

EVALUACIÓN DE LA APLICABILIDAD DE UNA PRUEBA DE PCR PARA LA
DETECCION DE *Trypanosoma cruzi* EN TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA



DIANA PATRICIA CLAVIJO CASTRO
PAOLA ANDREA TOVAR ESPINOSA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ
2008

EVALUACIÓN DE LA APLICABILIDAD DE UNA PRUEBA DE PCR PARA LA
DETECCION DE *Trypanosoma cruzi* EN TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA



Diana Patricia Clavijo Castro
Paola Andrea Tovar Espinosa

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de
BACTERIÓLOGO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ
2008

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución No. 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario a la moral católica y porque la tesis no tenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ella el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Resumen

El *Trypanosoma cruzi*, protozoo flagelado causante de la enfermedad de Chagas, es transmitido por insectos vectores de la subfamilia *Triatominae*. Según estudios realizados se estima que alrededor de 15 millones de latinoamericanos desde el sur oeste de Argentina hasta el sur de los Estados Unidos se encuentran infectados y cerca de 28 millones están en alto riesgo de adquirir la infección, presentándose 12.500 muertes anuales y 41.200 nuevos casos en los 21 países afectados **(OMS, 2007)**

Actualmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene un gran valor en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas ya que posee una alta sensibilidad y especificidad permitiendo un oportuno diagnóstico de la enfermedad en cualquiera de sus etapas **(Gomes et al. 1999)**.

Por otra parte, el análisis de los ácidos nucleicos se ha convertido en una herramienta importante en el diagnóstico e investigación en patología molecular. El material comúnmente analizado en los laboratorios de esta disciplina es el tejido incluido en parafina **(Armas et al. 2006)**. Método que presenta gran facilidad en cuanto a su procesamiento, almacenamiento y transporte. Así mismo los tejidos embebidos en parafina son de gran valor en el diagnóstico histopatológico al preservar la arquitectura y proteínas propias del tejido **(Zafra et al. 2004)**.

Por lo anterior, en este trabajo se evaluó la aplicabilidad de las pruebas de PCR basadas en los iniciadores TcH2AF/R que amplifican un fragmento de 230 pb de la región 3' no codificante de la unidad H2A y S35/S36 los cuáles amplifican los minicirculos del cinetoplasto (ADNk) del parásito, para la detección de *T. cruzi* en tejidos incluidos en parafina.

Para ello, se emplearon 5 ratones del linaje ICR de 23 días de edad, de los cuales 4 fueron inoculados por vía intraperitoneal con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A y 1 sin inocular, fue usado como control negativo. A todos los animales se les hizo seguimiento de parasitemias cada 2 días por el método de microhematocrito, coloración de Giemsa y observación directa al microscopio. Cumplido los 30 días post-infección, los ratones fueron disectados, extrayéndose diferentes órganos como hígado, cerebro, intestino grueso, bazo, músculo esquelético para análisis histopatológico y el corazón para PCR y análisis histopatológico. Este último fue fragmentado en las fracciones apical, derecha e izquierda para realizar la extracción de ADN por medio de los métodos de lisis alcalina y triple fenol-cloroformo-alcohol isoamílico; encontrándose excelente resultados con ambas pruebas de PCR (TcH2AF/R y S35/S36) luego de la extracción del ADN por el método de triple fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Parte de los tejidos fueron incluidos en parafina, y tras ensayar distintos métodos de desparafinación, se seleccionó el método de Xileno/Etanol, con el cual se logró la desparafinación total de los tejidos. Para la extracción del ADN de estos tejidos desparafinados, se empleó el método de Salting Out, obteniéndose buenos resultados.

Para evidenciar la presencia del parásito en tejido fresco e incluido en parafina, se utilizó la prueba de PCR con los iniciadores TcH2AF/R y S35/S36. En el caso de los tejidos frescos hubo amplificación con ambas pruebas de PCR; mientras que en los tejidos desparafinados solo fue posible detectar la presencia del parásito mediante la prueba de PCR S35/S36; llegando así a la conclusión que la prueba de PCR S35/S36 puede ser aplicada para la detección del parásito en sangre, tejido fresco y tejido parafinado.

DEDICATORIA

Queremos manifestar en este trabajo con un mayor agradecimiento

A la Dra. Concepción Puerta nuestra directora y a la Dra. Paula Pavía nuestra codirectora por habernos brindado comprensión y orientación en este arduo caminar.

A la Dra. Marleny Montilla del grupo de parasitología del Instituto Nacional de Salud, por habernos guiado y entendido durante la ejecución de nuestra parte experimental.

Al grupo de Patología del Instituto Nacional de Salud, por habernos colaborado y destinado tiempo el cual hizo que nuestra investigación fuere exitosa.

Al grupo de Investigación de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana.

A nuestros padres y familiares que siempre nos apoyaron incondicionalmente con cariño y nos ayudaron a abatir cualquier imprevisto que la vida nos ofrece en el camino.

Pero de ninguna manera podemos olvidarnos de

Nuestro Señor Todopoderoso y de la Virgen Santísima que siempre estuvieron con nosotras guiándonos, protegiéndonos e iluminándonos el camino de nuestra carrera.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
1.INTRODUCCION	18
2.JUSTIFICACION	21
3.OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GENERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
4.MARCOTEORICO	24
4.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
4.1.1 CICLO DE VIDA	25
4.1.2 CICLO DE TRANSMISION	27
4.1.2.1 CICLO SILVESTRE	27
4.1.2.2. CICLO DOMÉSTICO	27
4.1.2.3 CICLO PERIDOMÉSTICO	28
4.1.3 HABITAT Y ASOCIACION DE T CRUZI (Z1), T CRUZI (Z2) Y Z3	28
4.2 ENFERMEDAD DE CHAGAS	29
4.2.1 MODOS DE TRANSMISION	31
4.2.1.1 VECTORIAL	31
4.2.1.2 PARENTERAL	31
4.2.1.3 CONGENITA	32
4.2.1.4 TRANSPLANTE	32

4.2.1.5	ORAL	32
4.2.2	DIAGNOSTICO	32
4.2.2.1	HALLAZGOS CLINICOS	32
4.2.2.2	HALLAZGOS DE LABORATORIO	33
4.2.2.2.1	TECNICAS PARASITOLOGICAS	34
4.2.2.2.2	METODOS DIRECTOS	34
4.2.2.2.3	METODOS INDIRECTOS	34
4.2.2.2.4	METODOS MOLECULARES	34
4.2.3	TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA	38
4.2.3.1	TIPOS DE FIJADORES	38
4.2.3.2	TECNICAS PARA DESPARAFINACION DE TEJIDOS	39
4.2.3.3	TECNICAS PARA EXTRACCIÓN DE ADN EN TEJIDO INCLUIDO EN PARAFINA	40
5.	MATERIALES Y METODOS	41
5.1	MATERIALES	41
5.1.1	RATONES	41
5.1.2	PARASITOS	41
5.1.3	MUESTRAS DE TEJIDOS DE RATONES INFECTADOS DE ARCHIVO	41
5.2	MÉTODOS	42
5.2.1	INFECCIÓN DE RATONES	42
5.2.1.2	SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN Y DISECCION DE RATONES	42
5.2.1.3	DESPARAFINACION DE LOS TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA	42

5.2.1.4	EXTRACCION DE ADN A PARTIR DE TEJIDO INCLUIDO EN PARAFINA	42
5.2.1.5	EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE TEJIDOS FRESCOS	43
5.2.2	ANÁLISIS DE PCR	43
5.2.2.1	TcH2AF/R	43
5.2.2.2	S35/S36	43
6	DIAGRAMA DE FLUJO	45
7	RESULTADOS	46
7.1	METODO DE DESPARAFINACIÓN	46
7.2	METODO DE EXTRACCION DE ADN TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA	46
7.3	ESTUDIO DE LA INFECCIÓN DE RATONES INFECTADOS CON LA CEPA <i>T. cruzi</i> / MHOM/CO/2001/D. A	46
7.3.1	DETERMINACIÓN DE PARASITEMIAS	46
7.3.2	DETECCIÓN DEL PARÁSITO POR PCR EN SANGRE	49
7.3.2.1	PCR TcH2AF/R	49
7.3.2.2	S35/S36	50
7.3.2.3	COMPARACIÓN DE LAS PARASITEMIAS MEDIANTE MICROHEMATOCRITO Y PCR	51
7.3.3	DETECCIÓN DE LOS PARÁSITOS EN TEJIDO FRESCO	52
7.3.3.1	PCR TcH2AF/R	52
7.3.3.2	PCR S35/S36	53

7.3.4 DETECCIÓN DEL PARÁSITO EN TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA	53
7.3.4.1 PCR TCH2AF/R	53
7.3.4.2 PCR S35/S36	53
7.3.5 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE TEJIDO CARDIACO Y OTROS ÓRGANOS	54
7.3.6 COMPARACIÓN DE TODAS LAS TÉCNICAS PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE <i>T. cruzi</i>	55
7.4 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE ARCHIVO	57
7.4.1 MUESTRAS DE ARCHIVO DE RATONES INFECTADOS CON CEPA <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D. A 30 DÍAS POST-INFECCIÓN	57
7.4.1.1 PCR TCH2AF/R	57
7.4.1.2 PCR S35/S36	57
7.4.2 MUESTRAS DE ARCHIVO DE RATONES INFECTADOS CON CEPA <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D. A 60 DÍAS POST-INFECCIÓN	58
7.4.2.1 PCR TCH2AF/R	58
7.4.2.2 PCR S35/S36	58
7.4.3 MUESTRAS DE ARCHIVO DE RATONES INFECTADOS CON CEPA <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D. A 100 DÍAS POST-INFECCIÓN	59
7.4.3.1 PCR TCH2AF/R	59

7.4.3.2 PCR S35/S36	59
7.4.4 MUESTRAS DE ARCHIVO DE RATONES INFECTADOS CON CEPA <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D. A 150 DÍAS POST-INFECCIÓN	60
7.4.4.1 PCR TCH2AF/R	60
7.4.4.2 PCR S35/S36	60
7.4.5. MUESTRAS DE ARCHIVO DE RATONES INFECTADOS CON CEPA <i>T. cruzi</i> II MHOM/BR/00/Y 30 DÍAS POST-INFECCIÓN	61
7.4.5.1 PCR TCH2AF/R	61
7.4.5.2 PCR S35/S36	61
7.5 COMPARACION DEL ANALISIS HISTOPATOLOGICO Y LA PRUEBA DE PCR CON LOS INICIADORES TCH2AF/R Y S35/S36 PARA DETECTAR <i>T. cruzi</i> EN MUESTRAS DE ARCHIVO	66
8. DISCUSION	68
9. CONCLUSIONES	73
10. RECOMENDACIONES	74
11. REFERENCIAS	75
12. ANEXOS	81

LISTA DE ANEXOS

	Pag
Anexo 1 Infección de los ratones con <i>Trypanosoma cruzi</i>	81
Anexo 2 Microhematocrito	82
Anexo 3 Coloración de giemsa	83
Anexo 4 Disección animales	84
Anexo 5 Corte de tejido cardíaco	85
Anexo 6 Método de desparafinación en Microondas	86
Anexo 7 Desparafinación del tejido con Xileno /Etanol	87
Anexo 8 Lisis de los tejidos desparafinados	88
Anexo 9 Extracción ADN en tejido parafinado Salting Out	89
Anexo 10 Extracción ADN en tejido parafinado Triple Fenol Cloroformo	90
Anexo 11 Extracción ADN lisis alcalina	91
Anexo 12 Iniciadores TcH2AF/R	92
Anexo 13 Electroforesis en gel de agarosa	93
Anexo 14 Iniciadores S35/S36	94

INDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Estádios morfológicos de <i>T. cruzi</i>	25
Figura 2. Ciclo vital de <i>T. cruzi</i>	26
Figura 3. Manifestaciones histopatológicas en las diferentes fases de la enfermedad de Chagas	30
Figura 4. Formas tripomastigotes en frotis de sangre periférica	47
Figura 5. Seguimiento de las parasitemias de los ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D.A	47
Figura 6. Resultados PCR TcH2AF/R en muestras de sangre de ratones infectados con cepa <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D. A	50
Figura 7. Resultados de la PCR S35/S36 en muestras de sangre de ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D. A	51
Figura 8. Control de Inhibición de la PCR TcH2AF/R en tejido Cardíaco de ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D. A	52
Figura 9. Resultados de la PCR S35/S36 en tejidos cardíaco embebido en parafina de ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D. A	54
Figura 10. Hallazgo histopatológico de tejido cardíaco de ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D.A. presencia de formas amantigotas intracelulares. coloración eosina hematoxilina en 100X.	57
Figura 11. Resultados de la PCR S35/S36 en tejidos de archivo de ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D. A, a los 30 días post-infección	58
Figura 12. Resultados de la PCR S35/S36 en tejidos de archivo de ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D. A, a los 60 días post-infección	59

Figura13. Resultados de la PCR S35/S36 en tejidos de archivo de ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D. A, a los 100 días post-infección	60
Figura 14. Resultados de la PCR S35/S36 en tejidos de archivo de ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D. A, a los 150 días post-infección	61
Figura 15. Resultados de la PCR S35/S36 en tejidos de archivo de ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> II MHOM/BR/00/Y a los 30 días post-infección	62
Figura 16. Comparación de los resultados de las PCR TcH2AF/R y S35/S36 y estudio histopatológico en tejidos de archivo de ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D.A	66
Figura 17. Comparación de los resultados de las PCR TcH2AF/R y S35/S36 y estudio histopatológico en tejidos de archivo de ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> II MHOM/BR/00/Y	67

INDICE DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Hábitat del triatomino, hospedero y grupo de <i>T.cruzi</i>	28
Tabla 2. Pruebas de PCR para la detección de <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
Tabla 3. Seguimiento de parasitemias mediante microhematocrito de los ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D.A	48
Tabla 4. Comportamiento de la cepa <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D. A en los ratones infectados	49
Tabla 5. Hallazgos histopatológicos de ratones infectados con la cepa de <i>T.cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D.A	55
Tabla 6. Comparación de todas las técnicas para detectar la presencia de <i>T. cruzi</i> en tejido cardiaco	56
Tabla 7. Resultados de las PCR TcH2AF/R y S35/S36 y estudio histopatológico en tejido de archivo de ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> I MHOM/CO/2001/D.A	63
Tabla 8. Resultados de las PCR TcH2AF/R y S35/S36 y estudio histopatológico en tejido de archivo de ratones infectados con la cepa <i>T. cruzi</i> II MHOM/BR/00/Y 30 días post-infección	65

1. INTRODUCCIÓN

El *Trypanosoma cruzi*, protozoo flagelado causante de la enfermedad de Chagas, es transmitido por insectos vectores de la subfamilia *Triatominae*. Según estudios realizados se estima que alrededor de 15 millones de latinoamericanos desde el sur oeste de Argentina hasta el sur de los Estados Unidos se encuentran infectados y cerca de 28 millones están en alto riesgo de adquirir la infección, presentándose 12.500 muertes anuales y 41.200 nuevos casos en los 21 países afectados **(OMS, 2007)**.

En Colombia se ha estimado que un 5% de la población puede estar infectada y un 23% se encuentra en zonas de alto riesgo. Los departamentos como Arauca con un 21,1%, Casanare 10%, Santander 6,3%, Norte de Santander 5,2%, Boyacá 3,7%, Cundinamarca 1,9% y Meta con 1,7%, se destacan como las principales zonas endémicas del país **(Moncayo, 2003)**.

Por otro lado, la enfermedad de Chagas se caracteriza por presentar tres fases clínicas como son: fase aguda, indeterminada y crónica.

La fase aguda dura de 6 a 8 semanas en ausencia o presencia de síntomas tales como: Signo de Romaña, fiebre, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, algunas veces vómito y diarrea, con presencia de parasitemia evidente **(Coura, 2007)**. Durante esta etapa debido a la elevada parasitemia se emplean técnicas convencionales parasitológicas directas que ayudan en el diagnóstico de la enfermedad, dentro de ellas se encuentran el método de microhematocrito y el método de concentración o Strout, entre otros **(Moncayo, 2003)**.

Posterior a la fase aguda, el paciente permanece con niveles mínimos de parasitemia, en un estado asintomático que pasa desapercibido en la mayoría de los casos (**OMS, 2002**).

Cerca del 30% de los pacientes infectados con el parásito, presentan compromiso cardíaco y /o digestivo en la posterior fase crónica de la enfermedad. En esta fase se exigen técnicas altamente sensibles y específicas ya que el número de formas tripomastigotes presentes en sangre disminuyen por que hay una migración bastante importante hacia los tejidos. Es por esta razón que los métodos convencionales de diagnóstico son menos útiles ya que requieren de mayor cantidad de parásitos circulantes en sangre y de mayor tiempo para llegar al diagnóstico (**Texeira et al. 2006**).

Adicionalmente, las técnicas serológicas como ELISA, inmunofluorescencia directa e indirecta, no permiten diferenciar una reinfección; al igual pueden presentar una baja especificidad debido a la reactividad cruzada antigénica con Leishmania y otros tripanosomas (**Andrade, 1999**).

Recientemente, análisis moleculares tales como: La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tienen un gran valor en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas ya que posee una alta sensibilidad y especificidad permitiendo un oportuno diagnóstico de la enfermedad en cualquiera de sus etapas (**Gomes et al. 1999**).

Por otra parte, el análisis de los ácidos nucleicos se ha convertido en una herramienta importante en el diagnóstico e investigación en patología molecular. El material comúnmente analizado en los laboratorios de esta disciplina es el tejido embebido en parafina (**Armas et al. 2006**). Método que presenta gran facilidad en cuanto a su procesamiento, almacenamiento y transporte. Así mismo los tejidos

embebidos en parafina son de gran valor en el diagnóstico histopatológico al preservar la arquitectura y proteínas propias del tejido **(Zafra et al. 2004)**.

Cabe resaltar la importancia que tiene la calidad y cantidad del ADN en el momento de la desparafinación y extracción para conseguir una óptima amplificación de las moléculas blanco, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Por lo anterior, en este trabajo se propone evaluar la aplicabilidad de las pruebas de PCR basadas en los iniciadores TcH2AF/R que amplifican un fragmento de 230 pb en la región 3'no codificante de la unidad H2A **(Pavía et al. 2003)** y S35/S36 los cuáles amplifican los minicirculos del cinetoplasto (ADNk) del parásito **(Pavía et al. 2007)**, para la detección de *Trypanosoma cruzi* en tejidos embebidos en parafina.

2. JUSTIFICACIÓN

La tripanosomiasis americana es una zoonosis de animales silvestres en América Latina. El hombre al intervenir en los ambientes selváticos ha entrado a participar en el ciclo de transmisión del parásito.

Las principales condiciones para el establecimiento de la enfermedad de Chagas en las zonas de riesgo son la presencia del insecto vector, los animales silvestres que sirven de reservorios, la circulación del parásito y las condiciones socioeconómicas de la región: tipo de vivienda, hacinamiento y presencia de animales domésticos que facilitan la transmisión activa **(Hoyos et al. 2007)**.

Por otro lado, en la cardiopatía chagásica el trasplante de corazón es una de las opciones de tratamiento debido a que el daño originado en el tejido es irreversible. Sin embargo esta posibilidad tiene alto riesgo de reactivación de la enfermedad ya que los pacientes son sometidos a inmunosupresión para dicho procedimiento. Dicha reactivación ha sido reportada para el 22% al 75% de los pacientes con trasplante de corazón **(Coura, 2007)**.

En los casos de reactivación, el parásito puede ser detectado en los tejidos afectados, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual es una herramienta valiosa para detectar la presencia del parásito antes de que se presente la sintomatología de la enfermedad y así poder iniciar el tratamiento de forma temprana **(Bestetti et al. 2004)**.

Por otro lado, estudios epidemiológicos basados en muestras de archivo, es otro campo en el cual la PCR a partir de muestras de tejidos tiene gran aplicabilidad. Las muestras usualmente son conservadas y embebidas en parafina; de manera que para su uso es importante estandarizar las condiciones de desparafinación y

extracción del ADN, como también estudiar el uso de los adecuados iniciadores para la PCR.

En este trabajo se pretende evaluar el uso de los iniciadores S35/S36 y TcH2AF/R para la detección del parásito en muestras de tejidos embebidos en parafina procedentes de ratones infectados con *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/DA y en muestras de archivo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar los iniciadores TcH2AF/R y S35/S36 para amplificar el ADN de *Trypanosoma cruzi* presente en muestras de tejidos de ratones infectados incluidas en parafina.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar el método más eficiente de desparafinación de los tejidos.
- Determinar el método más eficiente de extracción de ADN a partir de muestras de tejido incluidas en parafina de ratones infectados experimentalmente con la cepa *T. cruzi* /MHOM/CO/2001/D.A.
- Evaluar la infección por la cepa *T. cruzi* /MHOM/CO/2001/D.A en ratones mediante el análisis de la parasitemia por microhematocrito, PCR y la presencia del parásito en tejidos frescos e incluidos en parafina por análisis histopatológicos y PCR.
- Comparar los análisis histopatológicos y la técnica de PCR con los iniciadores TcH2AF/R y S35/S36 para detectar *T. cruzi* en muestras de archivo.

4. MARCO TEORICO

La enfermedad de Chagas es una patología que tiene gran impacto a nivel de salud pública en América. Es causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* afectando cerca de 15 millones de personas en el continente **(Macedo et al. 2004)**. Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Carlos Chagas en el año de 1909, quien además describió el ciclo de vida del parásito e identificó algunos insectos vectores **(OMS, 2002)**.

4.1 *Trypanosoma cruzi*

El *Trypanosoma cruzi*, pertenece al Phylum: *Euglenozoa*, al orden: *Kinetoplastida*, a la familia: *Trypanosomatidae*, al género: *Trypanosoma*, al subgénero: *Shizotrypanum*, y a la especie: *cruzi*.

T. cruzi presenta varios estadios de evolución de acuerdo a los siguientes parámetros: a la forma de las células (esférica, piriforme, alargada); a la posición relativa del núcleo y el cinetoplasto (anterior, lateral o posterior); y a la manera de salida del flagelo (central o lateral) **(Rodríguez et al. 2004)**.

Dentro del marco anterior el *T. cruzi* cuenta con 3 estadios morfológicos (Figura 1) importantes tales como: La forma epimastigote, la cual mide entre 20-40 μm , tiene una forma elongada en la que el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo, emerge por un costado del cuerpo arrastrando la membrana citoplasmática en un corto trayecto dando la imagen de una membrana ondulante corta y se libera por el extremo anterior. Este estadio se desarrolla en el vector y en cultivos axénicos y constituye una de las formas proliferativas de *T. cruzi*. Es también la forma de más fácil cultivo "in vitro" **(Rodríguez et al. 2004)**. La forma amastigote la cual mide entre 2 - 4 μm se caracteriza por ser esférica u ovalada, carece de flagelo libre y es un estadio de localización intracelular y replicativo en el mamífero **(Rodríguez et al. 2004)**; y el tripomastigote el cual mide 20 x 25 μm

tiene forma elongada con el cinetoplasto situado por detrás del núcleo, el flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo, se libera por el extremo anterior creando la imagen de una membrana ondulante de importante extensión, este estadio está presente en la circulación del mamífero (tripomastigote circulante) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico), en cultivo de células y en el espacio intracelular del hospedador vertebrado y carece de capacidad replicativa (Rodríguez et al. 2004).

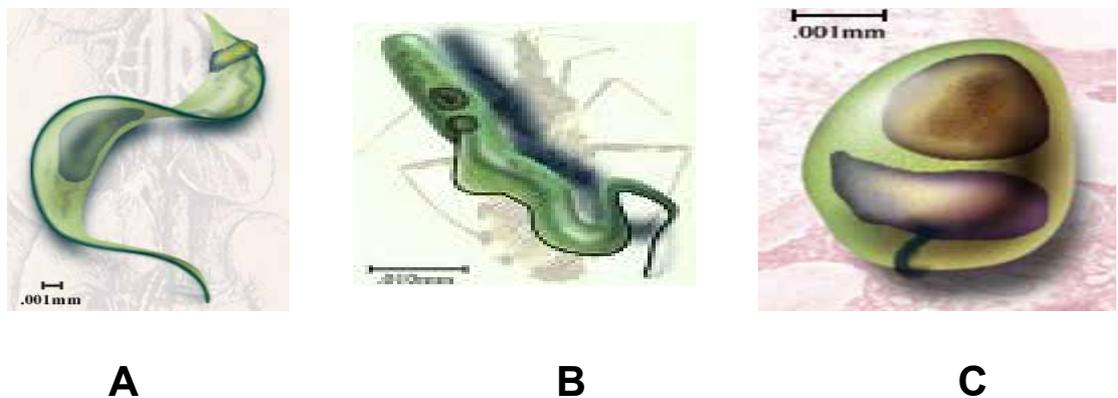


Figura 1: Estadios morfológicos de *T. cruzi*. A) Tripomastigote B) Epimastigote C) Amastigote (Tomado de www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html).

4.1.1 Ciclo de vida de *T. cruzi*

T. cruzi se presenta en varios estadios durante su crecimiento y desarrollo (Figura 2). La infección es transmitida por el insecto vector a diferentes especies de animales salvajes y domésticos. Estos son hemípteros de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, de aproximadamente 6 cm de largo, que se alimentan principalmente de sangre. Los insectos se infectan al picar a un animal infectado, ingiriendo así al parásito (en su estadio de tripomastigote sanguíneo). Consecutivamente dentro del insecto, en su tracto digestivo, el parásito sufre una serie de transformaciones antes de ser expulsado en las heces. En el estómago del insecto, los trypanosomas se redondean formando esferomastigotes,

aproximadamente en la mitad del intestino se transforman en epimastigotes que se replican mediante fisión binaria y finalmente, aproximadamente 2 semanas después, llegan al recto, donde se convierten en tripomastigotes metacíclicos. La infección del mamífero se inicia cuando un insecto infectado defeca mientras se alimenta, liberando tripanosomas metacíclicos en sus heces. Los tripanosomas, incapaces de atravesar la piel intacta, entran en el organismo a través de excoriaciones de la piel (sitio de la mordedura), o a través de las mucosas, invadiendo inmediatamente las células hospederas (Cevallos y Hernández, 2003).

Dentro de las células, los tripomastigotes pierden su flagelo y se redondean para formar amastigotes, los cuales se multiplican intracelularmente por fisión binaria. Cuando los amastigotes casi llenan la célula, se transforman en tripomastigotes, los cuales son liberados a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo, rompiendo la célula. Los tripomastigotes tiene la habilidad de invadir otras células, dónde se transforman de nuevo en amastigotes, repitiéndose indefinidamente el ciclo de infección. El ciclo de vida se cierra cuando un triatomino no infectado se alimenta de un hospedero con tripanosomas en su torrente sanguíneo (OMS, 2002; 2007).

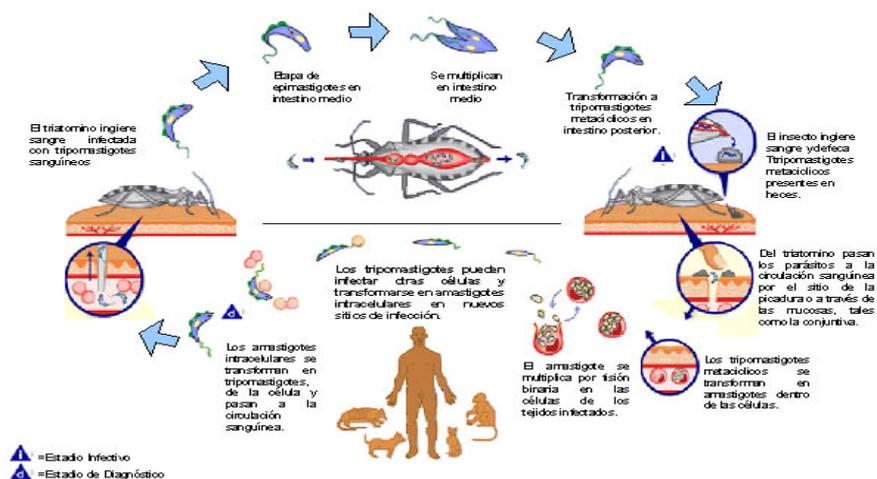


Figura 2: Ciclo vital del *Trypanosoma cruzi*. (Tomado de OMS, 2002)

4.1.2 Ciclos de transmisión de *T. cruzi*

La principal vía de transmisión de *T. cruzi* entre sus hospedadores es la transmisión vectorial (a través del vector) en la cual se pueden distinguir tres ciclos: el ciclo silvestre, el ciclo doméstico y el ciclo peridoméstico.

4.1.2.1 Ciclo silvestre: El ciclo silvestre o ciclo primitivo de *T. cruzi*, es de naturaleza eminentemente zoonótica, donde el protozooario circula entre vectores y reservorios silvestres a lo largo de la mayor parte del continente americano desde hace millones de años. Los ecotopos (ecosistemas) primitivos de *T. cruzi* son muy diversos, encontrándose en los desiertos norteamericanos, altiplanos andinos, florestas amazónicas y atlántica. La tripanosomiasis silvestre prefiere ambientes ecológicamente cerrados o semiabiertos, variando en las proporciones de hospederos a vectores dependiendo de una serie de factores como el clima, altitud, humedad, y características fauno florísticas **(Rodríguez et al. 2004)**.

4.1.2.2 Ciclo doméstico: En el ciclo doméstico el hombre sobresale como principal reservorio de la infección, llevando al parásito hacia las zonas urbanas y hacia nuevas regiones y países no endémicos. Por otro lado la enfermedad de Chagas corresponde a una situación mucho más reciente en el contexto histórico, definido por factores antroponóticos y haciendo del hombre uno de los últimos reservorios naturales de *T. cruzi* **(Rodríguez et al. 2004)**.

4.1.2.3 Ciclo peridoméstico: En este ciclo intervienen mamíferos (roedores domésticos, marsupiales, gatos, perros) que libremente entran y salen de las residencias y los triatominos silvestres que son atraídos por la luz de las casas y por el alimento. Este ciclo sirve de unión entre los ciclos silvestre y doméstico. Algunos autores lo incluyen en el ciclo doméstico **(Rodríguez et al. 2004)**.

4.1.3 Hábitat y las asociaciones de *T. cruzi* I (Z1) y *T. cruzi* II (Z2)

Los actuales grupos de *T. cruzi* I (Z1) y *T. cruzi* II (ZII) originalmente se describieron sobre la base de análisis isoenzimáticos como fenotipos principales. En las últimas dos décadas se han incluido una serie de métodos moleculares como amplificación del ADN, determinación del ADN ribosomal, secuencia del gen mini-exón y análisis de microsatélites que han confirmado la integridad de las dos principales subdivisiones dentro de *T. cruzi*, correspondiente a *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Gaunt y Milles, 2000).

Un gran número de *T. cruzi* aislados de la Cuenca amazónica se han identificado como *T. cruzi* I (Z1) o ZII (Gaunt y Milles, 2000). En tanto *T. cruzi* II (ZII) predomina en el ciclo de transmisión doméstica en los países del Cono Sur de América tales como: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay, mientras que *T. cruzi* I (Z1) predomina en los ciclos de transmisión doméstica al norte de la cuenca del Amazonas (Tabla1) (Gaunt y Milles, 2000).

Triatomine	Silvatic Ecotope	Associated Trypanosomes	Associated Hosts
<i>Rhodnius</i> species	Arboreal: palms	<i>Trypanosoma cruzi</i> 1 [Z1] <i>T. rangeli</i>	Marsupial (<i>Didelphis</i>) Marsupial (<i>Didelphis</i>)
<i>Panstrongylus</i>	Arboreal: not palms	<i>T. cruzi</i> 1 [Z1]	<i>Didelphis</i>
<i>Panstrongylus</i>	Terrestrial: burrows	<i>T. cruzi</i> [Z3]	Edentate <i>Dasybus</i> Marsupial <i>Monodelphis</i>
<i>Triatoma</i>	Terrestrial: rocks	<i>T. cruzi</i> 2 [Z2]	[Edentates?] ^a Rodents (<i>Cavia</i>) Primates (<i>Leontocebus</i>)

TABLA 1. Hábitat del triatomino, hospedero y grupo de *T. cruzi* (Tomado de Gaunt y Miles 2000)

4.2 Enfermedad de Chagas

La sintomatología y patología de la Enfermedad de Chagas depende de la fase de la enfermedad en la que se encuentre el paciente.

En la fase aguda, hay diferentes lesiones que se caracterizan por presentar reacciones inflamatorias localizadas, con el predominio de células mononucleares y de vez en cuando con la formación de granulomas localizados principalmente en músculo y tejido cardíaco. En ciertos casos, puede haber hiperplasia linfocitaria en los ganglios linfáticos, hígado y bazo; y la presencia de macrófagos los cuales suelen ser invadidos por los parásitos causando miocarditis difusa con edema intersticial e hipertrofia de las fibras del miocardio y finalmente la dilatación de cavidades cardíacas (Figuras 3a y 3b) **(Coura, 2007)**.

En la fase indeterminada de la enfermedad de Chagas hay un periodo clínico silencioso y prolongado que sigue la fase de infección aguda primaria. Los individuos presentan evidencias serológicas y parasitológicas de la infección, pero siguen siendo asintomáticos y no exhiben signos que puedan afectar el funcionamiento del corazón ni del tracto digestivo **(Andrade, 1999)**. La fase crónica indeterminada (asintomático) no tiene prácticamente ninguna implicación anatomopatológica, a excepción de focos inflamatorios aislados en el miocardio y de una reducción limitada en el número de células cardíacas y del plexus mientérico produciendo evidentes manifestaciones clínicas **(Coura, 2007)**.

La infección entonces procede a una fase crónica, con parasitemia escasa ya que las formas parasitarias han migrado hacia los órganos blanco y una ausencia de síntomas a la enfermedad severa con implicación cardiovascular y/o gastrointestinal **(Macedo et al. 2004)**.

En la fase crónica de la enfermedad, puede haber fibrosis del miocardio extensa, con destrucción del sistema de conducción, y una equivalente reducción en el número de células cardíacas. Vale el precisar que, en estos casos, los focos aislados de la reacción inflamatoria aguda están de vez en cuando presentes **(Coura, 2007)**. Es común encontrar la hipertrofia de fibras del miocardio, la dilatación de las cavidades con la presencia de trombos, fibrosis, y de la reducción de los ápices ventriculares, particularmente en el ventrículo izquierdo. **(Coura, 2007)** (Figuras 3c y3d).

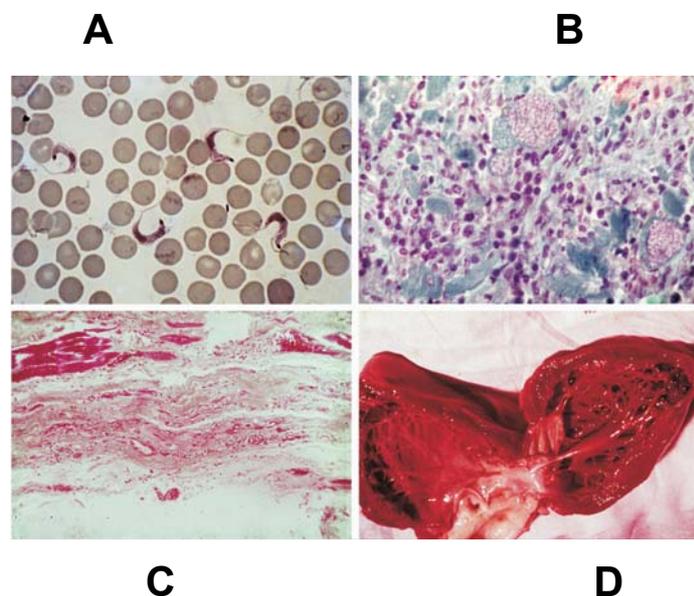


Figura 3:A):Tripomastigotes que circulan en sangre durante fase aguda de enfermedad de Chagas; B): pseudoquistes de amastigotes en fibras del miocardio en la fase aguda; C): fibrosis del sistema que conduce del miocardio en la fase crónica de enfermedad de Chagas; D): hipertrofia delmiocardio y dilatación de las cavidades del corazón con la presencia de trombos en la enfermedad cardíaca crónica de Chagas. **(Coura, 2007)**

4.2.1 Modos de transmisión

La enfermedad de Chagas puede ser transmitida por diversos mecanismos. Sin embargo, la transmisión del vector es la más importante, generalmente por encima del 80% de la transmisión de *T. cruzi* en humanos (**Días y Schofield, 1999**).

4.2.1.1 Vectorial: Es la vía más frecuente (85% de los casos). Los insectos se contaminan al chupar sangre de mamíferos o humanos infectados, luego en el aparato digestivo, el parásito sufre una serie de transformaciones, las cuales las podemos describir en tres fases: esferomastigotes (o formas redondeadas) que se desarrollan en el estómago, epimastigotes (en el intestino) y tripomastigotes meta cíclicos la cual es la forma infectante por el vector (este ciclo dura aproximadamente 20 días). Al volver a picar, e ingerir una buena cantidad de sangre, el triatoma defeca sobre la superficie de la piel, el hombre se contamina al frotarse la zona de la picadura facilitando la entrada del parásito al organismo. Otras vías de entrada la constituyen las conjuntivas, mucosas, u heridas de la piel (**Chiarpenello, 2004**).

4.2.1.2 Parenteral: La transmisión se realiza a través de transfusiones y puede representar el 9% del total de casos de sangre contaminada (presente entre un 3% y un 53% de las muestras tomadas en bancos de sangre según las zonas y los países), por otro lado los accidentes en laboratorios también se encuentran clasificados en este método de transmisión al igual que las personas que manipulan residuos biológicos (**Chiarpenello, 2004**).

4.2.1.3 Congénita: Esta vía representa el 6% del total de los casos. Constituye la tercera vía más importante de transmisión de la enfermedad de Chagas. Este tipo de transmisión puede depender de factores ligados al parásito y al hospedador.

Ocurre cuando *T.cruzi*, al igual como atraviesa las mucosas así mismo puede penetrar el epitelio trofoblástico **(Rodríguez et al. 2004)**.

4.2.1.4 Transplante de órganos:

Cuarta en importancia, esta transmisión ocurre por la recepción de órganos infectados con el parásito. Así mismo, los pacientes chagásicos que son transplantados, también pueden sufrir reactivación de la enfermedad post-transplante **(OMS, 2002, Storino et al. 2002, Benvenuti et al. 2005)**.

4.2.1.5 Transmisión oral: Se produce al consumir alimentos contaminados con las formas infectantes del parásito proveniente de las heces del vector, lo que constituye un factor importante en la transmisión digestiva de la enfermedad. Esta infección se produce dada la capacidad del parásito de penetrar a través de la mucosa gástrica, sin hacer ningún efecto sobre estos los ácidos gástricos **(Camandaroba et al. 2002)**.

4.2.2 Diagnóstico

4.2.2.1 Hallazgos clínicos: La enfermedad de Chagas presenta una fase inicial o aguda con la parasitemia evidente. En la mayoría de los casos no hay síntomas, pero en los casos sintomáticos se pueden identificar signos o síntomas como: El signo de Romaña principalmente en niños, fiebre, adenopatía, edema, hepatoesplenomegalia, miocarditis, y meningoencefalitis en casos severos. Sigue por una fase indeterminada crónica la cual se presenta como: asintomática, con resultado normal en el electrocardiograma y radiografía de esófago, y colon **(Coura, 2007)**.

En la fase crónica, la enfermedad de Chagas se puede presentar como forma indeterminada, en la cual el 40% de los individuos infectados siguen siendo totalmente asintomáticos. Aunque en algunos de ellos presentan serología positiva para la infección con *T. cruzi*, al igual muchos de estos pacientes,

pueden tener resultados de xenodiagnóstico y de PCR positivo por varios años **(Coura, 2007)**.

Por otra parte, dentro de los síntomas que se presentan en la cardiopatía crónica de Chagas están: arritmia, insuficiencia cardíaca, obstrucciones auricular-ventriculares y tromboembolismo **(Coura, 2007)**.

4.2.2.2 Hallazgos de laboratorio

En la fase aguda de la enfermedad de Chagas, el diagnóstico de la infección se puede basar en métodos parasitológicos, como por ejemplo el método de Strout o el método de microhematocrito las cuales son técnicas, que concentran tripomastigotes del parásito, teniendo entonces una sensibilidad de más del 90% **(Profeta, 1999)**.

En las fases intermedia y crónica se utilizan pruebas serológicas para detectar anticuerpos contra *T. cruzi* y no la presencia del parásito. Estas pruebas tienen alta sensibilidad pero carecen de especificidad debido a reactividad cruzada antigénica con parásitos como *Leishmania sp* y *T. rangeli*. Las pruebas parasitológicas tales como hemocultivo o xenodiagnóstico han demostrado ser altamente específicas, pero la sensibilidad de estas técnicas es baja por la reducida parasitemia en estas fases. Recientemente, los análisis moleculares tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que amplifican ciertas secuencias repetidas del ADN del cinetoplasto (kADN) del tripanosoma se han propuesto como una buena herramienta alternativa para la detección de *T. cruzi* en sangre humana **(Gómez et al. 1999; Meira et al. 2004)**.

4.2.2.2.1 Técnicas parasitológicas

4.2.2.2.2 Métodos directos: El microhematocrito presenta una sensibilidad y una especificidad similar al xenodiagnóstico. Por otro lado el método de concentración de Strout tiene una sensibilidad del 95%, una vez retraído el coagulo, se centrifuga para ver al microscopio el sedimento y por consiguiente las formas parasitarias.

4.2.2.2.3 Métodos indirectos: Dentro de los métodos indirectos se incluye el xenodiagnóstico, el cual presenta una sensibilidad cercana al 100% en la fase aguda, la cual cae 1 a 40% en la fase crónica. Su especificidad es del 100%, por consiguiente si se tiene un resultado positivo, certifica el diagnóstico. Este método consiste en la demostración de *T. cruzi* en el hospedador intermediario, previamente alimentado con sangre de un individuo infectado. Este método permite amplificar el número de parásitos que se encuentran presentes en la sangre debido a la fácil multiplicación del parásito dentro del vector. Para realizarlo se usan ninfas de triatomíneos no infectados y con el fin de constatar la presencia del protozoo dentro del vector, se analiza el contenido intestinal de los triatomíneos alimentados con la sangre del paciente **(Rodríguez et al. 2004)**.

En cuanto al hemocultivo se indica realizarlo a los 8, 15 y 30 días después de la exposición. Este consiste en colocar muestras de sangre del paciente en tubos con medio de cultivo apropiados. Las muestras son revisadas a los 20, 30 y 45 días, buscando formas epimastigotes **(Rodríguez et al. 2004)**. El hemocultivo, se considera como una técnica estándar en la diagnóstico, debido a que en muchas ocasiones las pruebas serológicas son inconclusas principalmente en pacientes inmunosuprimidos **(Bulcão et al. 2003)**.

4.2.2.2.4 Métodos moléculares - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): La PCR es un método in vitro de síntesis de ADN con el que un segmento particular de este es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra de manera

exponencial a través de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termolabíle. Así se obtienen millones de copias de la secuencia deseada del ADN. Adicionalmente, se puede decir que la técnica de PCR es una herramienta muy útil en biología molecular siendo ampliamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades muy pequeñas del ADN deseado **(Rodríguez y Barrera, 2004)**.

La PCR funciona por lo general en 30 ciclos repetitivos conformado cada uno de tres pasos: El primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo, incubándose a una temperatura de 95° por un minuto. En el segundo paso ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores, esto ocurre en una temperatura la cual permite un correcto apareamiento de las bases nitrogenadas de ambas clases de ADN, aquí es importante tener en cuenta el punto de fusión para cada iniciador aunque generalmente oscila entre 50° y 60°. El tercer paso se efectúa a 72°, en el cual la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres y de acuerdo a este proceso se va dando un orden de los nucleótidos de la cadena que van a actuar como molde **(Rodríguez et al. 2004)**.

De acuerdo a lo anterior, los ensayos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han propuesto como una alternativa para la detección de *T.cruzi* especialmente en pacientes en fase crónica. Adicionalmente, varios iniciadores complementarios para la región conservada de los minicírculos de cinetoplasto y genes nucleares se han usado a fin de detectar este parásito **(Pizarro et al. 2007)**. (Tabla 2)

Tabla 2. Pruebas de PCR para la detección de *Trypanosoma cruzi*

Blanco ADN	Cebadores	Secuencia 5' - 3'	Tamaño amplificación (pb)	Referencia
Region no codificante unidad 1,2 kb gen que codifica histona H2A	TcH2AF TcH2AR	5'-GAGAGTGATCGTGGGAGAGC-3' 5'- AGTGGCAGATTTGG GGTC-3'	230	Pavia et al. 2003; 2007
ADNk (región variable minicirculo)	CV1 CV2	5'- GAT TGG GGT TGG AGT ACT ACT AT-3' 5'- TTG AAC GGC CCT CCG AAA AC-3'	270	Veas et al. 1991 Breniere et al. 1995
ADNk (región variable minicirculo)	S35 S36	5'- AAA TAA TGT ACG GG(T/G) GAG ATG CAT GA-3' 5'-GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT-3'	330	Vallejo, 1998, 1999 Vago et al. 2000
ADNk (región constante minicirculo)	S33A S34A	5'-TCA TGC ATC TC(C/A) CCC GTA CAT TAT TT-3' 5'-TAT ATT ACA CCA ACC CCA ATC GAA CC-3' '	83	Sturm et al. 1989
ADNk (región constante minicirculo)	S34A S67	5'-TAT ATT ACA CCA ACC CCA ATC GAA CC-3' 5'-TGG TTT TGG GAG GGG (C/G) (G/C) (T/G) TCA A (A/C) T TT-3'	122	Sturm et al. 1989
ADNk (región variable minicirculo)	121 122	5'-AAA TAA TGT ACG GG(T/G) GAG ATG GA--3' 5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3'	330	Wincker et al. 1994 Castro et al. 2002 Schijman et al. 2004
Repetición nuclear de 195 pb	TCZ1 TCZ2	5'-CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT-3' 5'-CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGG-3'	188	Moser et al. 1989 Kirchhoff et al. 1996 Gomes et al. 1999
Repetición nuclear de 195 pb	DIAZ1 DIAZ2	5'-GCG AAA CAG ATA TTG ACA GAG-3' 5'-TGT TCA CAC ACT GGA CAC CAA-3'	195	Diaz et al. 1992
Mini-exon espacio intergénico	TC1 TC	5'-GTG TCC GCC ACC TCC TTC GGG CC-3' 5'-CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG-3'	300	Souto et al. 1996
Mini-exon espacio intergénico	TC2 TC	5'-CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G-3' 5'-CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG-3'	350	Souto et al. 1996
Gen mini-exon	GE12	5'-GGG AAG CTT CTG TAG TAT ATT GGT A-3'	582	Murthy et al. 1992

	GE13	5'-GGG AAT TCA ATA TAG TAC AGA AAC TG-3'		
Repetición nuclear de 1025 pb	O1	5'-TGG CTT GGA GGA GTT ATT GT-3'	250	Souto et al. 1996
	O2	5'-AGG AGT GAC GGT TGA TCA GT-3'		
ARNr 24 Sα	D71	5'-AAG GTG CGT CGA CAG-3'	110	Souto et al. 1996
	D72	5'-TGT GG TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT-3'	125	
Gen de la proteína flagelar	BP1	5'-ATG GGT GCT TGT GGG TCG AAG-3'	692	Silber et al. 1997
	BP2	5'-TCA AGC CTT CTC CGG CAC GTT-3'	250	
Dominio variable de la subunidad grande del ARNr	D72	5'-TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT-3'	265 (<i>T. cruzi</i> I)	Souto et al. 1999
	D75	5'-GCA GAT CTT GGT TGG CGT AG-3'	250 (<i>T. cruzi</i> II)	
	RG3	5'-GGC CAA AGG GTA AGG CTC-3'		

4.2.3 Tejidos incluidos en parafina

Los tejidos incluidos en parafina son una fuente extraordinaria para los estudios moleculares del ADN debido a la disponibilidad de los tejidos de archivo y la relación que tienen con los casos clínicos de los departamentos de patología. Además de la biopsia y de los tejidos quirúrgicos incluidos en parafina, los tejidos post mortem son un recurso importante, especialmente para las enfermedades raras, al igual para los estudios neuropatológicos e histopatológicos (**Bonin et al. 2003**).

Los tejidos fijados y embebidos en parafina también constituyen un importante material de archivo para la realización de estudios clínicos retrospectivos y, además, representan un recurso invaluable para estudiar la patogenia molecular de las enfermedades y la expresión génica diferencial (**García et al. 2006**). También, son una fuente importante de material para diagnóstico e investigación. Sin embargo, la amplificación del ADN desde este tipo de tejidos, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es afectada por el tipo de fijador y los tiempos de fijación empleados (**García et al. 2006**).

4.2.3.1 Tipos de fijadores: Existen dos clases de fijadores tales como: los precipitantes y los entrecruzantes, los cuales proporcionan diferentes reacciones a los tejidos embebidos en parafina (**Florez et al. 2004**).

Los fijadores precipitantes como: el etanol, el metanol y la acetona preservan las biomoléculas pero la morfología no se conserva (**Florez et al. 2004**).

En cuanto a los fijadores entrecruzantes tales como: el formaldehído, glutaraldehído y paraformaldehído preservan la morfología, pero la preservación y la recuperación de las biomoléculas no es buena (**Florez et al. 2004**).

Se ha demostrado que el formaldehído produce entrecruzamiento («cross-linkage») entre ácidos nucleicos y proteínas, además hidroliza los puentes fosfodiéster del ADN y modifica covalentemente el ARN por adición de grupos mono metilos, generando problemas en la obtención de material genético de buena calidad necesario para la aplicación de variadas técnicas moleculares (**García et al. 2006**). Además, numerosos autores han demostrado que la fijación con formalina disminuye el rendimiento de la amplificación por PCR, en mayor o menor grado dependiendo del tiempo y temperatura de fijación principalmente.

Según estudios realizados se recomienda seleccionar métodos que garanticen la estabilidad morfológica del espécimen por un largo periodo de tiempo como emplear fijadores precipitantes como el alcohol o congelar los tejidos a -20°C sin utilizar ningún medio de preservación, ya que el ADN sufre menos fragmentación permitiendo de esta manera su amplificación. Además se sugiere realizar el proceso de digestión, lavando los tejidos con PBS para eliminar los fijadores y si es posible centrifugar para retirar los restos celulares, ya que las proteínas pueden inhibir la PCR (**Florez et al. 2004**).

4.2.3.2 Técnicas para la desparafinación de tejidos embebidos en parafina:

Para tratar las muestras embebidas en parafina usualmente se siguen los siguientes pasos: desparafinación de tejidos, digestión del tejido y posteriormente se pasa a la extracción y purificación del ADN.

En la actualidad existen varios métodos de desparafinación, dentro de ellos el método más sencillo y utilizado es el método de xileno/ etanol el cual fue descrito en 1985; y consiste en remover el embebido de parafina y deshidratar el tejido para obtener el ADN **(Coombs et al. 1999)**. Otro método alternativo es la fusión de la parafina en un horno de microondas, buscando conseguir separar la parafina del tejido para ser digerido por medio de una solución de digestión y proteinasa K, para posteriormente extraer el ADN y finalmente obtener la amplificación **(Coombs et al. 1999)**.

4.2.3.3 Técnicas para la extracción del ADN en tejido incluido en parafina: En la última década se han publicado varios métodos para la extracción y obtención de ADN a partir de tejido embebido en parafina. Algunos protocolos por ejemplo, utilizan diferentes tiempos de incubación para el tratamiento proteolítico con enzimas proteolíticas, otros emplean solventes orgánicos adicionales como fenol y cloroformo antes de la precipitación con etanol. Al igual, existen distintas metodologías alternativas, que utilizan la lisis celular por calentamiento en agua destilada para procesar el tejido. Por otra parte, en la literatura internacional se reportan protocolos que emplean la sonicación de la muestra y la incubación de la misma en una solución con varios detergentes **(Armas et al. 2006)**.

5 MATERIALES Y METODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Ratones

Se utilizarón 5 ratones de 23 días de nacidos, machos de la especie ICR mantenidos en el bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS) de acuerdo a lo establecido por el Laboratorio de Parasitología y a la normatividad de la resolución N°. 008430 de 4 de Octubre de 1993 del Ministerio de la Protección Social de la Republica de Colombia.

5.1.2 Parásitos

Se utilizó la cepa *T. cruzi* I (MHOM/CO/2001/DA), proporcionada por el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud. La obtención en masa de los parásitos se realizó en medio LIT suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB) y 100 mg/ml de gentamicina, luego de su pase cíclico por ratones e insectos.

5.1.3 Muestras de tejidos de ratones infectados de archivo

Se utilizaron muestras de tejidos de ratones infectados con las cepas de *T. cruzi* Y (MHOM/BR/00/Y), y D.A (MHOM/CO/2001/D.A) proporcionados por el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana Bogotá.

5.2 Métodos

5.2.1 Infección de ratones

Se infectaron a nivel intraperitoneal 4 ratones ICR de 23 días de edad con la cepa de *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A, en un volumen de 300 µl conteniendo 3'180.000 formas parasitarias. Un ratón de iguales características sin ninguna intervención fue usado como control sano. (Anexo 1).

5.2.1.2 Seguimiento de la infección y disección de los ratones: Se determinaron las parasitemias a partir de los 8 días post -infección dos veces por semana por medio del método de microhematocrito (Anexo 2); adicionalmente se tomaron muestras de sangre de la parte distal de la cola de los ratones para realizar coloración de Giemsa (Anexo 3) y observación directa al microscopio. Consecutivamente se procedió a la disección de los animales (Anexo 4) y extracción de órganos tales como: corazón, hígado, cerebro, intestino grueso, bazo y músculo esquelético, a los 30 días post-infección. El corazón se fragmentó en tres fracciones: Apical, Derecha e Izquierda para la extracción de ADN, y los cortes de los diferentes órganos se enviaron al servicio de patología del Instituto Nacional de Salud (INS) para análisis histopatológico e inclusión en parafina. (Anexo 5)

5.2.1.3 Desparafinación de los tejidos incluidos en parafina: Para desparafinar los tejidos se ensayó el método de Microondas de acuerdo a lo descrito en el Anexo 6 y como método alternativo el de Xileno/Etanol. (Anexo7). La lisis del tejido posteriormente se realizó durante 1 a 2 días según lo indicado en el Anexo 8.

5.2.1.4 Extracción de ADN a partir del tejido incluido en parafina: Se ensayaron diversos métodos tales como: Salting out (Anexo 9) y Triple Fenol-Cloroformo Alcohol isoamílico (Anexo 10). De estos, se escogió el más adecuado luego de la realización de PCR con muestras positivas utilizando ambos grupos del parásito.

5.2.1.5 Extracción de ADN a partir de tejidos frescos: Se utilizó el método de Lisis Alcalina (Anexo 11) y Triple Fenol- Cloroformo (Anexo 10).

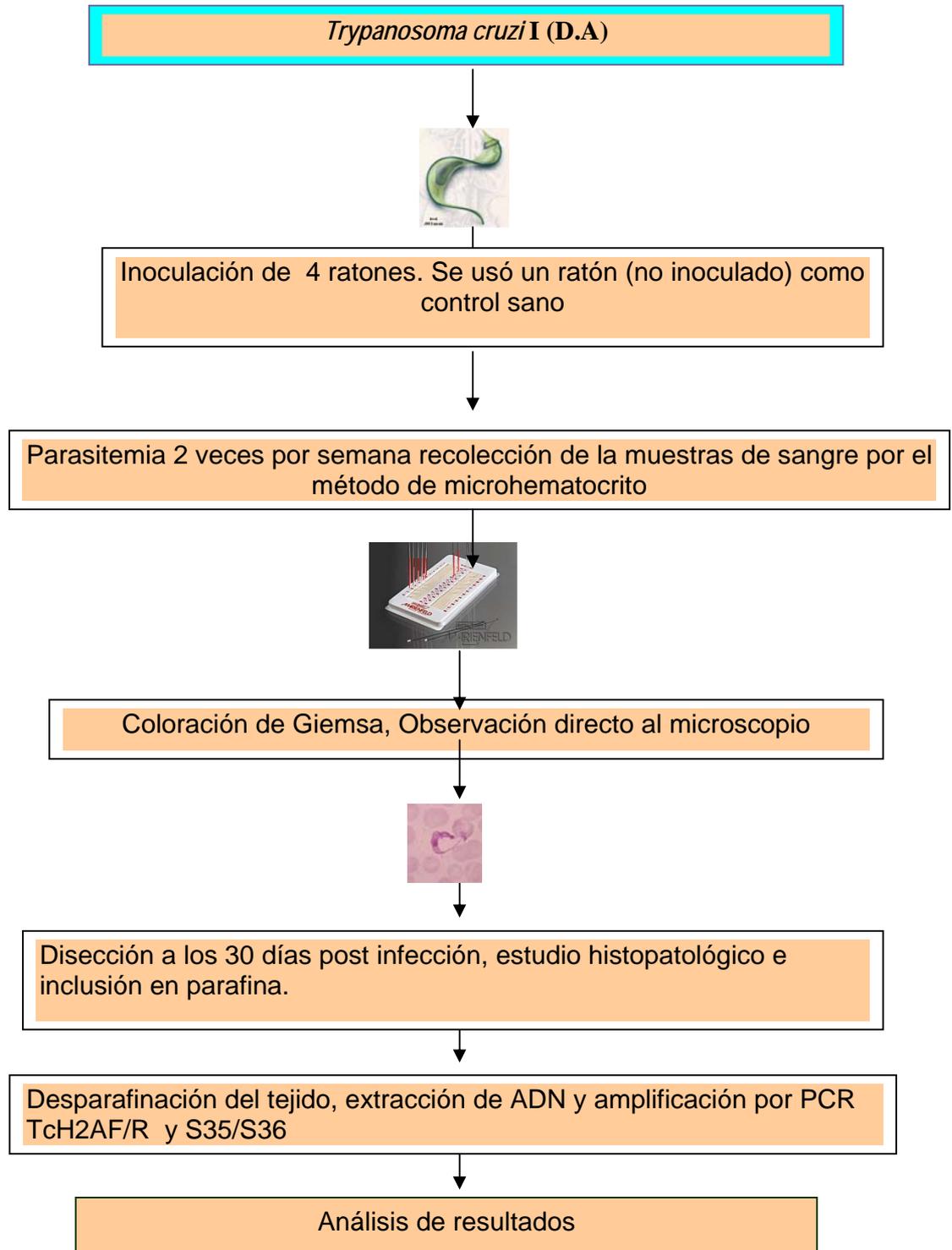
5.2.2 Análisis de PCR

5.2.2.1 TcH2AF/R: Para la reacción de PCR TcH2AF/R se utilizaron los oligonucleótidos TcH2AF(5'-AGT GGC AGA CTT TGG GGT C-3) y TcH2AR (5'-GAG AGT GAT GGG AGA GC-3) los cuales anillan en el elemento SIRE insertado en la región no codificante de la unidad de 1,2 kb del gen de la histona H2A de *T. cruzi*. (Gil et al. 2007). Estos iniciadores TcH2AF/R permiten la amplificación de una banda de 230 pb. (Pavía et al. 2007). La PCR se realizó de acuerdo a lo descrito en el Anexo 12 en un termociclador MJ Research PT-100, programado de la siguiente manera: Desnaturalización 95 °C por 5 minutos, 15 ciclos de desnaturalización a 95 °C por treinta segundos, anillaje y extensión a 72 °C centígrados por 1 minuto y 20 ciclos a 63 C por treinta segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio. (Anexo 13). Para esta PCR se utilizó un control positivo, el cual es una muestra de ADN del parásito, un control blanco (agua en lugar de ADN) y como control negativo se empleó ADN de ratones no infectados. Además se montaron controles de extracción del ADN y de inhibición de la reacción.

5.2.2.2 S35/S36: Por otro lado se emplearon los iniciadores S35/S36, los cuales amplifican los minicírculos del ADN del cinetoplasto (ADNk) del parásito amplificando una banda de 330 pb. (Pavía et al. 2007). La PCR se realizó de acuerdo a lo descrito en el Anexo 14 en un termociclador MJ Research PT-100, programado de la siguiente manera: Desnaturalización 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, anillaje y extensión a 60 °C por 1 minuto y 20 ciclos a 63 °C por treinta segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos. Para esta PCR se utilizó un control positivo, el cual es una muestra de

ADN del parásito, un control blanco (agua en lugar de ADN) y como control negativo se empleó ADN de ratones no infectados. Además se montaron controles de extracción del ADN y de inhibición de la reacción.

6. Diagrama de flujo



7. RESULTADOS

7.1 Método de desparafinación

Inicialmente se llevó a cabo el método de microondas para la desparafinación de los tejidos incluidos en parafina. Tras varios ensayos, no se obtuvo una total desparafinación de los tejidos, por lo tanto, se tomó como opción alterna el método de Xileno /Etanol, con el cual se observaron buenos resultados y se pudo realizar la extracción del ADN, seguido de los ensayos de PCR.

7.2 Método de extracción de ADN a partir de tejidos embebidos en parafina

Luego de realizar varios ensayos con los métodos de Triple fenol-cloroformo alcohol isoamílico y Salting Out, con los cuales se pudo obtener ADN a partir de tejidos embebidos en parafina, se escogió el de Salting Out debido a su fácil realización, bajo costo y su atoxicidad.

7.3 Estudio de la infección de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* l MHOM/CO/2001/D.A

7.3.1 Determinación de parasitemías

En este grupo de ratones la detección del parásito mediante la prueba de microhematocrito fue positiva desde la primera muestra tomada a los 8 días post-infección con un 50% de muestras positivas correspondientes a 2 de los 4 ratones infectados (Figura 4), permaneciendo a partir del día 13 post-infección un 100% de las muestras positivas. (Tabla 3). El pico de parasitemía se observó entre los 19 y 26 días post-infección con valores que oscilaron entre 0,06 y 295,6 parásitos/ μ l. (Figura 5). Por su parte, el ratón usado como control negativo no presentó infección.

Es importante destacar que en este grupo de ratones, 1 de los 4 ratones inoculados (25%) murió antes de los 30 días a causa de la infección, y otro fue disectado antes de este tiempo por estar enfermo, mostrando niveles de parasitemia máximos de 24,62 y 226,8 parásitos/ μ l, respectivamente. Es conveniente señalar que por reglas internas del Instituto Nacional de Salud los animales muertos son retirados de las jaulas e incinerados, por tal motivo al ratón muerto a causa de la infección no se le realizó estudio histopatológico ni pruebas de PCR debido a que los tejidos se encontraban en descomposición.

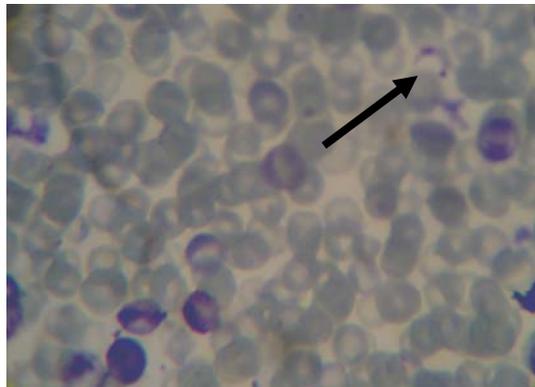


Figura 4. Formas tripomastigotes en frotis de sangre periférica de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* I D.A teñidas con la coloración de Giemsa.

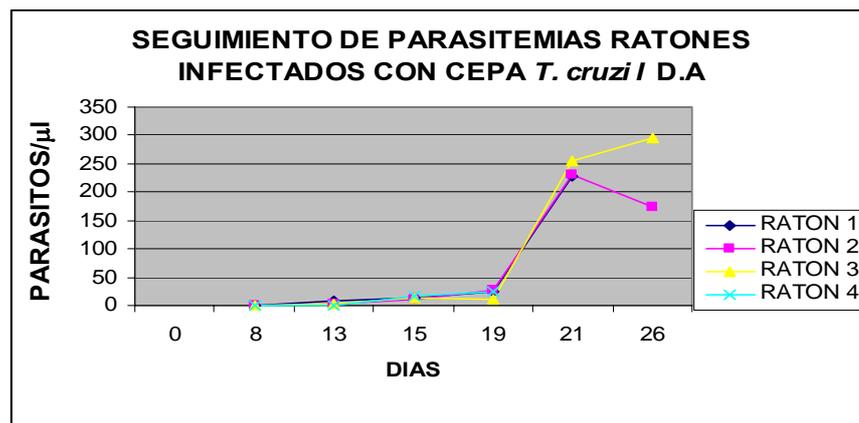


Figura 5. Seguimiento de las parasitemias de los ratones infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A. que fueron sacrificados a los 30 días post- infección. Además se incluye el ratón disectado antes de los 30 días y el ratón que murió a causa de la infección.

TABLA 3. SEGUIMIENTO DE PARASITEMIAS MEDIANTE MICROHEMATOCRITO DE LOS RATONES INFECTADOS CON LA CEPA *T. cruzi* / MHOM/CO/2001/D.A

	DIAS POSTINFECCION CEPA D.A									
		8	13	15	19	21	26	30	31	
RATON	1	+	+	+	+	+	DISECCION ANTES 30 DIAS			
	2	-	+	+	+	+	+	DISECCION 30 DIAS		
	3	+	+	+	+	+	+	DISECCION 30 DIAS		
	4	-	+	+	+	MUERTE POR INFECCION				
	CN	-	-	-	-	-	-	DISECCION 30 DIAS		

Presencia de formas parasitarias (+)

No presencia de formas parasitarias (-)

Para finalizar, en la tabla 4 se denota el comportamiento de la cepa MHOM/CO/2001/D.A, indicando el porcentaje de mortalidad, infectividad y pico máximo de parasitemia post-infección.

TABLA 4. COMPORTAMIENTO DE LA CEPA *T. cruzi* /MHOM/CO/2001/D. A EN LOS RATONES INFECTADOS

COMPORTAMIENTO DE LA CEPA DE LA INFECCIÓN DE LOS RATONES	CEPA D. A
% MORTALIDAD	25
% INFECTIVIDAD	100
PICO DE PARASITEMÍA	19-26
VALOR MÁXIMO DE PARÁSITOS/ μ l	295,6

7.3.2 Detección del parásito por PCR en sangre

7.3.2.1 PCR TcH2AF/R: Las muestras de sangre de los ratones a los 30 días post-infección fueron analizadas por PCR, encontrándose la banda de amplificación esperada de 230 pb en todas las muestras para un 100% de ratones positivos, tras extracción de ADN mediante el estuche comercial GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham). El ratón no infectado no mostró banda de amplificación. (Figura 6)

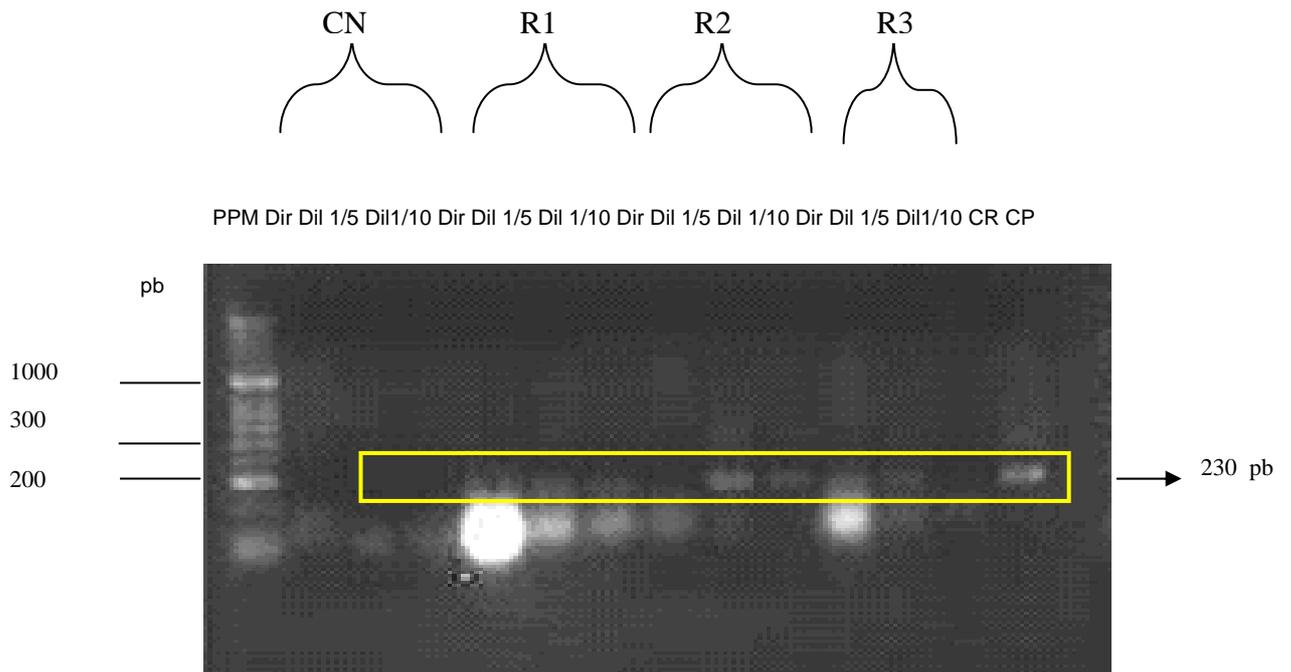


Figura 6. Resultados PCR TcH2AF/R en muestras de sangre de ratones infectados con cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D. A. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 20 μ l del producto de amplificación a partir del ADN extraído por el estuche GFX Genomic Blood DNA Purification estuche comercial utilizado ADN sin diluir (Dir), diluido (Dil) 1/5 y diluido (Dil) 1/10 de los ratones 1, 2 y 3 infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D. A, y un ratón control negativo, CR: control de reacción, en donde se utilizó como templado agua destilada, CP: control positivo y PPM: patrón de peso molecular. Además se usó como marcador HyperLadder II con sus respectivos tamaños señalados a la izquierda.

7.3.2.2 PCR S35/S36: Las muestras de sangre de los ratones 30 días post-infección fueron analizadas, encontrándose la banda de amplificación esperada de 330 pb en todas las muestras, para un 100% de ratones positivos, tras extracción de ADN mediante el estuche comercial GFX Genomic Blood DNA Purification (Amersham). El ratón no infectado no mostró bandas de amplificación. (Figura 7)

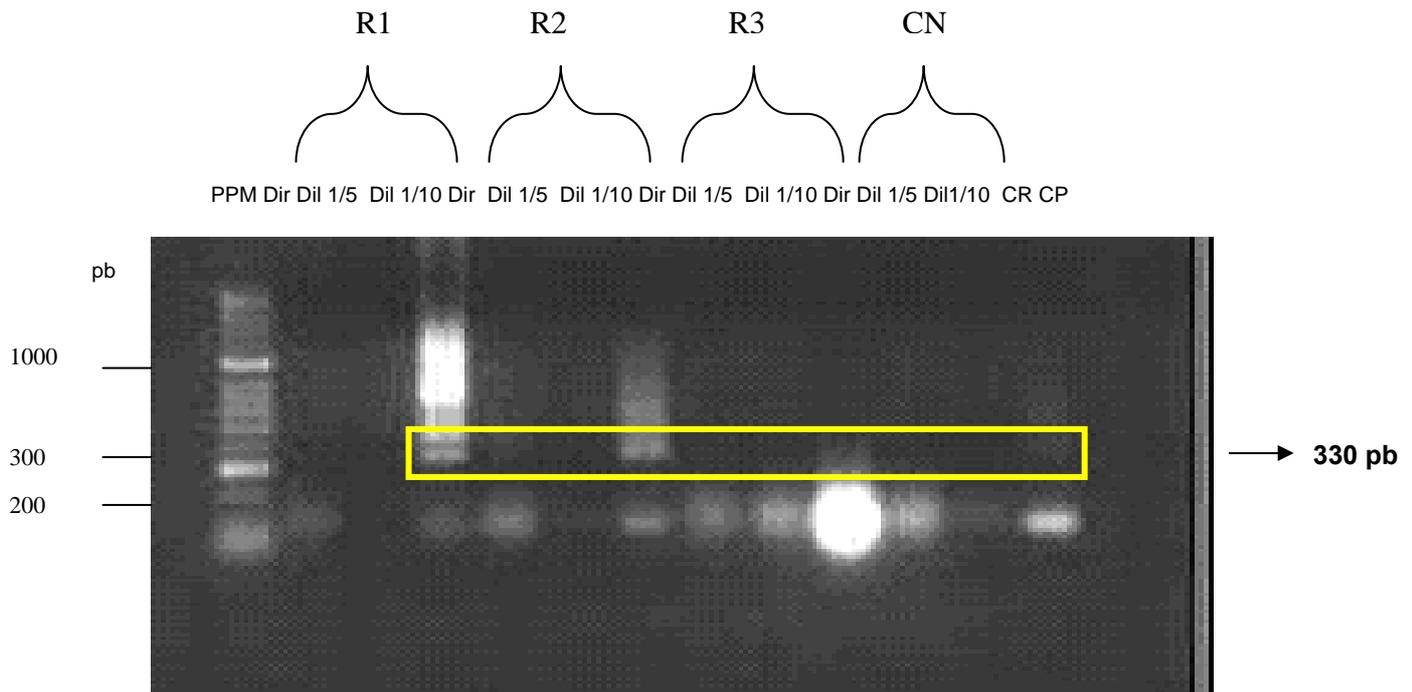


Figura 7. Resultados de la PCR S35/S36 en muestras de sangre de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D. A. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 20 μ l del producto de amplificación a partir del ADN extraído por el estuche GFX Genomic Blood DNA Purification estuche comercial utilizado utilizado ADN sin diluir (Dir), diluido (Dil) 1/5 y diluido (Dil) 1/10 de los ratones 1, 2 y 3 infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A, y un ratón control negativo, CR: control de reacción, en donde se utilizó como templado agua destilada, CP: control positivo y PPM: patrón de peso molecular. Además se usó como marcador HyperLadder II con sus respectivos tamaños señalados a la izquierda.

7.3.2.3 Comparación de las parasitemias mediante microhematocrito y PCR.

Con ambas pruebas fue posible detectar la presencia del parásito a los 30 días post-infección.

7.3.3 Detección de los parásitos en tejidos frescos

7.3.3.1 PCR TcH2AF/R: El ADN de los tejidos frescos 30 días post-infección fue obtenido mediante el método de Lisis Alcalina según lo descrito por Barrera et al. 2008 (Anexo 11).

Los resultados obtenidos muestran que con la utilización de estos iniciadores solo fue posible detectar el parásito en todas las fracciones de 1 de los 4 ratones infectados (R1) y en la fracción derecha del ratón 3, observándose la amplificación del fragmento de 230 pb esperado.

Dados estos resultados, se realizó una prueba de inhibición para detectar en las muestras la presencia de sustancias inhibitorias de la reacción de PCR, encontrándose que las muestras de los ratones R2 y R3 no amplificaron. Por lo tanto, se procedió a tratar estas muestras con Fenol- Cloroformo y Alcohol Isoamilico (24:1), seguido de precipitación del ADN con etanol absoluto. De esta manera, se obtuvo la banda de amplificación esperada en los ensayos de inhibición posteriormente realizados (Figura 8). Con este resultado se procedió a realizar la PCR, encontrando la banda de 230 pb en estas muestras (R2 y R3). Las muestras del ratón no infectado no presentaron banda de amplificación.

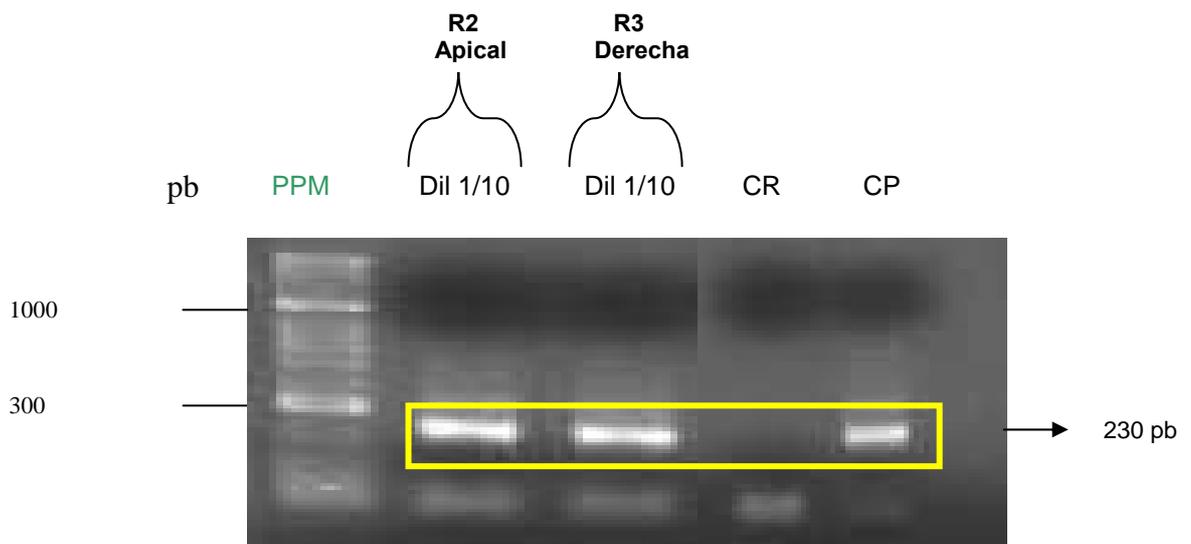


Figura 8. Control de Inhibición de la PCR TcH2AF-R en tejido cardíaco de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 20 µl del producto de amplificación a partir del ADN extraído por el método de extracción lisis alcalina. De los ratones 2 y 3 infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A. CR: Control de reacción, en donde se utilizó como templado agua destilada, CP: Control positivo, PPM: Patrón de peso molecular y se utilizó como marcador HyperLadder II con sus respectivos tamaños señalados a la izquierda.

7.3.3.2 PCR S35/S36: Después de extraer el ADN mediante Lisis Alcalina según lo descrito por Barrera et al. 2008, fue posible detectar la presencia del parásito solamente en el ratón R1. Luego de tratar las muestras de los ratones R2 y R3 con Fenol – Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1), se encontró la presencia del parásito en las muestras de estos ratones. Las muestras del ratón no infectado no mostraron bandas de amplificación.

7.3.4 Detección del parásito en tejidos embebidos en parafina

El ADN de los tejidos embebidos en parafina de 30 días post- infección fue extraído mediante el método de Salting Out descrito en el Anexo 9 para su posterior análisis mediante las pruebas de PCR.

7.3.4.1 PCR TcH2AF/R

Después de extraer el ADN no fue posible detectar la presencia del parásito en ninguna de las muestras embebidas en parafina de los ratones en estudio. Vale la pena mencionar que a estas muestras se les realizó prueba de Inhibición donde no se encontraron inhibidores de la prueba de PCR.

7.3.4.2 PCR S35/S36

Con esta prueba de PCR a diferencia de la prueba de TcH2AF/R, fue posible detectar la presencia del parásito en todas las muestras de tejidos embebidos en parafina (Figura 9). La muestra del ratón no infectado no presenta banda de amplificación.

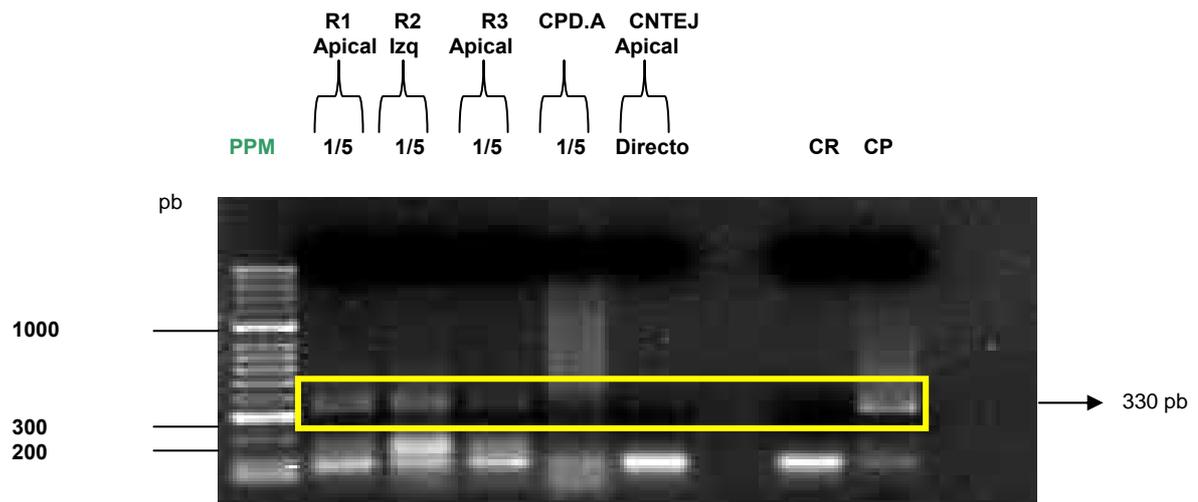


Figura 9. Resultados de la PCR S35/S36 en tejidos cardíaco embebido en parafina de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D. A. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 20 μ l del producto de amplificación a partir del ADN extraído por medio del método Salting Out Modificado y utilizando diluciones del ADN de las fracciones Apical e Izquierda de tejido cardíaco de los ratones R1, R2, R3, control positivo cepa D.A y control negativo del tejido fracción apical, CR : control de reacción, en donde se utilizó como templado agua destilada, CP: control positivo y PPM patrón de peso molecular. Además se usó como marcador HyperLadder II con sus respectivos tamaños señalados a la izquierda.

7.3.5 Análisis histopatológico de tejido cardíaco y otros órganos

Se le realizó análisis histopatológico a tres fracciones del corazón 30 días post-infección correspondientes a la fracción apical, derecha e izquierda, encontrándose miocarditis y miositis en diversos estadios (severa y leve), además de presencia de amastigotes e infiltrado linfomonocitario (Figura 10). Por otro lado, también se analizaron órganos como: hígado, intestino grueso y cerebro, encontrándose hiperplasia en el bazo de todos los ratones infectados (Tabla 5).

7.3.6 Comparación de todas las técnicas para detectar la presencia de *T. cruzi*

Como se observa en la tabla 6, mientras la histopatología fue positiva en todas las fracciones del corazón (Apical, Derecha e Izquierda) de los 3 ratones infectados, que sobrevivieron al experimento, los resultados de la prueba de PCR variaron dependiendo del método de extracción de ADN utilizado.

TABLA 5. HALLAZGOS HISTOPATOLOGICOS DE RATONES INFECTADOS CON LA CEPA DE *T.cruzi* / MHOM/CO/2001/D.A A LOS 30 DIAS POST-INFECCION

RATON	TEJIDOS	HALLAZGO HISTOPATOLOGICO
1	CORAZON HIGADO INTESTINO GRUESO BAZO CEREBRO	MIOCARDITIS AGUDA SEVERA CON PRESENCIA DE NUMEROSOS AMASTIGOTES DE TRIPANOSOMA INTRACELULARES SIN CAMBIOS HISTOLOGICOS PARASITO VERMIFORME ENDOLUMINAL* HIPERPLASIA ESPLENICA REACTIVA SIN CAMBIOS HISTOLOGICOS
2	CORAZON HIGADO INTESTINO GRUESO BAZO CEREBRO	MIOCARDITIS Y MIOSITIS AGUDA SEVERA, LINFOMONOCITARIA CON NUMEROSOS AMASTIGOTES DE TRIPANOSOMA INTRACELULARES SIN CAMBIOS HISTOLOGICOS SIN CAMBIOS HISTOLOGICOS HIPERPLASIA ESPLENICA SIN CAMBIOS HISTOLOGICOS
3	CORAZON HIGADO INTESTINO GRUESO BAZO CEREBRO	MIOCARDITIS AGUDA SEVERA , LINFOMONOCITARIA CON NUMEROSOS AMASTIGOTES DE TRIPANOSOMA INTRACELULARES SIN CAMBIOS HISTOLOGICOS SIN CAMBIOS HISTOLOGICOS HIPERPLASIA ESPLENICA SIN CAMBIOS HISTOLOGICOS
5	CORAZON HIGADO INTESTINO GRUESO BAZO CEREBRO	SIN CAMBIOS HISTOLOGICOS SIN CAMBIOS HISTOLOGICOS SIN CAMBIOS HISTOLOGICOS SIN CAMBIOS HISTOLOGICOS SIN CAMBIOS HISTOLOGICOS

* Parasito adquirido

TABLA 6. Comparación de todas las técnicas para detectar la presencia de *T. cruzi* en tejido cardíaco.

		PCR						HISTOPATOLOGIA
RATON	FRACCION	TEJIDOS FRESCOS				TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA		
		LISIS ALCALINA *		FENOL CLOROFORMO *		SALTING OUT *		
		TcH2AF/R	S35/S36	TcH2AF/R	S35/S36	TcH2AF/R	S35/S36	
R1	Apical	Positivo	Positivo	ND		Negativo	Positivo	Positivo
	Derecha	Positivo	Positivo	ND		Negativo	Positivo	Positivo
	Izquierda	Positivo	Positivo	ND		Negativo	Positivo	Positivo
R2	Apical	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
	Derecha	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
	Izquierda	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
R3	Apical	Negativo	Negativo	ND		Negativo	Negativo	Positivo
	Derecha	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
	Izquierda	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
CN	Apical	Negativo	Negativo	ND		Negativo	Negativo	Negativo
	Derecha	Negativo	Negativo	ND		Negativo	Negativo	Negativo
	Izquierda	Negativo	Negativo	ND		Negativo	Negativo	Negativo

ND: Datos No disponibles

***:** Método de extracción del ADN

Positivo: Presencia del parásito

Negativo: Ausencia del parásito

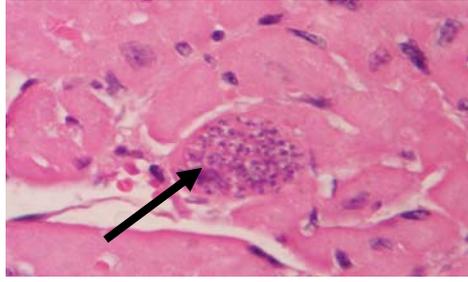


Figura10. Hallazgo histopatológico de tejido cardíaco de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A .con presencia de formas amantigotas intracelulares teñidas con coloración eosina hematoxolína en 100X

Es así como en tejidos frescos, solo se observó la amplificación con ambos juegos de iniciadores, tras la limpieza de la muestra con Fenol Cloroformo-Alcohol Isoamilico 24:1. En tejidos embebidos en parafina, tras la extracción de ADN con Salting Out solo se observó amplificación con los iniciadores S35/S36 (Tabla 6).

7.4 Análisis de las muestras de archivo

El ADN de las muestras de archivo fue extraído mediante el método de Salting Out descrito en el Anexo 9, para su posterior análisis mediante las pruebas de PCR (Tabla 7 y 8).

7.4.1 Muestras de archivo de ratones infectados con cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D. A 30 días post-infección

7.4.1.1 PCR TcH2AF/R

Después de extraer el ADN no fue posible detectar la presencia del parásito en ninguna de las muestras de archivo de los ratones en estudio, utilizando estos iniciadores. Es importante anotar que las pruebas de inhibición de estas muestras no evidenciaron la presencia de sustancias inhibitorias de la prueba de PCR.

7.4.1.2 PCR S35/S36

Utilizando estos iniciadores, fue posible detectar la presencia del parásito en todas las muestras de archivo a diferencia de la prueba TcH2AF/R, donde no se observó la amplificación del fragmento esperado de 330 pb (Figura 11)

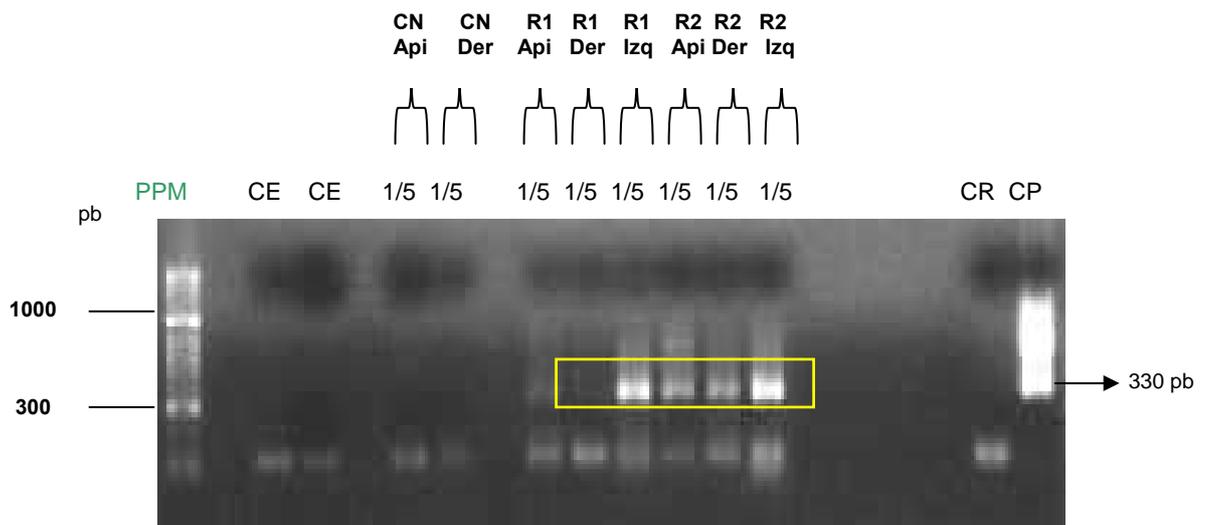


Figura 11. Resultados de la PCR S35/S36 en tejidos de archivo de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D. A, a los 30 días post-infección. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 20 µl del producto de amplificación a partir del ADN extraído por medio del método Salting Out Modificado y utilizando dilución (1/5) del ADN de las fracciones Apical (Api), Derecha (Der) e Izquierda (izq) de los ratones R1 y R2 infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D. A, control negativo del tejido fracción apical y Derecha, CE: Control de extracción CR: control de la reacción, en donde se utilizó como templado agua destilada, CP: control positivo, en donde se utilizó como muestra agua destilada y PPM patrón de peso molecular. Además se usó como marcador HyperLadder II con sus respectivos tamaños señalados a la izquierda.

7.4.2 Muestras de archivo de ratones infectados con cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D. A 60 días post-infección

7.4.2.1 PCR TcH2AF/R

Después de extraer el ADN no fue posible detectar la presencia del parásito en ninguna de las muestras de archivo de los ratones en estudio, utilizando estos iniciadores. Es importante anotar que las pruebas de inhibición de estas muestras no evidenciaron la presencia de sustancias inhibitorias de la prueba de PCR.

7.4.2.2 PCR S35/S36

Utilizando estos iniciadores, fue posible detectar la presencia del parásito en todas las muestras de archivo (Figura 12). Las muestras del ratón no infectado no mostraron bandas de amplificación.

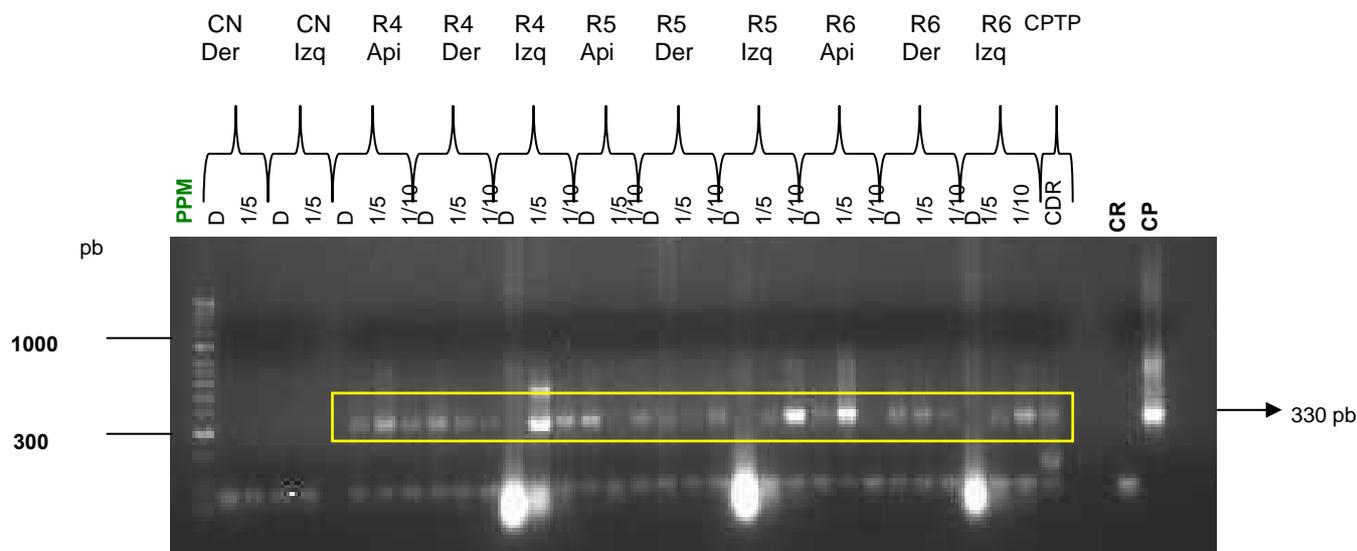


Figura 12. Resultados de la PCR S35/S36 en tejidos de archivo de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D. A, a los 60 días post-infección. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 20 μ l del producto de amplificación a partir del ADN extraído por medio del método Salting Out Modificado y utilizando ADN sin diluir ((Dir), diluido (Dil) 1/5 y diluido (Dil) 1/10 de las fracciones Apical (Api), Derecha (Der) e Izquierda (izq) de los ratones R4, R5 y R6 infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A, control negativo del tejido fracción Derecha e Izquierda, CPTP: control positivo tejido parafinado, CR: control de la reacción, en donde se utilizó como templado agua destilada, CP: control positivo, y PPM patrón de peso molecular. Además se usó como marcador HyperLadder II con sus respectivos tamaños señalados a la izquierda.

7.4.3 Muestras de archivo de ratones infectados con cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A 100 días post-infección

7.4.3.1 PCR TcH2AF/R

Después de extraer el ADN no fue posible detectar la presencia del parásito en ninguna de las muestras de archivo de los ratones en estudio, utilizando estos iniciadores.

7.4.3.2 PCR S35/S36

Empleando estos iniciadores, fue posible detectar la presencia del parásito en todas las muestras de archivo (Figura 13). Las muestras del ratón no infectado no mostraron bandas de amplificación.

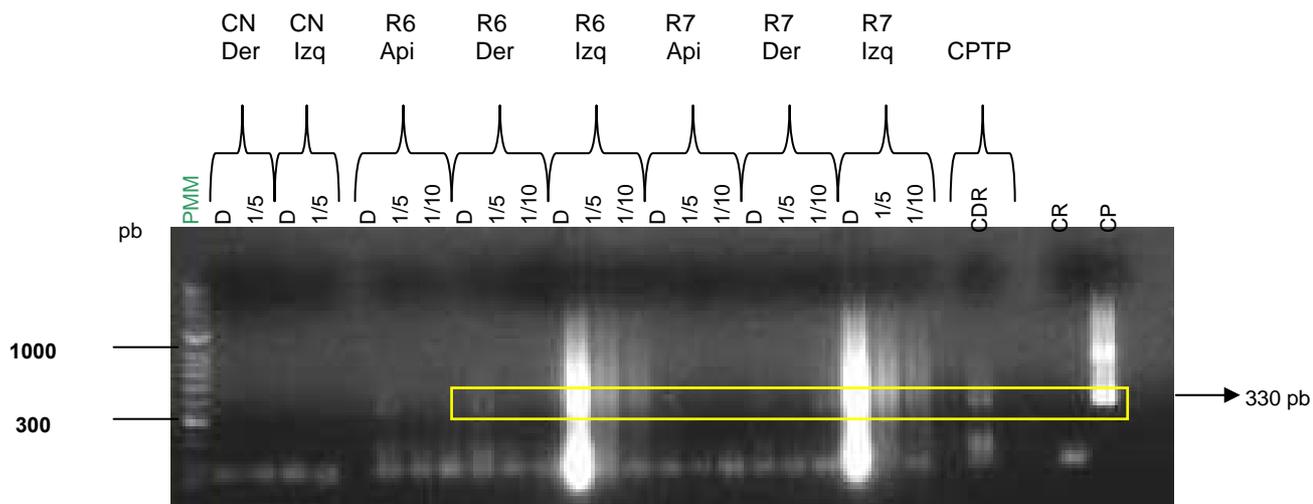


Figura 13. Resultados de la PCR S35/S36 en tejidos de archivo de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D. A, a los 100 días post-infección. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 20 µl del producto de amplificación a partir del ADN extraído por medio del método Salting Out Modificado y utilizando ADN sin diluir ((Dir), diluido (Dil) 1/5 y diluido (Dil) 1/10 de las fracciones Apical (Api), Derecha (Der) e Izquierda (izq) de los ratones R6,y R7 infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A, control negativo del tejido fracción Derecha e Izquierda, CPTP: control positivo tejido parafinado CR: control de la reacción, en donde se utilizó como templado agua destilada CP: control positivo y PPM patrón de peso molecular. Además se usó como marcador HyperLadder II con sus respectivos tamaños señalados a la izquierda.

7.4.4 Muestras de archivo de ratones infectados con cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D. A 150 días post-infección

7.4.4.1 PCR TcH2AF/R

Después de extraer el ADN no fue posible detectar la presencia del parásito en ninguna de las muestras de archivo de los ratones en estudio, utilizando estos iniciadores.

7.4.4.2 PCR S35/S36

Utilizando esta PCR, fue posible detectar la presencia del parásito en todas las muestras de archivo. El ratón no infectado no presento bandas de amplificación (Figura 14)

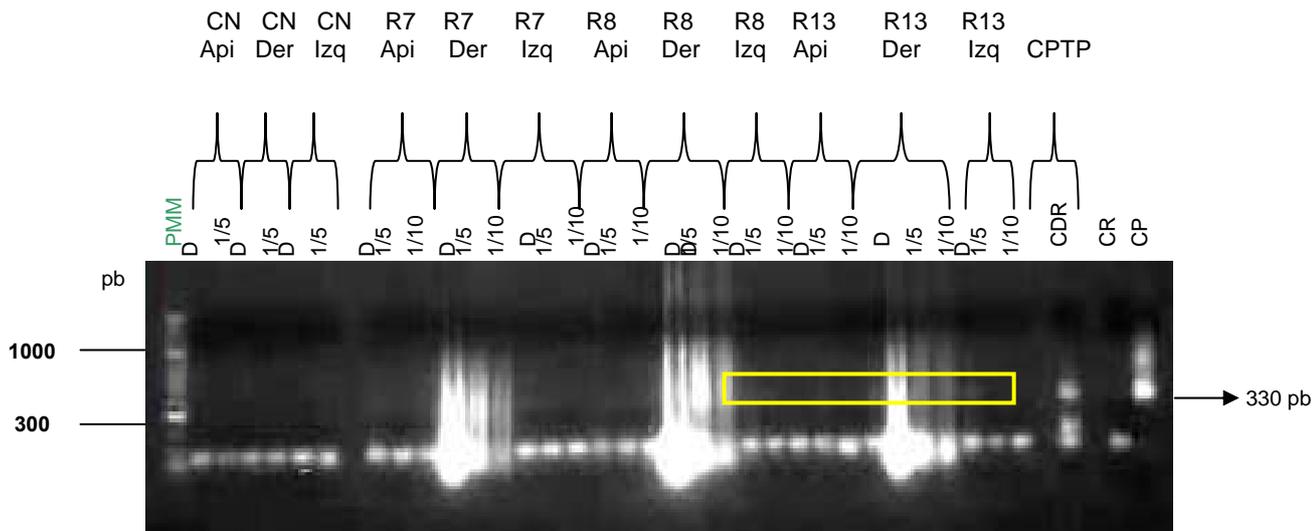


Figura 14. Resultados de la PCR S35/S36 en tejidos de archivo de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D. A, a los 150 días post-infección. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 20 µl del producto de amplificación a partir del ADN extraído por medio del método Salting Out Modificado y utilizando ADN sin diluir ((Dir), diluido (Dil) 1/5 y diluido (Dil) 1/10 de las fracciones Apical (Api), Derecha (Der) e Izquierda (izq) de los ratones R7,R8 y R13 infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A, control negativo del tejido fracción Apical, Derecha e Izquierda, CPTP: control positivo tejido parafinado CR: control de la reacción, en donde se utilizó como templado agua destilada, CP: control positivo y PPM patrón de peso molecular. Además se usó como marcador HyperLadder II con sus respectivos tamaños señalados a la izquierda.

7.4.5. Muestras de archivo de ratones infectados con Cepa *T. cruzi* II MHOM/BR/00/Y 30 días post-infección

7.4.5.1 PCR TcH2AF/R

Después de extraer el ADN no fue posible detectar la presencia del parásito en ninguna de las muestras de archivo de los ratones en estudio, utilizando estos iniciadores.

7.4.5.2 PCR S35/S36

Con esta PCR, fue posible detectar la presencia del parásito en todas las muestras de archivo. El ratón no infectado no presento bandas de amplificación (Figura 15).

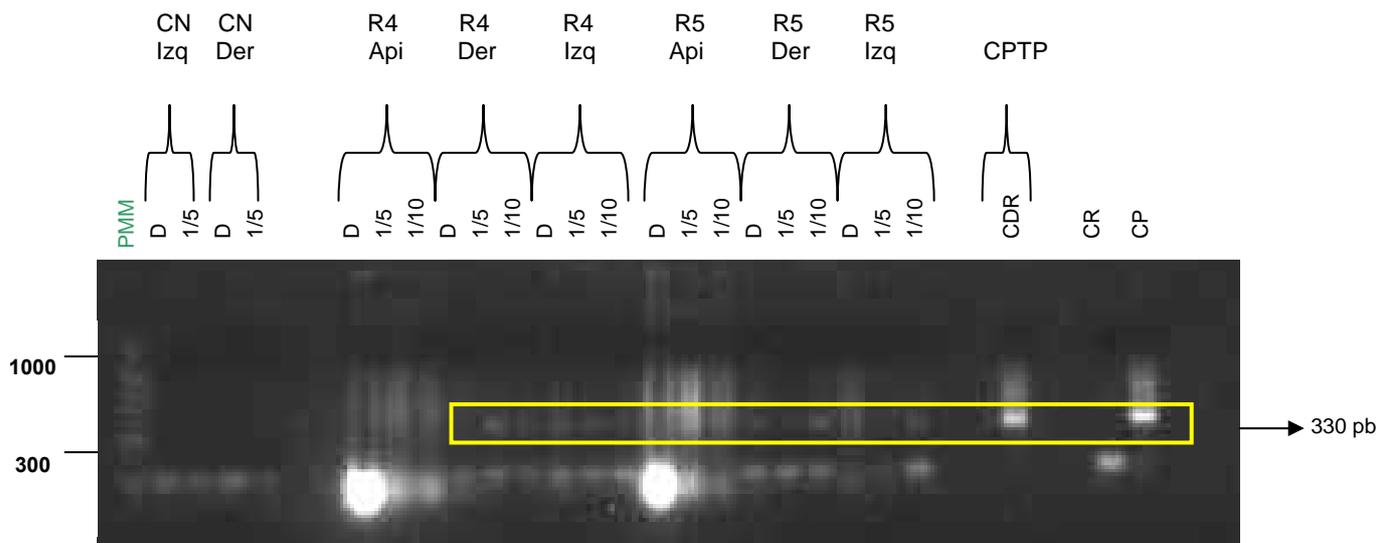


Figura 15. Resultados de la PCR S35/S36 en tejidos de archivo de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* II MHOM/BR/00/Y a los 30 días post-infección. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 20 μ l del producto de amplificación a partir del ADN extraído por medio del método Salting Out Modificado y utilizando ADN sin diluir ((Dir), diluido (Dil) 1/5 y diluido (Dil) 1/10 de las fracciones Apical (Api), Derecha (Der) e Izquierda (Izq) de los ratones R4, y R5, control negativo del tejido fracción Derecha e Izquierda, CPTP: control positivo tejido parafinado CR: control de la reacción, en donde se utilizó como templado agua destilada, CP: control positivo y PPM patrón de peso molecular. Además se usó como marcador HyperLadder II con sus respectivos tamaños señalados a la izquierda.

Tabla 7. Resultados de las PCR TcH2AF/R y S35/S36 y estudio histopatológico en tejido de archivo de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A

DISECCION	RATON	FRACCION	TcH2AF/R	S35/S36	ESTUDIO HISTOPATOLOGICO
30 DIAS	1	Apical	Negativo	Positivo	Positivo
		Derecha	Negativo	Positivo	Positivo
		Izquierda	Negativo	Positivo	Positivo
	2	Apical	Negativo	Positivo	Positivo
		Derecha	Negativo	Positivo	Positivo
		Izquierda	Negativo	Positivo	Positivo
	CN	Apical	Negativo	Negativo	Negativo
		Derecha	Negativo	Negativo	Negativo
		Izquierda	Negativo	Negativo	Negativo
60 DIAS	4	Apical	Negativo	Positivo	Positivo
		Derecha	Negativo	Positivo	Positivo
		Izquierda	Negativo	Positivo	Positivo
	5	Apical	Negativo	Positivo	Positivo
		Derecha	Negativo	Positivo	Positivo
		Izquierda	Negativo	Positivo	Positivo
	6	Apical	Negativo	Positivo	Positivo
		Derecha	Negativo	Positivo	Positivo
		Izquierda	Negativo	Positivo	Positivo
	CN	Apical	Negativo	Negativo	Negativo
		Derecha	Negativo	Negativo	Negativo
		Izquierda	Negativo	Negativo	Negativo
	100 DIAS	6	Apical	Negativo	Positivo
		Derecha	Negativo	Positivo	Positivo
		Izquierda	Negativo	Positivo	Positivo
7		Apical	Negativo	Negativo	Positivo
		Derecha	Negativo	Positivo	Positivo
		Izquierda	Negativo	Positivo	Positivo
CN		Apical	Negativo	Negativo	Negativo
		Derecha	Negativo	Negativo	Negativo
		Izquierda	Negativo	Negativo	Negativo

■ Diferencia entre la prueba de PCR y el estudio histopatológico

Continuación Tabla 7.

DISECCION	RATON	FRACCION	TcH2AF/R	S35/S36	ESTUDIO HISTOPATOLOGICO
150	7	Apical	Negativo	Positivo	Positivo
		Derecha	Negativo	Negativo	Positivo
		Izquierda	Negativo	Positivo	Positivo
	8	Apical	Negativo	Positivo	Positivo
		Derecha	Negativo	Negativo	Positivo
		Izquierda	Negativo	Positivo	Positivo
	13	Apical	Negativo	Positivo	Positivo
		Derecha	Negativo	Positivo	Positivo
		Izquierda	Negativo	Positivo	Positivo
	CN	Apical	Negativo	Negativo	Negativo
		Derecha	Negativo	Negativo	Negativo
		Izquierda	Negativo	Negativo	Negativo

■ Diferencia entre la prueba de PCR y el estudio histopatológico

Tabla 8. Resultados de las PCR TcH2AF/R y S35/S36 y estudio histopatológico en tejido de archivo de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* II MHOM/BR/00/Y 30 días post-infección

RATON	FRACCION	TcH2AF/R	S35/S36	ESTUDIO HISTOPATOLOGICO
4	Apical	Negativo	Positivo	Positivo
	Derecha	Negativo	Positivo	Positivo
	Izquierda	Negativo	Positivo	Positivo
5	Apical	Negativo	Negativo	Positivo
	Derecha	Negativo	Positivo	Positivo
	Izquierda	Negativo	Positivo	Positivo
CN	Apical	Negativo	Negativo	Negativo
	Derecha	Negativo	Negativo	Negativo
	Izquierda	Negativo	Negativo	Negativo

■ Diferencia entre la prueba de PCR y el estudio histopatológico

7.5 Comparación del análisis histopatológico y la prueba de PCR con los iniciadores TcH2AF/R Y S35/S36 para detectar *T. cruzi* en muestras de archivo

Se comparó el análisis histopatológico y la prueba de PCR con los iniciadores TcH2AF/R y S35/S36 para detectar *T. cruzi* en muestras de archivo de ratones infectados con *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A a los 30, 60, 100 y 150 días post-infección y *T. cruzi* II MHOM/BR/00/Y a los 30 días post-infección (Figuras 15 y 16).

Se observó que en los tejidos de archivo provenientes de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A, la PCR S35/S36 mostró un 90% de positividad con relación al estudio histopatológico; el cual fue analizado previamente a la inclusión en parafina, en cambio con la TcH2AF/R no se observó la presencia del parásito.

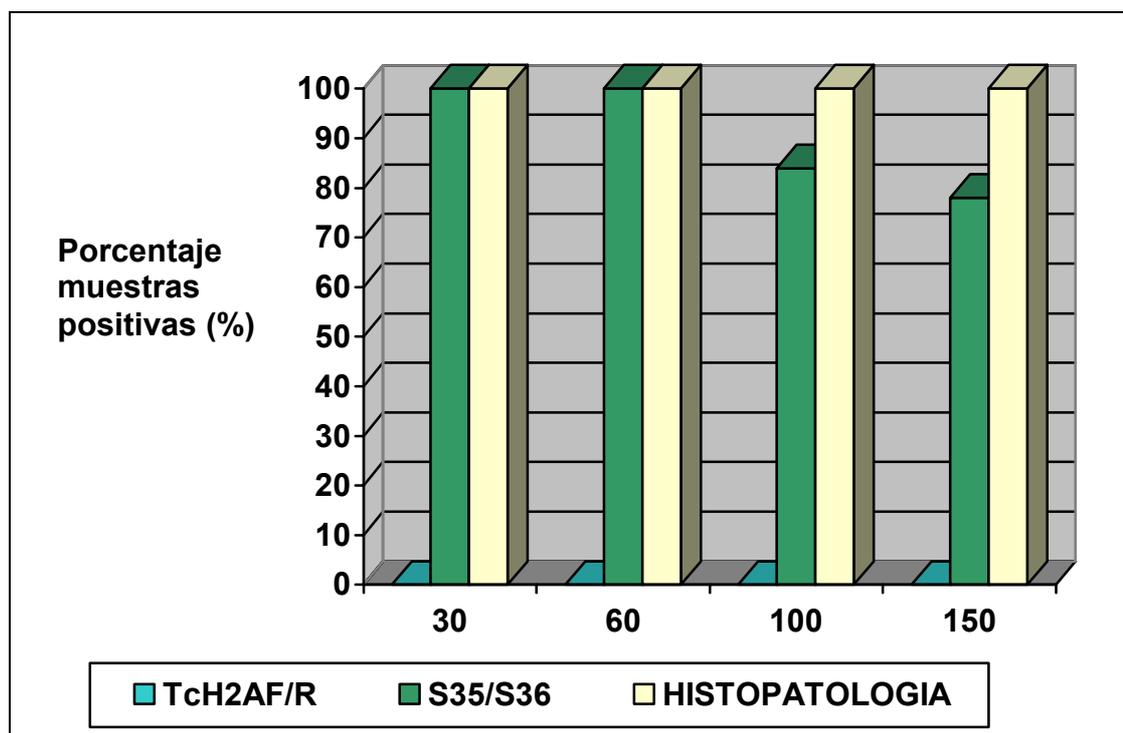


Figura 16. Comparación de los resultados de las PCR TcH2AF/R y S35/S36 y estudio histopatológico en tejidos de archivo de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A.

En las muestras de archivo de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* II MHOM/BR/00/Y se detectó el parásito solamente por la prueba de PCR S35/S36 , teniendo en cuenta el estudio histopatológico realizado a las muestra previamente a la inclusión en parafina.

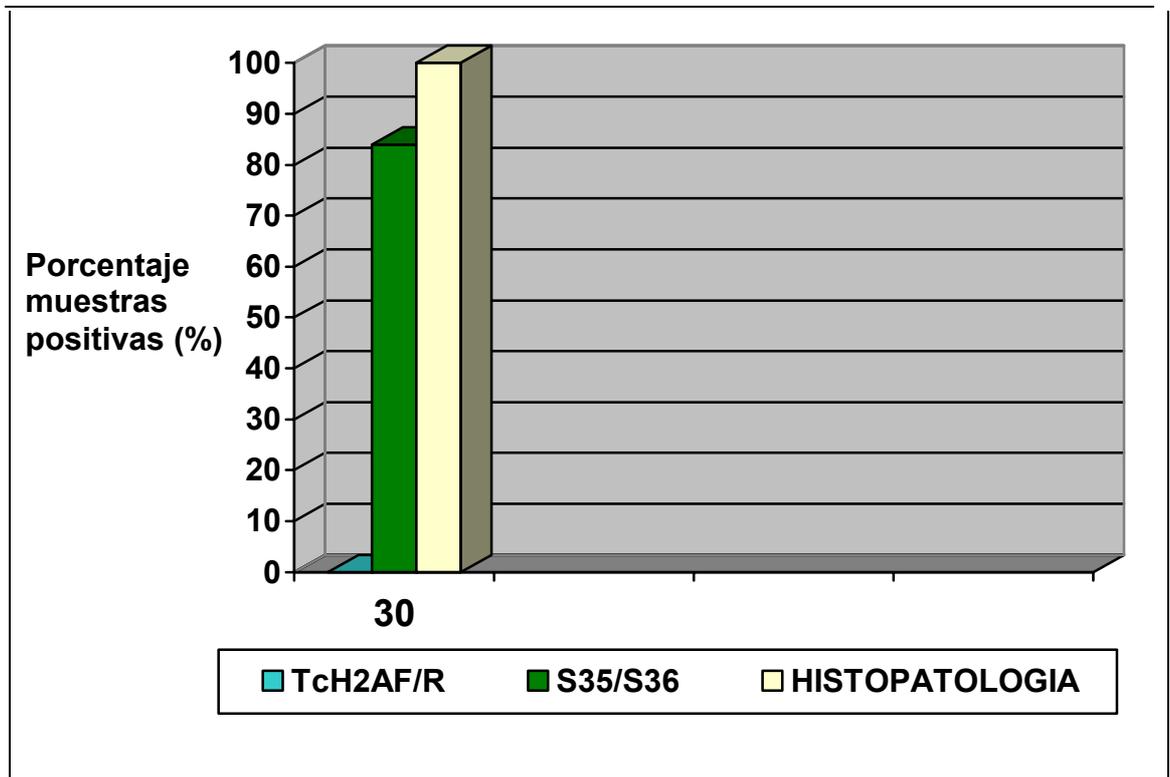


Figura 17. Comparación de los resultados de las PCR TcH2AF/R y S35/S36 y estudio histopatológico en tejidos de archivo de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* II MHOM/BR/00/Y

8. DISCUSION

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana afecta a millones de personas en Centro y Sudamérica. Aunque la mayoría de los pacientes sobreviven a la etapa aguda de la enfermedad, en la etapa crónica desarrollan complicaciones secundarias severas, debido principalmente a cardiopatía y megasindromes (Zuñiga et al.2007).

Las técnicas serológicas como ELISA, inmunofluorescencia directa e indirecta, no permiten diferenciar una reinfección y pueden presentar una baja especificidad debido a la reactividad cruzada con otros tipos de parásitos como *Leishmania* o diversos tripanosomas, es por esto que actualmente, la reacción en la cadena de polimerasa (PCR) es una excelente herramienta diagnóstica en cuanto a enfermedades infecciosas se trata ya que posee una alta sensibilidad y especificidad permitiendo un oportuno diagnóstico de la enfermedad en cualquiera de sus etapas.

Por otro lado, estudios basados en muestras incluidas en parafina, es otro campo en el cual la PCR a partir de muestras de tejidos tiene gran aplicabilidad, es por esta razón que el propósito de este trabajo fue evaluar la aplicación de las pruebas de PCR basados en los iniciadores TcH2AF/R (Pavía et al. 2003) y S35/S36 (Pavía et al. 2007) para la detección de *T. cruzi* en tejido embebido en parafina, con el fin de emplearse como herramientas diagnósticas para la enfermedad de Chagas, especialmente en el seguimiento de pacientes post-transplantados y análisis retrospectivos con muestras de archivo.

Teniendo en cuenta la dificultad que trae consigo trabajar muestras de tejido humano se tomó como primera aproximación el modelo murino el cual permite desarrollar y estudiar las fases agudas y crónicas de la enfermedad, además ofreciendo una gran ventaja por su fácil manipulación y mantenimiento.

Siendo de la mayor importancia para este estudio, el uso de los métodos adecuados de desparafinación de los tejidos; se ensayaron los métodos de

microondas y xileno/etanol, los cuales habían mostrado resultados exitosos en trabajos previos (Zafra et al. 2004 y Florez et al. 2004). Sin embargo, en este estudio se logró la desparafinación completa de los tejidos solamente con el método de xileno/etanol. Resultado que puede ser debido a que el uso solo de calor no es suficiente para retirar la totalidad de la parafina de los tejidos.

Posterior al proceso de desparafinación se procedió a la estandarización de la técnica para realizar la extracción de ADN, tanto de tejidos frescos como desparafinados y de archivo, paso esencial para la recuperación de material de calidad que permita la amplificación del ADN.

Es así como en primer lugar para tejidos frescos se ensayó el método de lisis alcalina, el cual había sido previamente utilizado con buenos resultados (Barrera et al. 2008).

Sin embargo, al realizar ambas pruebas de PCR en las muestras de ratones infectados con la cepa *T. cruzi* / MHOM/CO/2001/D.A a los 30 días post-infección, se observó que tan solo 1 de 3 ratones infectados presentaron la banda de amplificación esperada con ambos iniciadores. Resultado explicado por la presencia de sustancias inhibitoras de la reacción de PCR en las muestras. De tal forma que luego de tratar las muestras con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para extraer sustancias contaminantes como proteínas, éstas fueron amplificadas obteniéndose los fragmentos de 230 y 330 pb esperados con las pruebas de PCR TcH2AF/R y S35/S36, respectivamente.

Para el caso de las muestras de tejidos desparafinados y de archivo, teniendo en cuenta los pobres resultados obtenidos con el método de lisis alcalina y las desventajas del método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, en cuanto a su toxicidad, elevado costo e infraestructura necesaria para manipular dichas sustancias de forma adecuada, se optó por ensayar el método Salting Out, obteniéndose buenos resultados, al menos para el caso de la PCR S35/S36, con la cual se obtuvo el fragmento de amplificación esperado en las muestras de los ratones infectados.

Por último a este respecto, es oportuno mencionar la importancia de la lisis de los tejidos con proteasas que permitan la liberación del ADN de los complejos proteicos, paso impredecible previo a la extracción del ADN (García et al. 2006).

En cuanto a la evaluación de la infección de los ratones inoculados con la cepa *T. cruzi* I MHOM/CO/2001/D.A; se observó que esta cepa de acuerdo a lo previamente reportado por Barrera et al. 2008 posee un marcado tropismo por corazón, observándose miocarditis aguda severa en los 3 ratones infectados que sobrevivieron al estudio, con presencia de numerosas formas amastigotes del parásito. Se presentó mortalidad en 1 de los ratones infectados, para un porcentaje de 25%, muy similar a lo previamente reportado (Barrera et al. 2008). Llamativamente este ratón (R4) fue superado en los niveles máximos de parasitemia por los otros dos ratones que sobrevivieron, indicando que: (I) la carga parasitaria en sangre no es indicativo del grado de parasitemia de los tejidos o (II) el ratón R4 por sus condiciones intrínsecas individuales presentó más susceptibilidad a la enfermedad.

En el anterior sentido, es de importancia resaltar que a los 30 días post-infección se encontró una muy buena correlación entre los resultados de parasitemia por los métodos de microhematocrito y PCR en sangre. Hallazgo que puede obedecer a la elevada parasitemia que desarrollaron en general los animales.

En relación a los resultados de PCR en tejidos frescos de los anteriores ratones, se observó como luego de eliminar sustancias inhibitorias de la PCR, fue posible detectar el parásito con ambas PCR. Resultado que se correlaciona con los hallazgos histopatológicos en las cuales también, se observó la presencia del parásito en el corazón de los tres animales infectados.

Sin embargo, mediante el análisis de las muestras desparafinadas de este grupo de ratones y de todas las muestras de archivo ensayadas, solo fue

posible detectar la presencia del parásito mediante la prueba de PCR S35/S36, resultados que pueden explicarse por: (I) La presencia de un mayor número de moléculas blanco para los iniciadores S35/S36 que para los iniciadores TcH2AF/R (Pavía et al. 2007), lo cual aumenta la sensibilidad de la prueba de PCR S35/S36, (II) los blancos moleculares, elemento SIRE de la prueba TcH2AF/R puede ser más susceptible a la desintegración durante el proceso de fijación de los tejidos. Se sabe que tanto el tipo de fijador como los tiempos de fijación, afectan de forma importante la integridad de los ácidos nucleicos, siendo el etanol al 70% una de las mejores opciones por cuanto a diferencia del formaldehído, no produce entrecruzamiento de ácidos nucleicos y proteínas; no hidroliza puentes de fosfodiéster del ADN y no modifica covalentemente el ARN por adición de grupos mono metilos en las bases (Feldman. 1973, Douglas y Rogers 1998, Masuda et al. 1999) y (III) el método de Salting Out puede no ser óptimo cuando hay poca cantidad de ADN en la muestra.

Por otra parte, al analizar la concordancia de los resultados de la prueba de PCR entre las muestras de archivo y las muestras procedentes de tejidos frescos previamente reportados por Barrera et al. (2008); en las cuales se pudo detectar la presencia del parásito por ambas PCR, vale la pena resaltar para el caso de las muestras de los ratones infectados con la cepa *T. cruzi I* MHOM/CO/2001/D.A que el análisis de los tejidos frescos demostró presencia del parásito por ambas pruebas de PCR en todas las muestras. Hallazgo que sugiere que en lo referente a las muestras de archivo, muy seguramente los procesos de fijación del tejido, desparafinación o extracción están disminuyendo el poder de detección de esta PCR TcH2AF/R, debido ya sea a la presencia de sustancias inhibitorias de esta PCR en particular, o a la fragmentación de las moléculas de ADN.

Para el caso de las muestras de los ratones infectados con la cepa *T. cruzi II* MHOM/BR/00/Y, al igual que este estudio, en los trabajos de Barrera et al. (2008) solo fue posible detectar la presencia del parásito con la prueba de PCR S35/S36. Resultado que sugiere que además de la presencia de sustancias

inhibidoras de esta PCR en la muestra, y posible disminución del ADN, en este caso muy posiblemente había menor número de parásitos en los tejidos.

Finalmente, la PCR S35/S36 puede ser usada como herramienta complementaria a la histopatología en el hallazgo de *T. cruzi* en muestras de tejido parafinado para fines como el seguimiento de la reactivación de la enfermedad de Chagas en pacientes transplantados o en el diagnóstico e investigación en patología molecular.

9. CONCLUSIONES

- El método de xileno/etanol para desparafinar a los tejidos, seguido de lisis proteica y extracción de ADN por la técnica de Salting Out, permitió la amplificación de los fragmentos esperados con la prueba de PCR S35/S36 en las muestras de tejido cardíaco de los ratones infectados con el parásito.
- La evolución de la infección por la cepa *T. cruzi* / MHOM/CO/2001/D.A en los ratones se comportó de acuerdo a lo esperado, mostrando un marcado tropismo hacia corazón.
- La prueba de PCR S35/S36 puede ser aplicada para la detección del parásito tanto a partir de sangre como de tejido fresco y tejido parafinado.

10. RECOMENDACIONES

Dados los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda:

1. Evaluar otro método de extracción como triple fenol: cloroformo alcohol isoamilico para la extracción de ADN del parásito de tejidos desparafinados y posterior amplificación con los iniciadores TcH2AF/R.
2. Estudiar la posible interferencia del tipo de fijador y el tiempo de fijación de los tejidos en el desempeño de la prueba TcH2AF/R.
3. Evaluar el desempeño de la prueba de PCR S35/S36 en muestras de tejido humano para la detección del parásito.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALTCLAS JE; BARCAN N; NAGEL C; LATTES R; RIARTE A. 2007. Organ Transplantation and Chagas disease. JAMA, Nov 17. 298:271-281.

ANDRADE SG. 1999. *Trypanosoma cruzi*: Clonal structure of parasite strains and the Importance of principal clones. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94: 185-187.

ANDRADE Z A. 1999. Immunopathology of Chagas Disease Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94: 71-80.

ARMAS Y; CAPÓI V; GONZÁLEZ E; MEDEROS L; DÍAZ R. 2006. Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. ADN de tejidos en parafina por resina quelante. Rev Esp Patol. 39: 171-174.

BARRERA J; GUEVARA J; PUERTA C; PAVIA P. 2008. Evaluación de la aplicabilidad de una prueba de PCR para la detección de *Trypanosoma cruzi* en tejido cardíaco de ratón. Tesis de pregrado. Carrera de Bacteriología Pontificia Universidad Javeriana.

BENVENUTI LA; ROGGERIO A; SAMBIASE NV; FIORELLI A; HIGUCHI MDE L. 2005. Polymerase chain reaction in endomyocardial biopsies for monitoring reactivation of Chagas disease in heart transplantation: a case report and review of the literature. Cardiovasc Pathol. 14:265-268.

BESTETTI RB; CURY PM; A.D TATIANA; THEODOROPOULOS; VILLAFANHA D. 2004 *Trypanosoma cruzi* myocardial infection reactivation presenting as complete atrioventricular block in a Chagas' heart transplant recipient. Science Direct. Cardiovascular Pathol. 13: 323-326

BONIN S; PETRERA F; NICCOLINI B; STANTA G. 2003 PCR analysis in archival postmortem tissues. J Clin Pathol: Mol Pathol 56: 184-186.

BRENIERE SF; BOSSENO MF,TELLEIRA J;CARRASCO R; VARGAS F; YAKSIC N, NOIREAU F 1995. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosomai cruzi* in Bolivian triatomines. AM J Trop Med Hyg 53: 179-184.

BULCÃO AA; LINDOSO PORTELA E; SHIKANAI YASUDA MA. 2003. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. Rev Saúde Pública. 37:107-15.

CAMANDAROBA EL; PINHEIRO LIMA CM; ANDRADE SG. 2002. Oral transmisión of Chagas disease: importante of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 44: 97-103.

CASTRO AM; LUQUETTI AO; RASSI A, RASSI GG; CHIARI E; GALVAO LM. 2002. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 88:894-900.

CHIARPENELLO J. (2004). Enfermedad de Chaga (Tripanosomiasis Americana). En: Evid actual. 7: 114-119.

CEVALLOS AM, HERNÁNDEZ R. 2003. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Revisión. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. pg 1-10.

COOMBS N. J; GOUTH; PRIMROSE J. N. 1999. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. Nucleic Acids Research. 16: 1-3.

COURA JR. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed A background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 102: 113-122.

DIAZ C; NUSSENZWEIG V; GONZALEZ A. 1992 An improved polymerase chain reaction assay detect *Trypanosoma cruzi* in blood. Am J Trop Med Hyg 46:616-623.

DIAS JCP; SCHOFIELD CJ. 1999. The Evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 Years since Carlos Chagas Discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94: 103-121.

DOUGLAS MP; ROGERS SO. 1998. DNA damage casual common cytological fixatives. Mutat Res 401: 77-88.

FELDMAN MY. (1973) Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. Res Mol Biol. 13: 1-49.

FLOREZ VO, GONZALEZ CI. 2004. Amplificación por PCR de tejidos de archivo: efecto de los fijadores. Revista Fac de Salud UIS, Bucaramanga-Colombia. 36: 56-64.

GARCÍA MP; BENAVENTE MF; MELO AA; ROA EI; ROA S JC. 2006. Effect of fixation on DNA quality: controlled study with five fixatives. Rev Esp Patol. 39: 3 175-179.

GAUNT MICHAEL; MILES MICHAEL. 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 95: 557-565.

GIL J; PAVIA P; MONTILLA M; FLOREZ AC; QUINTERO C; MERCADO M; VACCA MI; NICHOLLS S; PUERTA C. 2007. Comparación de una prueba de

PCR basada en los genes codificantes para la histona H2A/SIRE con pruebas serológicas convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica en pacientes Colombianos. *Biomedical* 27 (supl. 1) 83-91.

GOMES ML; GALVAO L M. C; MACEDO AM; PENA S D. J; CHIARI EGLER. 1999. Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am.J Trop Med Hyg.* 60:205–210.

GUHL F; VALLEJO G A. 1999. Interruption of Chagas Disease transmission in the Andean countries: Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94: 413-415.

HOYOS R; PACHECO L; AGUDELO L; ZAFRA G; BLANCO; TRIANA O. 2007. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas y factores de riesgo asociados en una población de Morroa, Sucre. *Biomedica.* 27: 130-136.

JANSEN AM; SANTOS DE PINHO AP; VARELLA LC; CUPOLILLO E; MANGIA HELENA; FERNÁNDEZ O. 1999. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a Still unsolved puzzle *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94: 203-20.

KIRCHHOFF LV; VOTAVA JR; OCHS DE; MOSER DR 1996. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol.* 34: 1171-1175.

MACEDO AM; MACHADO CR; OLIVEIRA RP; PENA S DJ. 2004. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99: 1-12.

MASUDA N; OHNISHI T; KAWAMOTO S; MONDEN M; OKUBO K. 1999. Analysis of chemical modification of RNA from formalin fixed samples optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic acids. Res* 27: 4436-4446.

MEIRA VENDELL S F C; GALVAO C.H; GONTIJO ED; MACHADO-COELHO G L; NORRIS KA; CHIARI EGLER. 2004. Use of the *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein to evaluate therapeutic efficacy following treatment of chronic chagasic patients. *Clinical Microbiol.* 42: 707-712.

MILES M.A. 1999. Chagas disease, The agent, En Gilles H, Protozoal diseases. Editorial Arnold. New York, USA. 313-322.

MONCAYO A. 2003. Chagas disease: Current epidemiological trends after the Interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98: 577-591.

MOSER DR; KIRCHHOFF LV; DONELSON JE. 1989. Detection of *T. cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 27: 1477-1482.

MURTHY VK; DIBBERN KM; CAMPBELL DA. 1992 PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. Mol Cell Probes 6:237-243.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (OMS) 2007. Reporte sobre Enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Argentina.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS) Control de la enfermedad de Chagas, Informe de un Comité de Expertos. Serie de Informes Tecnicos. Ginebra 2002, No 905.

PAVIA P; CUERVO C; MONTILLA M; NICHOLLS; PUERTA. C. 2003. Diseño y estandarización de una prueba de PCR para detección específica de *Trypanosoma cruzi*. Infection. 7: 129-135.

PAVIA P; VALLEJO GA; MONTILLA M; NICHOLL RS; PUERTA CJ. 2007. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of histone H2A/SIRE and the sno-RNA-C11 genes. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 49:23-30.

PIZARRO JC; LUCERO D E; LORI STEVENS. 2007. PCR reveals significantly higher rates of *Trypanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector, *Triatoma infestans*: High rates found in Chuquisaca, Bolivia BMC Infectious Diseases. 7:66 1-8.

PROFETA ZM. 1999. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. Curso latinoamericano sobre enfermedades infecciosas, Mem Inst Oswaldo Cruz. 94: 295-298.

RODRÍGUEZ EM; BRICEÑO LUIS CHIURILLO; MIGUEL ANGEL MOSCA, WALTER, CAMPOS YELITZA. 2004. Curso Latinoamericano sobre enfermedades infecciosas. Tripanosomiasis Americana: Aspectos teóricos Instituto de Biomedicas. Caracas Venezuela 1-27

RODRIGUEZ S IP y BARRERA S HA. 2004. La reacción en la cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL. 2: 323-335.

SOUTO RP; FERNANDES O; MECEDO AM; CAMPBELL DA; ZINGALES B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 83:141-152.

SOUTO RP; VARGAS N; ZINGALES B. 1999. *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. Exp Parasitol. 91: 306-314.

SCHIJMAN AG; VIGLIANO CA; VIOTTI RJ; BURGOS JM; BRADARIZ S; LOCOCO BE; LEZE MI; ARMENTI HA; LEVIN MJ. 2004. *Trypanosoma cruzi*

DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic Chagas heart disease. *Am J Trop Med Hyg.* 70:210-220.

SILBER AM; BUA J; PONCEL BM; SEGURA EL; RUIZ AM. 1997. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Exp Parasitol.* 85:225-232.

STORINOA R; AUGERB S; CARAVELLOB O; URRUTIAA MI; SAN MARTINOA M; JORGC. 2002. Cardiopatía chagásica en pacientes de área endémica versus contagiados en forma ocasional. *Rev Saúde Pública.* 36:755-758.

STURM NR; DEGRAVE W; MOREL C; SIMPSON L. 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cell by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol.* 33: 205-214.

TEIXEIRA ANTONIO RL; NASCIMENTO RJ; STURM NR. 2006. Evolution and pathology in Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 10: 463-491.

VAGO AR; ANDRADE LO; LEITE AA; D'AVILA REIS D; MACEDO AM; ADAD SJ; TOSTES S JR; MOREIRA MC; FILHO GB; PENA SD. 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol.* 156: 1805-1809.

VALLEJO GA. 1998. Estudios comparativos entre las secuencias de kDNA de *trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* y su aplicación en el diagnóstico molecular de la tripanosomiasis Americana. *Actual Biol.* 20:43-56.

VALLEJO GA; GUHL F; CHIARI E; MECEDO AM. 1999. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian host by polymerase chain reaction amplification of Kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop.* 72:203-212.

VEAS F; BRENIERE SF; CUNY G; BRENGUES C; SOLARI A; TIBAYRENC M. 1991. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Cell Mol Biol.* 37:73-84.

WINCKER P; BRITTO C; PEREIRA JB; CARDOSO MA; OELEMANN W; MOREL CM. 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 51: 771-777.

ZAFRA SG; FLOREZ VO; GONZALEZ RUGELES CI. 2004. Influencia del método de desparafinación y el tiempo de almacenamiento en la extracción de

DNA a partir de tejidos de archivo. Facultad de Salud UIS, Bucaramanga, Colombia. 36: 73-7.

ZUÑIGA C; CEPEDA R; PALÁU MT; VERA A; MEJÍA J; VERGARA U. 2007. Efecto protector de una cepa no virulenta de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. Arch Med. 39: 77-82.

ANEXO 1

INFECCION DE LOS RATONES CON *Trypanosoma cruzi*

1) Se debe inmovilizar el ratón, esta inmovilización se debe hacer cogiendo el ratón por la zona caudal a la altura de las orejas, como en una llave: se aconseja manipular el ratón encima de la jaula, con el fin de que este se fije por sus propios medios a la jaula y sea mas sencilla la inmovilización; se debe tener especial cuidado también de inmovilizar la cola, ya que el animal al moverla puede mover también las extremidades inferiores y obstaculizar así la inoculación.

2) Antes de realizar la inoculación de los parásitos se aconseja sacar el aire que pueda contener el inóculo en la jeringa , ya que si se deja en esta se corre el riesgo de matar al ratón por inoculación con aire lo que podría interrumpir el experimento que se este realizando.

3) La inoculación debe ser interperitoneal (IP), con la precaución de no punzar el estomago, pero tampoco el hueso de la pata.

4) La jeringa no debe penetrar muy profundamente el animal y se debe tener especial cuidado en el momento de ingresar la jeringa, esta debe estar bien inclinada con respecto al ratón y no vertical, ya que si la jeringa se maneja de esta manera, se podría correr el riesgo de que esta, traspase el animal y el inóculo ingrese en la mano de la persona que esta manipulando al ratón.

5) Una vez realizado el procedimiento, se descarta la aguja con el capuchón en un recipiente y la jeringa en el guardián, según el protocolo de manipulación de jeringas del bioterio del INS.

Protocolo, suministrado por la Dra Marleny Montilla m. (Bióloga Msc)perteneiente al grupo de investigación de parasitología del Instituto Nacional de Salud

ANEXO 2

MICROHEMATOCRITO

1. Tomar muestra de sangre en capilares con anticoagulante heparina
2. Centrifugar por dos minutos en microcentrifuga a 3000 rpm
3. Tomar el capilar y cortarlo en la parte intermedia entre la fase que contiene los glóbulos rojos y los glóbulos blancos.
4. Descartar la parte de los glóbulos rojos
5. Vaciar el capilar y montar en cámara de Neubauer para realizar el recuento de parásitos.

ANEXO 3

COLORACION DE GIEMSA:

1. Tomar una pequeña gota de sangre de la cola del ratón,
2. Colocar en una lamina portaobjetos
3. Proceder a realizar el extendido
4. Colorear.
5. Dejar secar

Coloración

Fijar las laminas con Metanol entre 20 minutos y dejar hasta que seque, posteriormente se la adicionaba el colorante Giemsa a las laminas, dejar que actué por 45 minutos, pasado este tiempo se procede a lavar con agua corriente

ANEXO 4

DISECCION ANIMALES

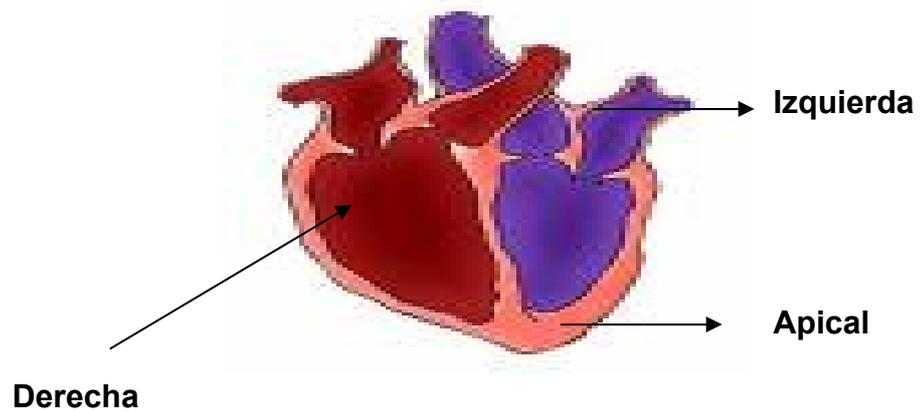
Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Una vez muerto, el ratón fue fijado a una superficie. Se realizó una abertura del abdomen con el fin de retirar: hígado, bazo, intestino grueso, corazón, y músculo esquelético

Este procedimiento se llevó acabo en una cámara de flujo laminar en el bioterio del Instituto Nacional de Salud bajo la supervisión de personal experto.

ANEXO 5

CORTE DE TEJIDO CARDIACO

1. El corazón fue dividido en tres fracciones: Apical, Izquierda y Derecha



2. Cada fracción fue dividida en dos partes, una se remitió a patología conservada en formol taponado al 10%; la otra se utilizó para la extracción de ADN.

ANEXO 6

METODO DE DESPARAFINACION EN MICROONDAS

1. Se añadió 200 µl de Tween 20 al 5.0% a la sección del tejido y se agitó
2. Calentar en microondas de 600 W durante 2 minutos
3. Centrifugar a 6.000 g durante 15 minutos
4. Enfriar en Hielo por 2 minutos
5. Remover el disco de parafina
6. Transferir el tejido a otro tubo
7. Realizar dos lavados con PBS.
8. Finalmente se procedió a extraer el tejido por medio del método más eficiente para dicho procedimiento.

ANEXO 7

DESPARAFINACION DEL TEJIDO CON XILENO /ETANOL

1. Agregar 1000 μ l de xilol a cada sección
2. Agitar fuertemente
3. Poner a temperatura ambiente por 1 hora
4. Centrifugar a 12000 g por 3 minutos
5. Retirar el sobrenadante
6. Nuevamente agregar 1000 μ l de xilol a cada sección, nuevamente
7. Agitar fuertemente
8. Dejar a temperatura ambiente por 1 hora
9. Centrifugar a 12000 g por 3 minutos
10. Retirar el sobrenadante
11. Realizar un lavado con Etanol
12. Centrifugar a 12000 g por 3 minutos
13. Colocar a secar a temperatura ambiente
14. Lavar con PBS 2 veces

ANEXO 8

LISIS DE LOS TEJIDOS DESPARAFINADOS

1. A los tejidos macerados se les adicionó 114 o 228 μ l de solución de digestión (tris-HCL 100 mM, EDTA 40 Mm pH 8.0, SDS 5%, proteínasa K 20 mh/ml), a 60° durante 1 a 2 días.
2. Centrifugar a 2.000g por 1 minuto para remover exceso de proteínas
3. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo.
4. Se procedió a realizar la extracción de ADN.

ANEXO 9

EXTRACION ADN EN TEJIDO PARAFINADO SALTING OUT

1. Se homogenizó el tejido desparafinado y lisado en 150 o 300 µl de acetato de sodio 5M
2. Centrifugar por 5 minutos a 5000 g
3. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio
4. Añadir 400 u 800 µl de Isopropanol
5. Incubar a -70° C por una hora
6. Centrifugar por 10 minutos a 4 grados a 5000 g
7. Descartar el sobrenadante
8. Lavar con etanol al 70%
9. Centrifugar por 10 minutos a 4 grados a 5000 g
10. Remover el etanol al 70% y dejó secar aproximadamente por una hora a 37°C
11. Resuspender en 30-50 µl de agua destilada.
12. Proceder a realizar la amplificación del ADN por PCR.

ANEXO 10

EXTRACION ADN EN TEJIDO PARAFINADO TRIPLE FENOL CLOROFORMO

1. Se colocó Fenol - cloroformo de acuerdo al volumen final de la muestra
2. Centrifugar por 5 minutos a 12 r.p.m
3. Realizar 2 alicotas de fenol cloroformo
4. Sacar el sobrenadante
5. Transferir a un tubo nuevo
6. Tomar el sobrenadante y se adiciono cloroformo
7. Centrifugar por 5 minutos a 12000 r.p.m
8. Sacar el sobrenadante a u nuevo tubo y se adicionar 10% de Acetato de Sódio 3M PH 6.0 y fenol
9. Mover el tubo para ver formación de la malla de ADN.
10. Centrifugar por 30 minutos a 10000 r.p.m
11. Refrigerar a -20° C por un día.
12. Al día siguiente se centrifugó por 30 minutos a 10000 r.p.m
13. Se adicionó etanol al 70%
14. Centrifugar por 15 minutos a 10000 r.p.m
15. Observar la presencia del botón para ser resuspendido en agua destilada.

ANEXO 11

EXTRACCION ADN LISIS ALCALINA

Se maceró el tejido muy bien, posteriormente se colocó el macerado en viales plásticos nuevos y estériles, se mezcló con 300 µl de NaOH 50 mM, llevando a ebullición por 10 minutos. Al término de este tiempo, se procedió a adicionar 50 µl de TRIS-HCL 10 Mm

Finalmente, se centrifugó a 3000 r.p.m por 1 minuto, extrayéndose el sobrenadante para llevar a cabo la reacción de amplificación.

Las muestras no procesadas son mantenidas en refrigeración a 4° C hasta su procesamiento.

ANEXO12

Iniciadores TcH2A F/R

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
Amortiguador PCR	10X	2,5	1x
dNTP	1 mM	5,0	200 μ M
Cebador S35	5 pmol / μ l	4,0	20 pmoles
Cebador S36	5 pmol / μ l	4,0	20 pmoles
Cloruro de magnesio	25mM	1,5	1,5 mM
Taq polimerasa	5 unidades// μ l	0,25	1,25 unidades// μ l
ADN	-	5,0	50-200 ng
Agua	-	2,75	
Volumen final	-	25	

1. Realizar PCR utilizando la pre-mezcla incluida en la tabla anterior.
2. Descongelar por completo los reactivos en hielo y mezclar antes de su uso.
3. Adicionar 20 μ l (MIX es decir, la mezcla de los reactivos mencionados en la tabla, el cual se realizará de acuerdo a la cantidad de muestras a procesar) en cada tubo de PCR y llevar cerrado al laboratorio para adicionar el ADN.
4. Posteriormente colocar en el termociclador, correr el programa adecuado según el tamaño del fragmento a amplificar.
5. Retirar los tubos del termociclador y mantener a 4° C en nevera hasta su posterior análisis.

ANEXO 13

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

1. Pesar 1,5 g de azarosas para un volumen de 100 μ l (98 ml de agua destilada y 2 ml de buffer TAE 50 X) y calentar durante 1 minuto en horno microondas.
2. Antes de gelificar, agregar 3 μ l de bromuro de etidio por cada 100 ml de gel.
3. Servir en el soporte del gel colocando los peines adecuados. Una vez gelificada la agarosa, colocar en la cámara de corrido con el amortiguador TAE 1X.
4. Sembrar las muestras usando amortiguador de carga 1X usando 3 μ l por cada 20 μ l de muestra.
5. Conectar electrodos y dejar correr a 110 voltios y 80 mAmp por 45 minutos.

ANEXO 14

Iniciadores S35/S36

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
Amortiguador PCR	10X	2,0	0.8%
Dntps	1 mM	5,0	200 μ M
Cebador S35	5 pmol / μ l	5,0	25 pmol
Cebador S36	5 pmol / μ l	5,0	25 pmol
Cloruro de Magnesio	25mm	2,8	3,5 mM
Taq polimerasa	5 unidades/ μ l	0,1	0,5 unidades
ADN	50 ng	5,0	125 ng
Agua	-	0,1	0,1
Volumen Final	-	25	

1. Realizar PCR utilizando la pre-mezcla incluida en la tabla anterior.
2. Descongelar por completo los reactivos en hielo y mezclar antes de su uso.
3. Adicionar 20 μ l (MIX, es decir, la mezcla de los reactivos mencionados en la tabla, el cual se realizará de acuerdo a la cantidad de muestras a procesar) en cada tubo de PCR y llevar cerrado al laboratorio para adicionar el ADN
4. Posteriormente colocar en el termociclador, correr el programa adecuado según el tamaño del fragmento a amplificar.
5. Retirar los tubos del termociclador y mantener a 4^o C en nevera hasta su posterior análisis.

}

		1en20		
		1en 40	Negativa	
	Derecha	Directa		Negativa
		1en 5		Positiva
		1en10	Negativa	Positiva
		1en20	Negativa	
		1en 40		
	Izquierda	Directa		Positiva
		1en 5		Positiva
		1en10	Negativa	Positiva
		1en20	Negativa	
		1en 40		
R5	Apical y otros	Directa		Negativa
		1en 5		Negativa
		1en10		Negativa
		1en20		
		1en 40	Negativa	
	Derecha	Directa		Positiva
		1en 5		Positiva
		1en10	Negativa	Positiva
		1en20	Negativa	
		1en 40		
		1en10		
	Izquierda	Directa		Negativa
		1en 5		Positiva
		1en10	Negativa	Positiva
		1en20	Negativa	
		1en 40		
CN	Derecha	Directa	Negativa	Negativa
		1en 5	Negativa	Negativa
		1en10		
		1en20		
		1en40		
	Izquierda	Directa	Negativa	Negativa
		1en 5	Negativa	Negativa
		1en10		
		1en20		
		1en40		