



Artículo Original

Antígenos de excreción-secreción de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* detectados por Western Blot usando sueros de pacientes con parasitosis confirmada

Excretory-secretory antigens of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* detected by Western blotting using sera from patients with confirmed parasitoses

Hermes Escalante¹, César A. Jara² y Renzo Mayhuay²

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú. ²Bachiller en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, enfermedad parasitaria causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, se caracteriza por su endemidad y silencioso proceso sin manifestaciones clínicas por tiempo prolongado, a veces décadas, de cuya cronicidad resultan episodios fatales. El parásito posee varias formas evolutivas y dos huéspedes: un vertebrado (hombre y otros mamíferos) y otro invertebrado, el vector (triatominos). Debido a que no se cuenta con un diagnóstico serológico estandarizado que permita el análisis confiable de poblaciones en riesgo de modo tal que pueda proponerse la implementación de tratamientos oportunos, se planteó una investigación dirigida a identificar a los antígenos de excreción-secreción de los tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* obtenidos por metaciclógenesis de epimastigotas cultivados a partir de tripomastigotas metacíclicos aislados de *Panstrongylus chinai* naturalmente infectado en el valle Chaman (La Libertad) mediante la técnica de Western blot utilizando sueros de pacientes con enfermedad de Chagas confirmada. Para ello, los cultivos de epimastigotas se hicieron en medio BHI/PYLB, la metaciclógenesis en Grace's Insect Medium (Sigma) suplementado con suero bovino fetal y la obtención de productos excretados-secretados en Eagle's Minimum Essential Medium (Sigma). Se obtuvo 60% de metaciclógenesis a tripomastigotas con patogenicidad comprobada en ratones BALB/c, asimismo, 24 bandas reactivas mediante el Western blot, con pesos moleculares variables entre 13.8 y 97.4 KDa y dos grupos de bandas de mayor reactividad: de 21 a 31 y de 45 a 100 KDa. De ellas, la banda de 43.7 KDa también apareció cuando se cruzaron con sueros de pacientes con toxoplasmosis y leishmaniasis.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, *Panstrongylus chinai*, Western blot

ABSTRACT

Chagas disease, parasitic disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is characterized by its endemicity and silent process without clinical manifestations long time, sometimes decades, of which are fatal chronic episodes. The parasite has several evolutionary forms and two hosts: a vertebrate (man and other mammals) and other invertebrate, vector (Triatominae). Because there is no standardized serological diagnosis that allows reliable analysis of populations at risk so that you can propose the implementation of appropriate treatments, research aimed at identifying *Trypanosoma cruzi*-trypomastigotes excreted-secreted antigens obtained by metacyclogenesis of epimastigotes grown from metacyclic trypomastigotes isolated from naturally infected *Panstrongylus chinai* from Chaman Valley, La Libertad, Peru by Western blot using sera from patients with confirmed Chagas disease. Cultures of epimastigotes were made in BHI/PYLB-medium, metacyclogenesis in Grace's Insect Medium (Sigma) supplemented with fetal bovine serum and excreted-secreted products were obtained in Eagle's Minimum Essential Medium (Sigma). 60% metacyclogenesis to trypomastigotes were obtained and pathogenicity-test were made using BALB/c mice, also were found 24 reactive bands by Western blot, with variable molecular weights between 13.8 and 97.4 KDa and two sets of bands of a higher reactivity: 21 to 31 and 45 to 100 KDa. Of these, 43.7 kDa band also appeared when crossed with sera from patients with toxoplasmosis and leishmaniasis.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, *Panstrongylus chinai*, Western blot

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi, agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, infecta a aproximadamente 10 millones de personas en el continente americano, con marcadas diferencias en áreas endémicas, donde otras 90 millones se encuentran en riesgo; esta parasitosis, incluida dentro de las dolencias desatendidas y considerada la tercera parasitosis más frecuente a nivel mundial después de la malaria y la esquistosomiasis, se caracteriza por ser incurable, causar pérdidas económicas por incapacidad laboral y muerte repentina de personas con apariencia sana y en plena capacidad productiva y ser emergente en varios países no americanos debido a las migraciones^{1,2,3}

Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna en el sur y Piura, Cajamarca y Amazonas en la zona nor-oriental son los departamentos en donde se ha registrado casos autóctonos de la enfermedad de Chagas en el Perú, con aproximadamente 700 mil personas infectadas y más de un millón en riesgo de infección por *T. cruzi*, sobre todo en zonas tradicionalmente catalogadas como endémicas (Arequipa, Moquegua y Tacna) en donde esta enfermedad es considerada emergente en zonas urbanas hacia donde se ha desplazado el vector: *Triatoma infestans*^{4,5,6,7,8,9}; en otros departamentos, como Lambayeque y La Libertad, aun cuando no se han registrado casos humanos se ha encontrado al parásito en animales y el vector, *Pnastrongylus chinai*, y serología positiva en humanos y animales sinantrópicos^{4,5,9,10}.

La enfermedad de Chagas se transmite principalmente a través de vectores, insectos triatominos, y secundariamente por transfusión sanguínea, vía oral, trasplante de órganos y de madre a hijo (congénita); su evolución incluye una fase aguda, poco evidente, y una fase crónica de larga duración dentro de la cual se encuentra una fase denominada indeterminada porque los parásitos no se hacen evidentes, pero sí la serología positiva, sin embargo, a diferencia de otras parasitosis, es más patógena en la etapa crónica porque órganos vitales como el corazón, esófago y colon degeneran, se agrandan (megas) y dejan de funcionar^{1,2,3}.

Dependiendo de la fase, se han implementado numerosas técnicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas; por ejemplo, durante la aguda tienen gran validez las técnicas parasitológicas, entre ellas: examen en fresco, gota gruesa, micro-hematocrito, xenodiagnóstico y la de Strout^{3,11,13} y durante la fase crónica adquieren relevancia las técnicas serológicas^{11,14,15}. De ellas, la técnica de ELISA indirecta y la hemaglutinación indirecta mantienen su utilidad porque son usadas sobre todo para determinar la negatividad serológica de sangre destinada a las transfusiones¹¹, sin embargo, en estudios epidemiológicos o en diagnóstico rutinario de laboratorio, sobre todo ELISA que se ha sido diseñada en numerosos kits comerciales, ha tenido discrepancias por su gran variabilidad respecto del tipo de antígeno usado¹⁴. Por esa razón, se ha optado por usar la técnica de Western blot, que ha demostrado tener mayor sensibilidad y especificidad que las demás técnicas diseñadas para la detección de anticuerpos^{3,13,15}.

Al igual que otras técnicas, la de Western blot puede llevarse a cabo utilizando antígenos de distinta naturaleza, tales como extractos y los antígenos somáticos, sin embargo, se ha determinado que los antígenos de excreción-secreción, que son productos del metabolismo y se obtienen de parásitos vivos son los que mejores resultados generan tanto en diagnósticos rutinarios en el laboratorio como en estudios epidemiológicos^{16,17,18,19,20}

Teniendo en cuenta que la enfermedad de Chagas constituye uno de los principales problemas de salud en la mayoría de países latinoamericanos por causar infección grave en niños, incapacidad en adultos y potencialmente la muerte súbita y que en la zona norte del Perú se desconoce su real magnitud siendo necesario contar con una técnica de diagnóstico confiable, asimismo, que no se han propuesto trabajos de investigación con antígenos de poblaciones procedentes de esta zona, se propuso una investigación dirigida a responder la siguiente interrogante: ¿cuáles son los pesos moleculares, en Kilodaltons, de los antígenos de excreción-secreción de los tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* obtenidos por metaciclogenesis de epimastigotas cultivados a partir de tripomastigotas metacíclicos de *Panstrongylus chinai* naturalmente infectados en el valle Chamán, La Libertad, detectados por la técnica de Western blot utilizando sueros de pacientes con enfermedad de Chagas confirmada?

MATERIAL Y MÉTODOS

Parásitos:

En el estudio se utilizó una población de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* denominada C1, obtenida a partir de tripomastigotas metacíclicos aislados de excreciones de *Panstrongylus chinai* capturados en el valle de Chamán, ubicado en la provincia de Chepén (La Libertad, Perú) y mantenidos por cultivos sucesivos en medio NNN^{5,12}. Asimismo, nueve ejemplares machos de dos meses de edad de *Mus musculus* BALB/c adquiridos en el Instituto Nacional de Salud y criados en condiciones de seguridad alimentaria y en jaulas diseñadas para tal fin^{11,19}

Sueros:

Se han utilizado sueros de pacientes confirmados con: la enfermedad de Chagas, toxoplasmosis, cisticercosis, hidatidosis y leishmaniosis, proporcionados por el Instituto Nacional de Salud (Lima Perú) y un suero de un recién nacido, natural de Trujillo (Perú) proporcionado por el Laboratorio de Análisis Clínicos ESCALABS, para ser usado como control negativo.

Obtención de tripomastigotes de *T. cruzi*

Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*

Las formas epimastigotes C1 de *T. cruzi* proporcionados fueron cultivadas en 20 tubos de 25x150mm, estériles, con medio bifásico constituido por BHI, fase sólida (10mL), y PYLB fase líquida (7mL). La siembra se hizo a partir de dos tubos procedentes del mantenimiento de la cepa, a razón de 0.5 mL por tubo.

Previamente, se realizó el recuento de los parásitos inmersos en 1mL de inóculo que se sembró, utilizando una cámara hemocitométrica de Neubauer. El lote de cultivo fue dejado a temperatura ambiente (22 ± 4 °C) durante 15 días, para lograr el nivel máximo de replicación de epimastigotes.

Inducción de la Metaciclogenesi*s in vitro* de *T. cruzi*^{21,22}

A partir de un lote, después de 15 días, se extrajeron los medios líquidos en tubos estériles de 13x100mm., tratando de retirar los parásitos confinados en la base del tubo, para luego centrifugarlos a 4000 rpm por 5 min. Inmediatamente después, se descartó el sobrenadante de cada tubo y los precipitados se reagruparon en un solo tubo hasta formar aprox. 2mL.

Se realizaron dos procesos de lavado con PBS 1x estéril, para lo cual se agregó al tubo resultante 4 o 5 ml. de PBS utilizando un gotero estéril, haciendo que la biomasa se resuspenda y entonces nuevamente ser centrifugado a 4000 rpm por 5 min (repetir una vez más), con la finalidad de eliminar residuos del medio de cultivo de proliferación. Para realizar un tercer lavado el PBS estéril fue aditivado con Penicilina G sódica 1 000 000 UI (0.5 mL/100mL) y Gentamicina 160 mg (0.25mL/100mL).

Los epimastigotes lavados fueron transferidos al medio de transformación Grace's Insect Medium SIGMA®, pero previamente fueron sometidos a un cuarto lavado con el medio a experimentar de la misma manera que el primer lavado y también fueron evaluados en vitalidad y cantidad mediante recuento en cámara de Neubauer, extrayendo una gota de la suspensión.

Finalmente, se acondicionaron 4 o 5 tubos de 13x100mm provistos con tapones de jebes estériles, para repartir equitativamente el volumen de pellet obtenido y añadirle seguidamente Grace's Insect Medium en proporción 1:5. Se suplementó el medio con Suero Bovino Fetal al 20% y aditivado con antibióticos convenientes: Penicilina G sódica 1 000 000 UI (0.5 mL/100mL) y Gentamicina 160mg (0.25mL/100mL).

Los tubos resultantes fueron dejados a temperatura ambiente y en cámara oscura durante 140 horas. Transcurrido este periodo se realizó la verificación de la presencia de tripomastigotes y de los especímenes no transformados totalmente, mediante observación directa sobre lamina en microscopio o usando cámara de Neubauer. La muestra extraída también se utilizó para realizar coloraciones, utilizando colorante Wright y así confirmar la existencia de tripomastigotes y calcular un porcentaje de transformación según el campo de observación.

Para verificar la patogenicidad se realizaron inoculaciones progresivas de los parásitos transformados, a ratones *Mus musculus* BALB/C machos, de 21 días de nacidos, vía intraperitoneal. La evaluación de la patogenicidad se realizó a partir de los 25 días post-inoculación por observación de signos como erizamiento del pelo, caída del tren posterior, incontinencia urinaria y agrandamiento del hígado y bazo¹⁰

Obtención de antígenos excreción/secreción de tripomastigotes *T. cruzi*¹⁹

Cultivo de tripomastigotes *T. cruzi*

Cumplidas 140 horas, se centrifugaron los tubos de transformación a 4000 rpm por 5 min, y se descartaron los sobrenadantes. Posteriormente para depurar residuos del medio anterior, los sedimentos fueron lavados en PBS 1x estéril, una vez y finalmente en Eagle's Minimum Essential Medium SIGMA® (MEM), centrifugándolos a 4000 rpm por 5 minutos. La biomasa de tripomastigotes reagrupados fueron traspasados a un solo tubo de 13x100mm., nuevo y estéril, provisto con tapón de jebes estéril, con Minimum Essential Medium Eagle (MEM) en proporción 1:3 y aditivado con Penicilina G sódica 1 000 000 UI (0.5 mL/100mL) y Gentamicina 160 mg (0.25mL/100mL), a 37°C durante 20 horas.

Cumplido el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 4000 rpm por 5 min para separar los antígenos de excreción-secreción producidos, presentes en el sobrenadante, los cuales serán almacenados en tubos Eppendorf a -20°C debidamente rotulados. Según disponibilidad, previamente se añadieron inhibidores de proteasas⁽²⁷⁾.

Determinación de la concentración de proteínas²²

Para determinar la concentración de proteína total, presente en el volumen de antígeno producido, se hizo necesaria la preparación de una curva de calibración, empleando una proteína patrón, que generalmente suele ser seroalbúmina bovina diluidas convencionalmente en solución salina. Siendo así, la concentración de antígenos de excreción-secreción se determinó usando el método colorimétrico de Bradford y mediante el análisis espectrofotométrico⁽²⁶⁾.

El análisis espectrofotométrico se realizó en un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Genesys 10Bio. Se calibró el blanco de agua destilada estéril. Posteriormente se obtuvo la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm (DO 260 / 280) para determinar la calidad.

Identificación de antígenos por electroinmuno-transferencia

Se hizo siguiendo el protocolo establecido en el Lab. ESCALABS, en concordancia con trabajos previos²³, con las siguientes particularidades: cada suero fue preparado a la dilución 1/50 en PBS-TWEEN®20, se conformó un "pool" de sueros de pacientes que presenten *T. cruzi* en sangre; otro "pool" de sueros de pacientes parasitosis diversas e independientemente toxoplasmosis, leishmaniosis; y sueros de recién nacidos como control negativo. Se colocaron 500uL de la solución bloqueadora preparada previamente y 10uL de los sueros previstos, en cada uno de los canales de ensayo. Las tiras de nitrocelulosa con los antígenos de excreción-secreción, fueron enumeradas en orden progresivo y colocadas en placas, las mismas que fueron incubadas durante 1 hora con agitación constante. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-TWEEN®20; a temperatura ambiente, todas durante 5 mins. y con agitación constante.

Evaluación y determinación de los pesos moleculares de los antígenos de excreción-secreción de tripomastigotes²³

La determinación de los pesos moleculares de los antígenos de excreción-secreción de tripomastigotes de *T. cruzi* se realizó de acuerdo a lo propuesto anmidiendo la distancia recorrida de las bandas de bajo peso y relacionándolas con marcadores de bajo peso molecular conocido, de igual manera para las bandas de mediano y alto peso molecular; para lo cual fue necesario encontrar la movilidad relativa (RF) del marcador y de los antígenos en estudio.

RESULTADOS

Se encontró que para una adecuada transformación de los epimastigotas a tripomastigotas en medio Grace's Insect debió utilizarse una población de aproximadamente 9×10^7 epimastigotes/mL, logrando una metacicloogénesis (Fig. 1) del 60% durante 140 horas a temperatura ambiente (22 ± 4 °C).



Fig. 1. Formas intermedias de *Trypanosoma cruzi*: con kinetoplasto posterior al núcleo (izquierda, coloración Wrigth), con cuerpo estilizado y membrana ondulante desarrollada (derecha, coloración Giemsa) x 1000A.

Se encontró 24 bandas antigénicas: 13.8, 14.7, 17.8, 19.6, 20.1, 22.9, 23.1, 25.0, 26.0, 30.0, 31.6, 32.5, 33.0, 34.0, 35.5, 36.0, 39.8, 42.7, 46.5, 57.5, 69.4, 76.1, 90.5, 97.4 KDa, con dos grupos de mayor reactividad: 21 a 31 KDa y de 45 a 100 KDa (Fig. 2)

Cuando se evaluaron las tiras individuales con TESA frente a pool de sueros de pacientes con Toxoplasmosis, Hidatidosis, Fasciolosis, Cisticercosis, Leishmaniosis, además de un pool de sueros positivos a la Enfermedad de Chagas procedente de zona endémica Boliviana; y sus respectivos controles positivo (C+) y negativo (C-), se encontró que una banda de bajo peso molecular 43.7 KDa, tiene reacción cruzada frente al pool de Toxoplasmosis y con menor intensidad frente al pool de Leishmaniosis (Fig. 3).

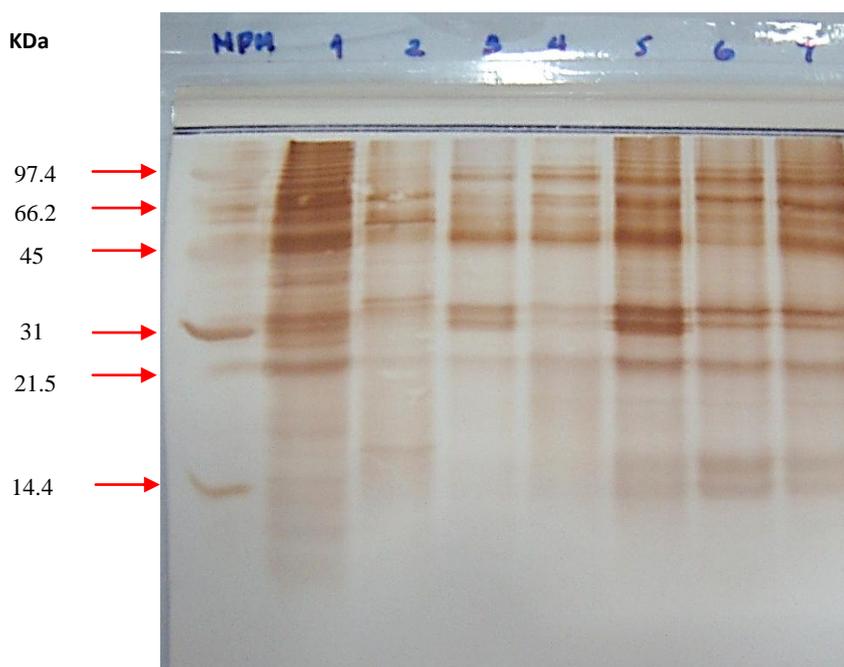


Fig. 2. Bandas reactivas resultados del Western blot de los antígenos de excreción-secreción de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, obtenidos por metaciclógenosis de epimastigotas cultivadas en BHI a partir de tripomastigotas metacíclicos aislados de *Panstrongylus chinai* parasitados naturalmente en el valle Chamán (La LIObertad, Perú) MPM: marcador de peso molecular. Canal 1: Antígenos de excreción/secreción de epimastigotas (ESEA) de la cepa C1 de *T. cruzi*. Canales 2,3,4: Antígenos de excreción/secreción de tripomastigotas (TESA) de la cepa C1 de *T. cruzi*, obtenidos a 37°C. Canales 5,6,7: Antígenos de excreción/secreción de tripomastigotas (TESA) de la cepa C1 de *T. cruzi*, obtenidos a T° ambiente, reconocidos por Electroinmunotransferencia, usando un pool de sueros positivos a la enfermedad de Chagas.

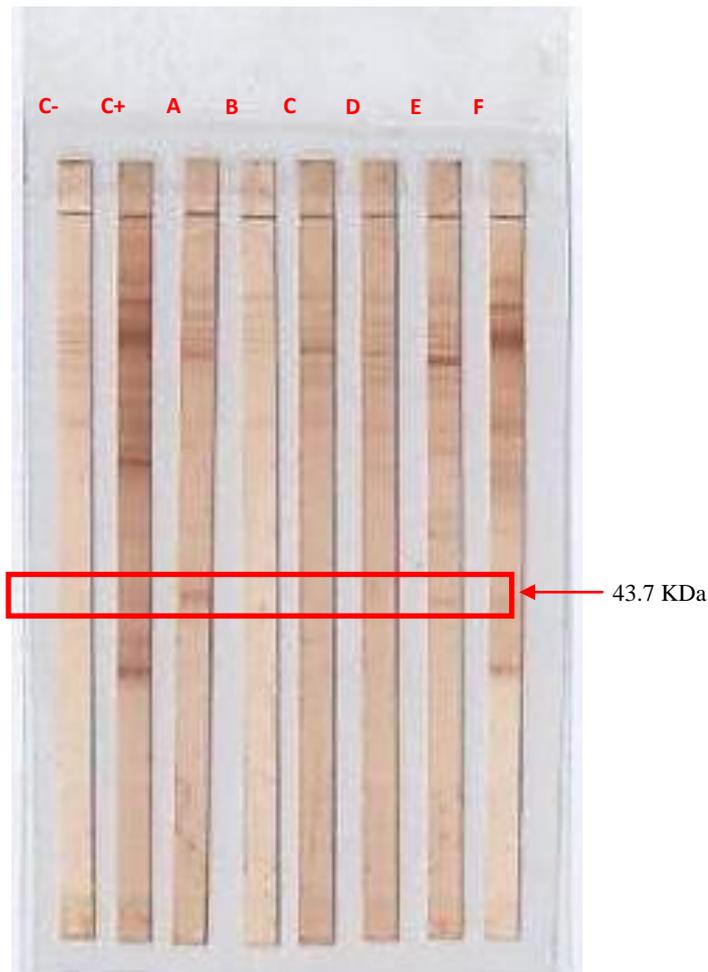


Fig. 3. Bandas reactivas antigénicas de tripomastigotes (TESA) de la cepa C1 de *Trypanosoma cruzi*, reconocidos por Electroinmunotransferencia, usando: C-: control negativo (sueros de RN), C+: control positivo sueros positivos a Enfermedad de Chagas; y pool de sueros positivos a: A) Toxoplasmosis. B) Hidatidosis. C) Fasciolosis. D) Cisticercosis. E) Leishmaniosis. F) Enfermedad de Chagas (suero procedente de Bolivia)

DISCUSIÓN

La diferenciación in vitro se llevó a cabo utilizando medio Grace, estandarizando niveles de temperatura y tiempo óptimos, logrando más del 60% de tripomastigotas metacíclicos; sin embargo, para alcanzar mayor cantidad de tripomastigotas, la implementación de algún sustrato de calidad, permitiría simular aún más las condiciones internas del vector, tal como se observó en el medio bifásico de proliferación (BHI), utilizado previo a la diferenciación^{17,18}.

In vitro, los epimastigotes que están próximos a culminar la diferenciación a tripomastigotes metacíclicos, por su comportamiento fisiológico, se desprenden del sustrato (paredes del tubo) y permanecen en el sobrenadante, mientras que los parásitos aún en transformación pueden permanecer adheridos a las paredes del tubo de cultivo; durante el proceso de transformación, la adhesión a algún sustrato está ligado al estrés nutricional, ya que las proteínas acumuladas en los reservosomas son usados como reserva de energía. Así, existe una estrecha relación entre el estrés nutricional, la endocitosis previa de nutrientes, la adhesión al sustrato y el porcentaje de tripomastigotas metacíclicos resultantes^{3,18}.

Si bien es cierto, el medio Grace's Insect por su carácter líquido, resultó ser buena elección para el análisis cuantitativo, permitiendo el aislamiento de formas metacíclicas sometidas a la diferenciación; este necesita suplementos para alcanzar altos porcentajes de transformación, tales como los homogenizados de vectores, adición de hemina, suero bovino fetal, incluso ajustes de pH^{20,21}.

El perfil antigénico de los TESA reveló la presencia de 24 componentes antigénicos, aspecto que pareciera demasiado número de bandas, sin embargo, debe tenerse en cuenta que todos están dentro del rango de bajo peso molecular que son los que tienen validez diagnóstica²³, asimismo debe considerarse que hay factores que influyen en el corrido, por eso algunos autores, con poblaciones de otros lugares han detectado bandas de peso moleculares ligeramente superiores a 100, pero también las halladas en el presente trabajo^{17,19,20,21}. También hay que atender al hecho de que *T. cruzi* en realidad está conformado por un conjunto de poblaciones, tanto así, que algunos consideran que se trata de un complejo de especies dada la gran variabilidad antigénica y patogénica hallada, de modo que se han clasificado en los llamados biodemas^{1,2,3,10}.

Un aspecto importante es señalar que dentro de todas las bandas reactivas, claramente existen dos grupos de bandas reactivas y en una de ellas, la de bajo peso molecular se ubican las de 13.8 y 14.7, particulares de tripomastigotes, por lo que son las que podrían usarse en pruebas de diagnóstico, aspecto que resulta de suma importancia porque son precisamente los tripomastigotas los que producen la dolencia chagásica^{1,2,3}; al mismo tiempo, las bandas de 20.1, 31.6 y 32.5 KDa mostraron ser las más reactivas porque aparecen reveladas con mayor intensidad

Los antígenos de excreción/secreción de tripomastigotas (TESA) de *T. cruzi*, han sido recientemente reconocidas como transalidasas: estas enzimas pueden ser factores de virulencia, y participar en la unión al epitelio no infectado, fibroblastos, y líneas de células musculares de mamíferos; son inmunógenos fuertes que provocan respuestas de anticuerpos policlonales y están implicados en la inducción de la inflamación y la autoinmunidad^{17,24}.

La reactividad cruzada con el género *Leishmania* es una desventaja importante de las técnicas serológicas convencionales para el diagnóstico de *T. cruzi*, ya que comparten formas evolutivas, los hábitos sanguíneos en el huésped y pertenecen al mismo orden, Kinetoplastidae. Adicionalmente el género *Toxoplasma* también comparte los mismos hábitos sanguíneos en el huésped, y en estudios recientes utilizando la técnica de Electroinmunotransferencia para IgG anti-*Toxoplasma*, han mostrado que la presencia de bandas de 25, 22 y 69 kDa son útiles para predecir la aparición de una Toxoplasmosis Cefalica²⁵.

En este trabajo se encontró solo una banda de 43.7 KDa, con presumible reacción cruzada al enfrentar los TESA frente a un pool de sueros de pacientes positivos a Toxoplasmosis y a otro de Leishmaniosis. En otro estudio las bandas reconocidas por los sueros de los pacientes con Leishmaniosis cutánea americana, leishmaniasis mucocutánea, y VL utilizando antígenos homólogos y heterólogos de *T. cruzi*, arrojaron reactividad cruzada no mayor de cuatro bandas; en otro estudio se encontró que 12 de 45 de los sueros de pacientes con Leishmaniosis ensayados exhibieron un patrón de reactividad a *T. cruzi* similar a la de los sueros chagásicos, reconociendo bandas de 131, 125, 116, 111, 51-45 y 43 kD. Por otra parte, estos sueros con *Leishmania mexicana* exhibieron un patrón similar a la de los sueros de pacientes chagásicos, estos sueros procedían de la provincia de Salta (Argentina), donde hay solapamiento de áreas endémicas de leishmaniasis y tripanosomiasis. Esto sería compatible con la presencia de una infección mixta^{25,26}.

En líneas generales el uso de los TESA para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, ha proporcionado buenos resultados en términos de especificidad y sensibilidad. Sin embargo, la mayoría de los estudios han probado un número relativamente pequeño de muestras, y algunos han utilizado proteínas TESA a partir de una única cepa^{22,23}. Es así que el presente estudio, donde se utilizó un pequeño panel de sueros bien definidos para evaluar los TESA de poblaciones de tripanosomas de una región no endémica del Perú (Chepén) revela su probable utilidad en investigaciones epidemiológicas o de diagnóstico laboratorial rutinario; sin embargo, deben proponerse nuevas investigaciones con tripanosomas de otros valles del norte y del sur a fin de determinar si las mismas bandas se presentan por igual, asimismo, sería conveniente hacer las investigaciones con tripomastigotas sanguíneos, que son los realmente están en contacto con el huésped.

CONCLUSIÓN

- El perfil antigénico de los antígenos de excreción/secreción de tripomastigotes (TESA) de *Trypanosoma cruzi* obtenidos por emtaciclogénesis de epimastigotas cultivados en BHI a partir de tripomastigotas metacíclicos aislados de *Panstrongylus chinai* parasitado naturalmente en Chamán (Chepén, La Libertad, Perú) está compuesto por 24 bandas, en un rango de 100 KDa a 10 KDa, de las cuales las de 13.8 y 14.7 KDa no se presentan en epimastigotas de la misma población y la de 43.7 cruza con sueros de pacientes con leishmaniasis y toxoplasmosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Carod-Artal FJ, Gascon J. Chagas disease and stroke. *Lancet Neurol* 2010; 9:533-542
2. Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Dereloux M, et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:556-570
3. Nuns MPC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am College Cardiol* 2013; 62(9):767-776
4. Cuba CCA, Abad-Franch F, Roldan RJ, Vargas VF, et al. The triatomines of Northern Peru, with emphasis on the ecology and infection by tripanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(2): 175-183
5. Jara CA. Características de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la costa norte del Perú. *SCIENDO* 2007, 9(1): 88-110
6. Bayer AM, Hunter GC, Gilman RH, Cornejo del Carpio JG, et al. Chagas disease, migration and community settlement patterns in Arequipa, Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3(2): e567
7. Delgado S, Castillo-Neyra R, Quispe-Machaca VR, Ancca-Suarez J; et al. A history of Chagas disease transmission, control and reemergence in peri-rural La Joya, Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(2): e970
8. Hunter GC, Barrioni-Mayori K, Ancca-Juarez J, Castillo-Neyra R, et al. A field of alternative targeted screening strategies for Chagas disease in Arequipa, Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(1): e1468
9. Solís H, Huamán A, Ferrer A, Tarqui K, et al. Comunicación preliminar sobre la presencia de *Trypanosoma cruzi* en departamentos del norte y nororiente del Perú. *An Fac med* 2012; 73(1): 43-46
10. Díaz-Limay E, Escalante H, Jara CA. Niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas en *Mus musculus* BALB/c infectado con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Panstrongylus chinai* del valle Chaman, La Libertad, Peru. *Parasitol Latinoam* 2004; 59: 153-158
11. Vega CS, Náquira VC. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas). *Inst Nac de Salud*. Lima. Perú. 2006.
12. Luquetti AO, Schnmunis GA. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. En: Telleria & Tibayrenc (eds.), *American Trypanosomiasis, Chagas Disease: One hundred years of research*. Amsterdam: ELSEVIER, 210; 744-792
13. Brasil PE, Del Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LCH, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Inf Dis* 2010; 10: 337
14. De Souza M, Amato Neto V. Discrepancies and consequences of indirect haemagglutination, indirect immunofluorescent and ELISA tests for the diagnosis of Chagas disease. *Rev. Inst. Med Trop Sao Paulo* 2012; 54(3): 141-143
15. Moncayo A, Silveira AC. Current trends and future prospects for control of Chagas Disease. En: Telleria & Tibayrenc (eds.). *American Trypanosomiasis, Chagas Disease: One hundred years of research*. Amsterdam: ELSEVIER 2010; 55-82
16. Nakasawa M, Rosa DS, Pereira URA, Moura MO: Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas disease. *Clin Diag Lab Immunol* 2001; 8(5): 1024-1027
17. Silva AG, Silveira-Lacerda P, Cuhna-Junior JP, de Souza MA, Junior SF. Immunoblotting analyses using two-dimensional gel electrophoresis of *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37(6): 454-459.
18. Silverman JS, Bangs JD. Form and function in the trypanosomal secretory pathway. *Curr Opin Microbiol* 2012; 15: 463-468
19. Frade AF, Luquetti AO, Prata A, Ferreira AW. Western blotting method (TESAcruzi) as a supplemental test for confirming the presence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in finger prick blood samples from children aged 0-5 years in Brazil. *Acta Tropica* 2011; 117: 10-13
20. Zarate-Blades CR, Blades N, Nascimento MS, Silveira JF, et al. Diagnostic performance of tests based on *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens in an endemic area for Chagas disease in Bolivia. *Diag Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 229-232.

21. Reiche E, Cabazzana M, Okamura E. Evaluation of the Western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas disease: Hospital Estatal de Londina, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59(5): 750-756
22. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72(1): 248-254
23. Chávez F, Vásquez O, Escalante H. Evaluación de la técnica Western blot para la detección de antígenos de *Hymenolepis nana*. *Rev Perú Biol* 2006; 14(2): 283-286.
24. Silveira E, Gómez A, Souza M, Arantes S, et al. Immunoblot usando TESA (Trypomastigote excreted-secreted antigen) de *T.cruzi* en muestras inclusivas de donadores de sangre en el hemocentro de Uberlandia. São Paulo, Brasil. *J Brasileiro Patol* 2001; 37: 111.
25. Malchiodi L, Chiaramonte M, Taranto N, Zwirner N, Margni R. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). *Rev Clin Exp Immunol* 1994; 97(1): 417-423
26. Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, et al. Identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012. 86(3):412-6.