

Caracterización antigénica de dos cepas mexicanas de *Tripanosoma cruzi* en electroforesis en gel de poliacrilamida y uso como fuente de antígeno en diagnóstico

VICTOR MANUEL MONTEON-PADILLA, JOSE LUIS BAÑALES y PEDRO ANTONIO REYES-LÓPEZ

Laboratorio de Inmunología
Instituto Nacional de Cardiología
Juan Badiano No. 1
Col. Sección 16, Tlalpan
14080 México, D.F.

MONTEÓN-PADILLA, V.M., J.L. BAÑALES y P.A. REYES-LÓPEZ, 1991. Caracterización antigénica de dos cepas mexicanas de *Tripanosoma cruzi* en electroforesis en gel de poliacrilamida y su uso como fuente de antígeno en diagnóstico. *An. Esc. nac. Cienc. biol., Méx.* 34: 51-55.

RESUMEN: En este trabajo se analizan dos cepas mexicanas de *T. cruzi* (Cocula y Ninoa) por electroforesis en gel de poliacrilamida, así como también su empleo como fuente de antígeno en una prueba diagnóstica (ELISA), observando que, a pesar de existir diferencias en los patrones electroforéticos, no existen diferencias cuando son utilizados como antígenos para reconocer sueros de individuos chagásicos, por lo cual pueden utilizarse indistintamente cualquiera de las dos cepas como fuente de antígeno en una prueba diagnóstica.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es un padecimiento que se adquiere por un protozooario hemoflagelado, el *Tripanosoma cruzi*.¹ Esta enfermedad afecta principalmente a la población rural de los distintos estados de la república.⁶ En nuestro país existe poca información respecto al análisis de los componentes proteicos de las diferentes cepas que se han venido aislando en las distintas entidades, así como se conoce poco la implicación que pudiera tener el empleo de estas cepas en fines diagnósticos. Ya que la constitución antigénica de una cepa aislada es diferente en distintas zonas geográficas, pudiera repercutir en la especificidad de la respuesta inmune montada por individuos infectados de distintas zonas geográficas.^{4,5}

El objetivo que perseguimos con este trabajo es ver si existen diferencias entre dos cepas mexicanas de *T. cruzi* en su contenido proteico al analizarse en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), así como también probar si el empleo de estos antígenos en un método diagnóstico sensible, como lo es el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA), permite observar diferencias de reactividad en una población de individuos chagásicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon dos cepas mexicanas de *T. cruzi*; la cepa Cocula y la cepa Ninoa (aisladas de Guerrero y Oaxaca, respectivamente). Se propagaron en medio infusión cerebro corazón (BHI), cosechándose en la fase logarítmica de su crecimiento. Una vez cosechados, los parásitos se lavaron 3 veces en PBS (amortiguador de fosfato salino pH 7.2 0.01 M) a 2,000 g durante 15' a 4°C, después del último lavado al paquete se resuspendió en una solución de inhibidores de proteasas (PMSF, ácido E aminocaproico y etilendiamina tetra acético a 10 mM), acto seguido se procedió a sonicar la suspensión de parásitos por periodos de 15 segundos en cama de hielo, este paso se repitió de 5 a 6 veces, se consideró terminado el proceso cuando en observación microscópica no existían parásitos en la suspensión. La suspensión se centrifugó a 15,000 g durante 30 min. a 4°C para separar los restos celulares insolubles, obteniéndose así soluciones de antígenos de *T. cruzi*.

A esta fracción soluble se le determinaron proteínas por el método de Lowry.³ Una vez conocida la concentración proteica del antígeno, se guarda en alícuotas pequeñas a -70°C hasta el momento de su uso.

El análisis electroforético de la mezcla de antígenos solubles de *T. cruzi* se realizó en un aparato *Mini-Protean II* utilizado el sistema descrito por Laemmli.²

El gel concentrador se preparó al 4%, mientras que el gel separador lo utilizamos al 10%. La concentración de los diferentes antígenos por carril fue de 100 µg, los cuales se corrieron a 200 volts durante 40 minutos. La corrida se realizó tanto en condiciones reducidas como no reducidas. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassi (0.12%) para visualizar las bandas de polipéptidos de cada mezcla de antígenos.

El ensayo inmunoenzimático (ELISA) se realizó de acuerdo al descrito por Voller.⁷ La sensibilización de los pozos fue con 10 µg de Ag/ml. Se probaron 15 sueros de individuos chagásicos diluidos 1:200, en PSB-tween 0.05% y albúmina bovina 1%; el conjugado empleado fue una anti-IgG humana fosfatasa; los tiempos de incubación para el primer y segundo anticuerpo fueron de una hora a 37°C.

RESULTADOS

Al realizar la electroforesis de las dos cepas de *T. cruzi* en geles de poliacrilamida en condiciones no reducidas, se observó el mismo número de bandas para cada una de ellas obteniéndose una mayor intensidad de una de las bandas en la cepa Cocula (Fig. 1).

Cuando la electroforesis se realizó en condiciones reducidas, el número de bandas no compatibles entre cada una de las cepas aumentó, compartiéndose 16 de ellas (Fig. 2).

Estos resultados prueban las diferencias que existen entre dos cepas del parásito *T. cruzi* aisladas de dos estados vecinos; para probar si estas diferencias podrían afectar la intensidad de reacción de los sueros de individuos chagásicos frente a los antígenos de estas dos cepas, se realizó la prueba de ELISA no encontrándose diferencias significativas (Tabla 1).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El análisis electroforético de la fracción soluble de los antígenos de dos cepas de *T. cruzi* en geles de poliacrilamida en condiciones no reducidas, tan sólo permitió observar

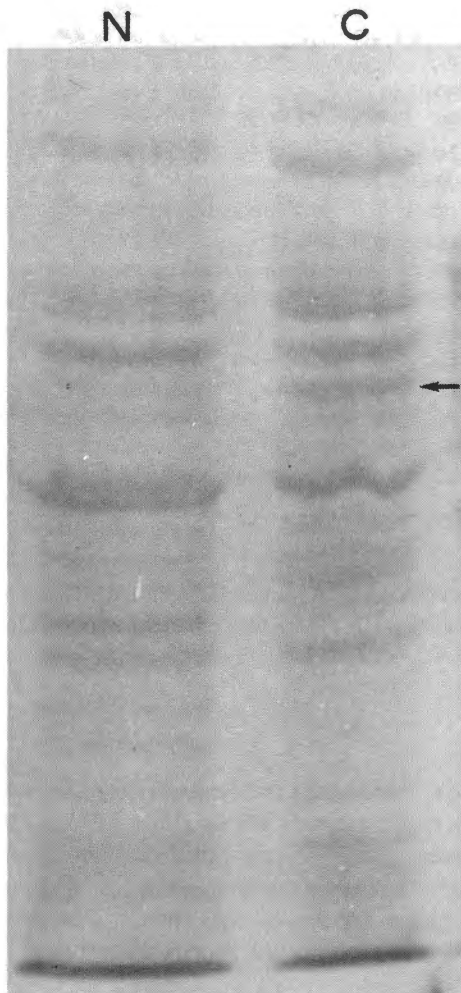


FIG. 1. Patrón electroforético de dos cepas de *T. cruzi* en SDS-PAGE al 10% en condiciones no reducidas. (N, cepa Ninoia; C, cepa Cocula). La flecha indica una banda de diferente intensidad entre ambas cepas.

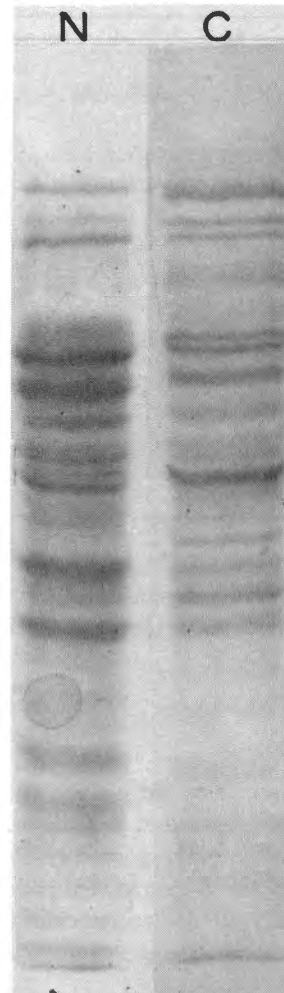


FIG. 2. Patrón electroforético de dos cepas de *T. cruzi* en SDS-PAGE al 10% en condiciones reducidas. (N, cepa Ninoia; C, cepa Cocula). Aquí es posible observar diferencias entre los dos patrones de ambas cepas.

TABLA 1. La prueba de ELISA empleando dos fuentes diferentes de antígenos de *T. cruzi*.

SUERO	COCULA	NINOA
1	*1.86	1.83
2	1.80	1.70
3	1.89	1.62
4	1.24	1.20
5	1.93	1.90
6	1.10	0.64
7	1.88	1.87
8	1.95	1.89
9	1.85	1.35
10	1.90	1.89
11	0.80	0.90
12	1.90	1.89
13	1.92	1.95
14	1.60	1.81
15	1.72	1.99

* D.O. a 405 nm

Al realizar la prueba de ELISA con 15 sueros de individuos chagásicos fue indistinto utilizar cualquiera de las fuentes de antígeno para obtener positividad de la prueba. (El valor de corte es 0.50 de D.O. a 405 nm.)

diferencia en intensidad en una de las bandas; mientras que al realizar el ensayo en condiciones reducidas, se pudo ver un patrón diferente entre cada una de ellas. Estas diferencias, sin embargo, no resultan ser importantes cuando se emplean como antígenos en diagnóstico, por lo cual podemos inferir que los antígenos comunes entre esas dos cepas de *T. cruzi* son reconocidas igualmente por cualquier individuo chagásico, lo cual permite utilizar cualquiera de ellas como fuente de antígeno en una prueba diagnóstica.

SUMMARY

We analyzed, by SDS-PAGE, soluble antigenic extracts of two Mexican strains of *T. cruzi*, (Ninoa's and Cocula's strain). Their electrophoretic patterns were compared. There are differences between them, at equal protein concentration Cocula's strain showed 10 polypeptide bands not matched by the electrophoretic pattern characteristic of Ninoa's strain. However, an ELISA test using these soluble extracts, did not show differences when 15 Chagasic sera were tested. Therefore, although antigenic use, extracts can be prepared from any strain for diagnostic use, the different electrophoretic pattern between strains could be related to biological variation, its significance needs to be studied.

BIBLIOGRAFÍA

1. CHAGAS, C., 1909. Nova Trypanopanosomiase humana. Estado sobre a morfologia e u ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. g. n. sp. agente etiologico de nova entida de morbida do homem. *Mem Inst. O. Cruz* 1: 159-218.
2. LAEMMLI, F.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
3. LOWRY, O. N. ROSEBROUGH, A. FARR and R. RANDALL, 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-271.
4. PESTMAN, M., J. DVORAK and J. M. DANIEL, 1983. Studie of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I.- A comparison of the course of infection of C3H/HEN mice with two clones isolated from a common source. *A.J. Trop. Med. Hyg.* 32: 497-506.
5. PRATA, A., 1986. Significance of *Trypanosoma cruzi* differentiation and selection relationship with clinical and epidemiological varieties. *Rev. Fac. Bras. Med. Trop.* 18: (suplemente) 9-16.
6. TAY, J., P.M.S. SALAZAR, M.I. BUCIO, R. ZATE y L. ZÁRATE, 1980. La enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Salud Pública, Méx.* 221: 409-450.
7. VOLLER, A., C. DRAPER and A. BARTLETT, 1975. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for chagas' disease. *Lancet* i: 426-428.