Síncope		<input type="checkbox"/>		Disnea nocturna		<input type="checkbox"/>						
Dolor región hipocondrial derecha		<input type="checkbox"/>		Dolor torácico		<input type="checkbox"/>						
Desmayos		<input type="checkbox"/>		Palpitaciones		<input type="checkbox"/>						
Disnea		<input type="checkbox"/>		Estreñimiento		<input type="checkbox"/>						
Disfagia		<input type="checkbox"/>		Enfermedad cerebrovascular		<input type="checkbox"/>						
Otro	_____											
4. Se le realizó electrocardiograma al paciente?												
									Sí	<input type="checkbox"/>		
									No	<input type="checkbox"/>		
5. Por favor marque con una "X" si es que el paciente presenta alguno de los siguientes síntomas en el electrocardiograma												
Bloqueo de la rama derecha de His		<input type="checkbox"/>		Bloqueo de la rama izquierda de His		<input type="checkbox"/>						
Extrasístoles ventriculares		<input type="checkbox"/>		Alteración de la repolarización ventricular		<input type="checkbox"/>						
Ondas- Q		<input type="checkbox"/>		Bloqueo atrioventricular		<input type="checkbox"/>						
Disfunción del nódulo sinoatrial		<input type="checkbox"/>		Taquiarritmia supraventricular		<input type="checkbox"/>						
Fibrilación atrial		<input type="checkbox"/>		Enfermedad cerebrovascular		<input type="checkbox"/>						
Otro	_____											
6. Se le realizó ecocardiograma al paciente?												
									Sí	<input type="checkbox"/>		
									No	<input type="checkbox"/>		
7. Por favor marque con una "X" si es que el paciente presenta alguno de los siguientes síntomas en el ecocardiograma.												
Anomalías de contracción del miocardio		<input type="checkbox"/>		Cardiomiopatía dilatada		<input type="checkbox"/>						
Aneurismas ápice ventrículo izquierdo		<input type="checkbox"/>		Anomalía en porción basal de septo anterior		<input type="checkbox"/>						
Hipokinesia/akineasia pared posteroinferior		<input type="checkbox"/>		Dilatación y disfunción en ventrículo derecho		<input type="checkbox"/>						
Otro	_____											

Anexo 2. Soluciones utilizadas en la técnica de “Western Blot”

2a. Electroforesis

Tampón de muestra

Reactivos	Cantidad
Tris-Cl	4 ml
Dodecil sulfato sódico (SDS)	4 ml
Glicerol	1 ml
2-mercaptoetanol	400 µl
H ₂ O	600 µl
Azul de bromofenol	20 mg

Solución monomérica

Reactivo	Cantidad
Poliacrilamida	60 g
Bisacrilamida	1,6 g
Agua destilada	200 ml

Tampón del gel de separación 4X

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	150 ml
Tris base	36,3 g
Ajustar el pH a 8.8 con HCl	
Aforar a 200 ml	

4X Buffer del gel apilamiento

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	40 ml
Tris base	3 g
Ajustar el pH a 6.8 con HCl	
Aforar a 50 ml	

SDS AL 10%

Reactivo	Cantidad
SDS	10 g
Agua destilada	100 ml

Persulfato de amonio

Reactivo	Cantidad
Persulfuro de amonio	1 g
Agua destilada	10 ml

Gel de separación

Reactivo	Cantidad
Solución monomérica	6,66 ml
Tampón de gel de separación 4X	5 ml
SDS al 10%	0,2 ml
Agua destilada	8 ml
Persulfato de amonio al 10%	0,1 ml
TEMED	6,6 μ l

Gel de apilamiento

Reactivo	Cantidad
Solución monomérica	0,44 ml
4X Buffer de gel de apilamiento	0,83 ml
SDS sl 10%	33 μ l
Agua destilada	2 ml
Persulfato de amonio	23,4 μ l
TEMED	3,4 μ l

Buffer de corrida 10x

Reactivo	Cantidad
Tris base	30,2 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
Agua destilada	100 ml

Se verifica que el pH se encuentre entre 7,0 y 8,0

2b. Inmunoblot

Tampón de transferencia

Reactivo	Cantidad
Tris base	3,03 g
Glicina	14,4 g
Metanol	200 ml
Agua destilada	800 ml

Se verifica que el pH se encuentre en 8,0

Solución salina tamponada con tris (TBS 1X)

Reactivo	Cantidad
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Tris base	3 g
Agua destilada	800 ml
Se ajusta el pH a 7,4 con HCl	
Se afora a 1000 ml	

Preparación de sustrato

Reactivo	Cantidad
3-amino-9 etil-carbazol (AEC)	0,67 ml
Ácido acético 0,1 M, pH5	10 ml
Se filtra por gravedad a través de papel filtro Whatman # 1	
Se añade peróxido de hidrógeno 30%	10 μ l

Anexo 3. Solución de White

Reactivo	Cantidad
HgCl ₂	0,25 g
NaCl	6,5 g
HCl al 100%	1,25 ml
Etanol al 95%	250 ml

Se afora a 1L utilizando agua ultra
pura

Anexo 4. Solución salina tamponada con fosfato (PBS 1 X)

Reactivo	Cantidad
Agua ultra pura	800 ml
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Se afora a 1L	
Se autoclava la solución	

Anexo 5. Hemocultivo

5a. Agar Sangre

Reactivo	Cantidad
Agar sangre base	4,2 g
Triptona	1,5 g
Agar	1,8 g
NaCl	1,8 g

Disolver con calor

Autoclavar

Por cada 45 ml de agar se agrega 5 ml de sangre

5b. Sobrenadante

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	350 ml
NaCl	3,15 g
Gentamicina	1,05 ml (50mg/ml)
5-fluorocitosina	5,25 ml
Se esteriliza por filtración	

Anexo 6. Preparación de medio infusión de hígado triptosa (LIT)

En 900 ml de agua destilada se colocaron los siguientes reactivos:

1. 4 g de NaCl
2. 0,4 g de KCl
3. 8 g Na₂HPO₄
4. 2 g de dextrosa
5. 3 g de infusión de hígado
6. 5 g de triptosa

Se mezcló con un agitador magnético y se ajustó el pH a 7.2 con HCl; se aforó a 1000 ml.

Una vez ajustado el pH se agregó 1 ml de hemina, se incubó a baño maría a 68°C por una hora. Se dejó enfriar y se agregó:

7. 100 ml de FBS inactivado
8. 1ml de penicilina/estreptomicina
9. 1ml de gentamicina

Se filtró utilizando filtros con membrana de celulosa con poros de 0,2 µm; se almacenó a 4°C

Anexo 7. Cultivo para crecimiento celular suplementado con suero fetal bovino (FBS 10%)

Reactivo	Cantidad
Agua ultra pura	500 ml
Bicarbonato de sodio	1,85 g
Medio Eagle, modificación de Dulbecco (DMEM)	6,7 g
Se ajusta el pH a 7,2 con HCl	
Penicilina/estreptomicina	5 ml
FBS	50 ml
Piruvato 2,2%	5 ml
Se filtra la solución	

Nota: Para realizar el medio de cultivo para células infectadas con tripomastigotes se coloca 10 ml de FBS (2%).

Anexo 8. Infección de ratones Balb/c

Se centrifugaron 10 ml de medio de cultivo de epimastigotes en la fase estacionaria (en donde se generan espontáneamente algunos tripomastigotes metacíclicos) a 1710 xg por 10 minutos. Se removió el sobrenadante y se realizó un lavado añadiendo PBS 1X; se centrifugó nuevamente a 1710 xg y se re suspendió el pellet con PBS. Se determino el número de parásitos presentes con ayuda de un hemocitometro. Fueron re suspendidos en 100 µl de PBS e inoculados en un ratón por vía intraperitoneal.

Anexo 9. Cultivo de células HFF en placas de seis pocillos

Células cultivadas en frascos de 75 ml, fueron lavadas en PBS 1X estéril y tratadas con un mililitro de tripsina-EDTA por cinco minutos a 37 °C; la tripsina fue inactivada mediante la adición de DMEM-10. Se realizó el conteo del número de células desprendidas por medio de un hemocitómetro y se colocaron 1×10^5 en 2ml de DMEM-10; lo cual se agregó en cada uno de los pocillos. Se le permitió a las células adherirse y crecer por 24 h. Las células fueron infectadas a una multiplicidad de infección de 100, con tripomastigotes derivados de cultivos celulares.

Anexo 10. Infección de células HFF con tripomastigotes

Se centrifugaron 10 ml de cultivo a 846 xg por 15 minutos, esto permitió eliminar las células de mamífero; mientras los tripomastigotes permanecen en el sobrenadante. Se separaron 10 µl del sobrenadante para utilizarlo en el conteo de parásitos en el hemocitómetro. El resto de medio de cultivo se centrifugó nuevamente a 24 xg por 10 minutos. Esto permitió la formación de un precipitado, el cual se resuspendió en 10 ml de DMEM-2; finalmente se separó el volumen necesario para infectar las células.

Anexo 11. Preparación de paraformaldehído al 4%

Reactivo	Cantidad
Agua ultra pura	50 ml
Paraformaldehído	4 g
Mezclar e incubar a 60 °C	
NaOH (2N)	2 gotas
PBS 3X	25 ml
Se ajusta pH a 7,2 con HCL	

Anexo 12. Preparación de buffers utilizados en la extracción de ADN a partir de fenol cloroformo

12 a. Tampón Tris-EDTA-Litio (TELT)

Reactivo	Concentración
Tris base	50 mM
EDTA	62,5 mM
LiCl	2,5 M
Triton X-100	4 %
Se agrega 53 ml de H ₂ O	

12b. Tampón Tris-EDTA (TE)

Reactivo	Concentración
Tris base	10 mM
EDTA	2 mM
Se afora al volumen deseado	

Anexo 13. Amplificación de templado de ADN con el Kit Repli-g Ultra Fast

Se agrega 1 μ l de templado en un tubo, se le adiciona 1 μ l de buffer de denaturación; se mezcla y se centrifuga. La muestra se incuba a T° ambiente durante tres minutos; una vez terminada la incubación se agrega 2 μ l de buffer de neutralización, se mezcla y se centrifuga. Posteriormente se añade 16 μ l de Master Mix (Buffer de reacción y ADN polimerasa). Una vez culminado esto se amplifica el templado utilizando el siguiente perfil térmico: 90 minutos a 30° C y 3 minutos a 65° C.

Anexo 14. Tinción GIEMSA

14a. Soluciones utilizadas para la tinción Giemsa

Solución de trabajo Giemsa 10%

Reactivo	Cantidad
Buffer de trabajo Giemsa	11,7 ml
Tinte Giemsa	1,3 ml
TritonX-100 5%	2 gotas

Tinte Giemsa

Reactivo	Cantidad
Polvo de tinción Giemsa	3 g
Glicerol	140 ml
Metanol absolute	270 ml
Núcleos de ebullición	30 g
Se agita	

Triton X-100 5%

Reactivo	Cantidad
Triton X-100	5 ml
Agua destilada	95 ml

14b. Buffer de trabajo Giemsa

Reactivo	Cantidad
Stock Buffer 100X	10 ml
Agua destilada	990 ml

Revisar que el pH se encuentre en 7.2

Buffer 100X

Reactivo	Cantidad
Na ₂ HPO ₄	59,4 g
Na ₂ PO ₄ H ₂ O	36,38 g
Agua destilada	100 ml
Se autoclava	

Anexo 15. Verificación de resultados de pacientes seropositivos

Guayaquil, 20 de Julio de 2009

Master
Rosa Chiriboga
Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas PUCE
En su despacho.

De mi consideración

Por medio de la presente informo a usted los resultados de las 3 (tres) muestras de sueros del Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas recibidas el 8 de julio del presente año, provenientes de la Provincia de Manabí para realizar pruebas diagnósticas para Enfermedad de Chagas mediante el método ELISA, las mismas que dieron como resultado:

Código	Comunidad	Edad (años)	ELISA
IFN266	San Francisco	1ª 10m	No Reactivo
1060	Portoviejo	48ª	Reactivo 2.389 D.O.
1085	Portoviejo	62ª	Reactivo 2.595 D.O.

Punto de Corte: 0.307 D.O.

Detalle del reactivo utilizado:

ELISA de Laboratorios Wiener procedencia Argentina
Lote: 0809C08660 Fecha de vencimiento: 08/2008

Sin otro particular me despido de usted.

Atentamente,

Dr. Luiggi Martini Robles
LIDER DEL SUB-PROCESO DE PARASITOLOGÍA

LDRP/