



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

IMPLEMENTACIÓN DE UNA PRUEBA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN DE ADN SATÉLITE DE *Trypanosoma*
cruzi EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE VECTORES INFECTADOS
(Modalidad: Tesis de Grado)

Anástasis María Estaba Salazar

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2012

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	10
Obtención de las heces de los triatominos	10
Xenodiagnóstico artificial.....	10
Extracción y purificación de ADN de las muestras de heces preservadas en papel de filtro.....	11
Extracción y purificación de ADN de cultivo de epimastigotes (aislado CHHP) ..	12
Extracción con WizardGenomic DNA Purification Kit (Promega).....	13
Amplificación de ADN satélite de <i>T. cruzi</i>	14
Electroforesis de ADN en geles de agarosa	15
Análisis de datos	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29
APÉNDICES.....	35
HOJA DE METADATOS	37

AGRADECIMIENTOS

A

La profesora MariolgaBerrizbeitia, quien me ofreció la oportunidad de realizar este trabajo y con la paciencia y comprensión de una madre no dejó de brindarme su apoyo hasta el final.

El Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud del estado Anzoátegui y la profesora Arleth Pozo, Leomery Romero y Alicia Jorquera, por ofrecerme sus conocimientos y por su gran aporte en esta investigación.

Los profesores Jessica Rodríguez, Militza Guzmán, Lorena Abadía, Antonio Maldonado y HectorinaRodulfo, por su valiosa contribución y ayuda en el desarrollo de este trabajo.

Mis compañeras tesistas del Laboratorio de Diagnóstico Serológico de Enfermedades Infecciosas del Postgrado en Biología Aplicada de la Universidad de Oriente, por su compañía y ayuda en los largos días de trabajo.

DEDICATORIA

A

Dios, mi padre, que con su infinito amor, bondad y paciencia me ha permitido comprender que de nada vale la inteligencia y los conocimientos si no pongo primero mi fe en él.

Mi madre, Milena, quien me apoyó incondicionalmente a pesar de las limitaciones, me enseñó a ser quien soy y siempre me tuvo presente en sus oraciones.

Mi novio, Jonny, que desde el principio estuvo a mi lado dándome ánimos para no decaer y con paciencia y cariño me ayudó cuando más lo necesitaba.

Mis hermanas y a mis sobrinos, porque me inspiran y me dan la alegría en los momentos de tristeza y de querer volver a casa.

Mi padre, por ser un gran ejemplo a seguir y por darme buenos consejos.

Mis mejores amigos Martín, Bianca, Maricruz, Fideines, Renato y José, porque han sido mi familia y mi compañía durante estos 5 años, gracias.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los resultados obtenidos con la prueba de PCR para la detección de ADN satélite de <i>T. cruzi</i> en muestras de heces de vectores.....	24
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Productos de extracción de ADN a partir de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP) utilizando columnas de sílica y extracción con isopropanol. Electroforesis unidimensional en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, 1-2: ADN genómico extraído de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP) mediante columnas (Qiagen), 3: extracción con isopropanol (Promega), M: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). 17
- Figura 2. Productos amplificados mediante la PCR de ADN satélite, basada en los cebadores TCZ3 y TCZ4, del ADN de *T. cruzi* extraído de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP). Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, M: marcador de peso molecular 100pb (Fermentas), 1-8: diluciones del ADN de cultivo 1/10 - 1/1280, C-: agua bidestilada. Flechas indican los productos específicos esperados de *T. cruzi* (168 pb y 360 pb)..... 19
- Figura 3. Productos amplificados mediante la PCR de ADN satélite, basada en los cebadores TCZ3 y TCZ4, del ADN de *T. cruzi* extraído de una mezcla de heces de vectores (controles positivos) y de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP). Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, M: marcador de peso molecular 100pb (Fermentas), 1-2: ADN *T. cruzi* sin diluir extraído de heces de *R. prolixus*, 3: ADN de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP) diluido 1/1280, C-: agua bidestilada. Las flechas indican los productos específicos de amplificación esperados de *T. cruzi* (168 pb, 360 pb y 550 pb)..... 20
- Figura 4. Productos amplificados mediante la PCR de ADN satélite de *T. cruzi*, basada en los cebadores TCZ3 y TCZ4, de las muestras de heces de los vectores de referencia infectados con *T. cruzi*. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular 100pb (Fermentas). Pozos 1 al 15: muestras evaluadas. C+: Control positivo de heces de triatomíneos de referencia infectados. Cc: Control positivo de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP). C-: agua

destilada. Las flechas indican los productos específicos de amplificación esperados de T. cruzi (168 pb, 360 pb y 550 pb)..... 22

Figura 5. Productos amplificados mediante la PCR de ADN satélite de T. cruzi, basada en los cebadores TCZ3 y TCZ4, de las muestras de heces de los vectores de referencia no infectados con T. cruzi. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular 100pb (Fermentas). Pozos 1 al 15: muestras evaluadas. C+: Control positivo de heces de triatomíneos de referencia infectados. Cc: Control positivo de cultivo de epimastigotes de T. cruzi (aislado CHHP). C-: agua destilada. Las flechas indican los productos específicos de amplificación esperados de T. cruzi (168 pb, 360 pb y 550 pb)..... 23

RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo fue la implementación de una prueba de alta sensibilidad y especificidad, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para el diagnóstico molecular de *Trypanosoma cruzi* en triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas. Para el proceso de estandarización de la prueba, en primer lugar, se analizaron las heces preservadas en papel de filtro de 30 insectos reduvídeos, 15 infectados y 15 sin infección, previamente identificados y enviados por el Laboratorio de Referencia Nacional de Inmunodiagnóstico de Chagas (Maracay, Venezuela). El ácido desoxiribonucleico (ADN) fue extraído y purificado empleando columnas de sílica de la casa comercial Qiagen. La PCR, se llevó a cabo utilizando los cebadores TCZ3 y TCZ4 que amplifican fragmentos específicos de ADN del parásito de 168 pb, 360 pb y 550 pb. El criterio de positividad de la prueba fue la observación de las bandas específicas del ADN de *T. cruzi* con los pesos moleculares anteriormente mencionados. Los resultados fueron expresados en porcentaje de sensibilidad y especificidad obteniendo un 100% y un 93,33%, respectivamente. Asimismo, se obtuvo un valor predictivo negativo y positivo de 100% y 94,00%, respectivamente. Este trabajo constituye unas de las primeras investigaciones realizadas utilizando el par de cebadores TCZ3 y TCZ4 en heces de triatomíneos y representa una herramienta de gran valor en el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en vectores.

INTRODUCCIÓN

Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico brasileño, ha sido considerado un genio científico, gracias al descubrimiento de la enfermedad de Chagas. Este médico investigador se destacó por ser el único en realizar la descripción de una enfermedad infecciosa en todos sus aspectos: etiológico, patológico y clínico. En 1909, en medio de una investigación en una comunidad de Brasil, descubre no sólo al *Trypanosoma cruzi* como agente etiológico de la enfermedad, sino también el ciclo de vida y el mecanismo de transmisión del parásito, estableciendo que en el mismo participaban insectos vectores portadores de *T. cruzi*; sus reservorios naturales y la patología en sí misma (Bastien, 1998).

La enfermedad de Chagas es una parasitosis endémica en numerosas regiones del continente americano, extendiéndose desde el sur de los Estados Unidos al sur de Argentina y Chile. Afecta a 17 países y se estima que en el mundo existen no menos de 10 millones de personas infectadas, principalmente en América Latina, provenientes tanto de áreas urbanas como periurbanas y rurales (Werner *et al.*, 2008). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2010), 25 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad y se calcula que en el año 2008 provocó aproximadamente 10 000 defunciones.

El género *Trypanosoma* es uno de los más importantes incluidos en la familia Trypanosomatidae. Dentro de él, se engloban especies tales como *T. gambiense* y *T. rhodesiense*, agentes causales de la enfermedad del sueño; *T. brucei*, *T. equiperdum* y *T. equinum*, causantes de enfermedades en animales y *T. cruzi*, responsable de la tripanosomiasis americana (Rodríguez, 2011).

T. cruzi es un hemoprotozoario flagelado que alterna su ciclo de vida en dos hospederos multicelulares, uno invertebrado y otro vertebrado. El ciclo inicia cuando los triatomíneos se alimentan de la sangre de un mamífero infectado que contiene las formas tripomastigotes sanguíneos, éstas se transforman a epimastigotes en el intestino medio del insecto. Los mismos migran al recto donde sufren otra transformación para convertirse en tripomastigotesmetacíclicos. La fase en el vertebrado se inicia cuando el triatomíneo se alimenta de sangre del hospedero, éste al picar defeca sobre la piel y expulsa los tripomastigotesmetacíclicos que son introducidos en el organismo a través de las mucosas, del orificio de la picadura o por las escoriaciones que se produce el individuo al rascarse (Becerril y Romero, 2004; Koneman y Allen, 2008).

Desde el punto de vista de clasificación de la enfermedad, se definen tres fases bien diferenciadas (Maldonado, 1998). Inicialmente, una fase aguda que se presenta generalmente como un síndrome febril prolongado, en algunos casos acompañado de otros síntomas inespecíficos como edema, vómitos, esplenomegalia, hepatomegalia, hipertrofia de ganglios linfáticos, entre otros. Igualmente, de un 30,00% a 80,00% de los casos se puede observar los signos de puerta de entrada como el signo de Romaña, caracterizado por edema unipalpebral o bipalpebral; al igual que el chagoma de inoculación, representado por una lesión eritematosa en el sitio de la picadura. La presentación clínica, en algunos casos, puede orientar el diagnóstico en zonas donde la parasitosis es endémica. En este primer periodo la probabilidad de recuperar el parásito en sangre es más elevada (Organización Panamericana de la Salud, 1982; Botero y Restrepo, 2003; Botero *et al.*, 2007; Romero, 2007).

El período latente o indeterminado, segunda fase de la enfermedad, tiene

una duración media de 10 años, la parasitemia es baja y no hay presencia de síntomas aparentes. En esta etapa, el diagnóstico se realiza a través de pruebas serológicas de laboratorio, en las cuales se determinan anticuerpos específicos producidos contra el parásito. En esta fase, el examen radiológico y el electrocardiograma convencional arrojan resultados normales, lo que en muchos casos da lugar a resultados erróneos y enmascaramiento de la enfermedad (Acha y Szyfres, 2003; Botero y Restrepo, 2003). En la fase crónica, de 30 a 40% de los pacientes chagásicos desarrollan una enfermedad inflamatoria que comúnmente resulta en cardiomiopatías y disfunciones del tracto gastrointestinal (Romero, 2007).

Recientemente, se reclasificó la enfermedad en sólo dos fases: aguda y crónica. Ésta última puede presentarse con o sin patología demostrada, esta clasificación fue objeto de estudio en el Consenso Internacional sobre la Etapa Indeterminada de la Enfermedad de Chagas, llevado a cabo en Buenos Aires, Argentina (OMS, 2007).

El mecanismo de transmisión, es principalmente a partir de hemípteros hematófagos de la subfamilia Triatominae, incluida en la familia Reduviidae (Romero, 2007; Pavia *et al.*, 2009). Otros de los medios por los cuales se puede adquirir la enfermedad de Chagas son la transmisión oral, transplacentaria o congénita, leche materna, por trasplante de órganos, transfusiones sanguíneas, manejo de animales infectados y por accidentes de laboratorio (Botero y Restrepo, 2003).

Hoy en día, se reportan alrededor de 140 especies de triatominos, de las cuales 22 están presentes en el país, todas ellas potencialmente capaces de transmitir *T. cruzi*; sin embargo, relativamente pocas son de importancia

como vectores del parásito (Castillo y Wolff, 2000; Soto, 2009). En todo el continente americano se han descrito diversas especies responsables de la mayoría de los casos de enfermedad de Chagas por transmisión vectorial, siendo las más comúnmente halladas: *Triatoma dimidiata*, *Triatoma venosa*, *Triatoma infestans*, *Rhodnius pallescens*, *Triatoma maculata*, *Panstrongylus geniculatus* y *Rhodnius prolixus*; las tres últimas corresponden a las especies de mayor interés epidemiológico en Venezuela, debido a la frecuencia con que se encuentran colonizando el domicilio humano y al alto porcentaje de infección por *T. cruzi* (Feliciangeli, 2009). Cabe señalar, que en el año 2010 se realizó el reporte de un caso de *Eratyrus mucronatus* infectado por *T. cruzi* en un área urbana peridomiciliar del estado Anzoátegui, constituyendo éste el primer caso registrado de infección de esta especie en dicho estado (Morocoima et al., 2010). De igual manera, se han referido aproximadamente 155 especies de mamíferos silvestres y sinantrópicos que actúan como reservorio de *T. cruzi*. La persona infectada también es considerada reservorio de la infección (Soto, 2009).

Debido a la existencia de diferentes fases de la enfermedad y los oscilantes niveles de parasitemia en cada una de ellas, los métodos de diagnóstico deben ser seleccionados cuidadosamente en cada caso, con la finalidad de escoger aquellos que permitan obtener resultados con el mayor porcentaje de confiabilidad y de esta manera efectuar un diagnóstico preciso. Desde el descubrimiento de la enfermedad en el año 1909 hasta hoy, pasados ya 100 años, se han dado grandes adelantos científico tecnológicos que han permitido mejorar el diagnóstico de la infección (Gomes et al., 2009).

Las diferentes etapas de la enfermedad son un indicio para la escogencia del método más confiable que permita realizar un diagnóstico certero. Así se tiene que en la fase aguda, debido a los elevados niveles de parasitemia, las

técnicas se fundamentan en la detección de formas tripomastigotes de *T. cruzi* en muestras frescas de sangre (Maldonado, 1998). Los métodos parasitológicos utilizados en esta etapa, son el examen microscópico al fresco, gota gruesa y el extendido coloreado. En aquellos casos en donde la parasitemia ya se encuentra en declive, se debe optar por métodos de concentración como el de Strout y microhematocrito (Koneman *et al.*, 2008). De igual forma, se emplean métodos parasitológicos indirectos como el hemocultivo y xenodiagnóstico, aunque se ha descrito que estas técnicas poseen buena especificidad pero su sensibilidad es baja de 50-74% (Chiari, 1999, Schenone, 1999).

En la fase crónica de la enfermedad, sin patología demostrada, existe menos posibilidad de recuperación del parásito en sangre y el diagnóstico se basa, principalmente, en la búsqueda de anticuerpos contra *T. cruzi* (Chávez *et al.*, 2007). Las pruebas serológicas comúnmente usadas son, el ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA), inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta y fijación de complemento (Maldonado, 1998; Botero y Restrepo, 2003; Koneman *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009).

Los métodos serológicos y parasitológicos disponibles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas han mejorado de forma importante, con el fin de reducir al mínimo los falsos negativos y ofrecer mayores beneficios al paciente. Las técnicas serológicas han dejado de usar los antígenos crudos que en un principio se utilizaban, para incluir antígenos purificados, recombinantes y péptidos sintéticos que mejoran considerablemente la sensibilidad y especificidad de las mismas (Moncayo y Luquetti, 1990).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como método parasitológico de diagnóstico, se comenzó a implementar a partir de la década de los 80 por

Kary Mullis, como herramienta exitosa para la detección de numerosos agentes infecciosos. Por esta razón, la invención de esta técnica, dio inicio al mejoramiento en el campo del diagnóstico de innumerables patologías, entre ellas la enfermedad de Chagas (Russomando *et al.*, 1992; Dornet *et al.*, 1999; Pavia *et al.*, 2003; Gil *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2009).

La PCR constituye un sistema que permite obtener, en poco tiempo, millones de copias de una secuencia específica de ácido desoxirribonucleico (ADN). La reacción incluye varios ciclos que comprenden a su vez tres pasos. Estos ciclos consisten, principalmente, en la propiedad que posee el ADN de desnaturalizarse a altas temperaturas y la capacidad de las enzimas polimerasas de iniciar la replicación del mismo con la ayuda de ciertos componentes primordiales de la reacción. La mezcla utilizada para la amplificación de un fragmento del ADN molde, requiere de oligonucleótidos que actúan como cebadores, una enzima ADN polimerasa termoestable, desoxirribonucleótidos que realizan un papel importante como sustrato para copiar las cadenas nuevas a partir del molde, un amortiguador que se encarga de estabilizar la reacción y cloruro de magnesio ($MgCl_2$) cofactor de la enzima (Villegas *et al.*, 2009).

Son numerosas las dianas moleculares que han permitido la identificación de *T. cruzi* (Chávez *et al.*, 2007). Sin embargo, las más utilizadas para el diagnóstico son el minicírculo del ADN del kinetoplasto (ADNk), que corresponde a una condensación de ADN mitocondrial formado por una red de moléculas circulares: maxicírculos y minicírculos. A su vez, cada minicírculo presenta cuatro regiones constantes y cuatro variables. Muchos investigadores, han utilizado esta PCR por ser un blanco altamente sensible y específico, ya que sólo amplifica regiones del ADN de *T. cruzi* y no de otros parásitos relacionados (Rivas y López, 1993; Ferrer *et al.*, 2008).

Otras de las secuencias comúnmente utilizadas es la del ADN satélite (ADNs) (Moseret *al.*, 1989; Breniereet *al.*, 1992; Coronadoet *al.*, 2006). Este posee, aproximadamente, 120 000 copias de una secuencia de 195 pb, esto representa del 9,00% al 10,00% del ADN del parásito, lo que la hace una diana altamente sensible. La amplificación de secuencias repetitivas y específicas del ADN parasitario le ha concedido una alta sensibilidad y especificidad, lo cual representa una importante herramienta de diagnóstico (Moseret *al.*, 1989; Rivas y López, 1993; Elías *et al.*, 2005; Molina *et al.*, 2007; Ferrer *et al.*, 2008).

La PCR de ADN satélite de *T. cruzi* fue diseñada por Moseret *al.* (1989), en ella se amplificó un fragmento de 188 pb de ADN repetitivo a partir de muestras de sangre de pacientes y ratones infectados con *T. cruzi*. Posteriormente, Ndaoet *al.* (2000) modificaron la técnica y amplificaron un producto de 168 pb en sangre proveniente de monos del género *Saimirisp*.

Debido a la variabilidad de modificaciones que se pueden aplicar a la PCR, ésta se ha utilizado con éxito en la detección de secuencias de ADN de *T. cruzi* en diferentes muestras biológicas, entre ellas sangre completa y suero; al igual que en heces y hemolinfa de triatominos. Numerosos autores han reportado que esta técnica presenta elevada sensibilidad y especificidad (Dornet *al.*, 2001; Pavía *et al.*, 2003; Brazet *al.*, 2008).

Russomandoet *al.* (1996) evaluaron una prueba de PCR para identificación de ADN de *T. cruzi* en heces de *Triatoma infestans*. En su investigación, realizaron comparaciones de esta técnica con otros métodos parasitológicos, como el xenodiagnóstico y la observación microscópica de las heces en busca de flagelados. Estos autores demostraron que mediante la PCR, se pueden obtener resultados con más rapidez en contraste al xenodiagnóstico,

ya que para éste se debe contar de 30 a 45 días luego de la alimentación del insecto para realizar el diagnóstico, además del laborioso procedimiento empleado, mientras que con técnicas moleculares se obtienen los resultados en aproximadamente dos días. Al mismo tiempo, demostraron que la sensibilidad de la PCR fue significativamente mayor al examen directo al microscopio (EDM), esto fue evidenciado por el hecho de que en 50 insectos analizados, 84,00% fueron positivos por PCR y sólo un 26,00% resultaron positivos por la EDM.

Estudios efectuados por Molina *et al.* (2007), para determinar la prevalencia de infección de los triatominos silvestres por *T. cruzi*, utilizando PCR y microscopía óptica, concluyeron que ambas técnicas eran 100% sensibles y específicas, por lo que fueron utilizadas como estándares de oro para posteriores estudios comparativos con técnicas de inmunoensayo aplicadas en deyecciones de insectos.

De igual forma, Guevara *et al.* (2007) dirigieron sus estudios hacia el mejoramiento en el procesamiento de muestras para la detección molecular de infecciones por *T. cruzi* y *T. rangeli* en vectores. En su experimento demostraron que aumentando el tiempo de incubación, de 10 minutos a 24 horas, durante el tratamiento con el reactivo de extracción del ADN de las muestras de contenido intestinal y hemolinfa de chipos preservadas en papel de filtro, se podían obtener amplificaciones reproducibles de hasta 0,2 parásitos. Asimismo, ponen de manifiesto que el seguimiento de las infecciones en triatominos es elemental para la epidemiología de la enfermedad de Chagas.

La PCR ha demostrado tener un grado variable de eficiencia para el diagnóstico de *T. cruzi* en pacientes chagásicos. En la fase crónica, por

ejemplo, Junquera *et al.*, (1996) reportan un 59,40% de sensibilidad en pacientes crónicos con pruebas serológicamente positivas. El empleo de la PCR en deyecciones de triatomíneos abre nuevas brechas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, con lo que su aplicación puede aumentar significativamente la sensibilidad y especificidad con respecto al diagnóstico parasitológico convencional (Coronado *et al.*, 2006).

En el estado Sucre, se cuenta con laboratorios que reciben constantemente especies de insectos vectores de la enfermedad de Chagas, a los cuales se les son realizados estudios del contenido intestinal, para la identificación de flagelados; sin embargo, mediante el examen directo de las heces de los reduvídeos sólo es posible determinar género (*Trypanosoma* sp.). Igualmente, se ha reportado un alto grado de variabilidad con respecto a la sensibilidad y especificidad de esta técnica. En este contexto, se hace necesaria la implementación de nuevas herramientas que permitan ofrecer un diagnóstico confiable en cuanto a la enfermedad de Chagas y positividad de infección en triatomíneos. Por tal motivo, en el siguiente trabajo de investigación, se estandarizó una prueba de PCR para realizar el diagnóstico de vectores infectados por *T. cruzi*, de esta manera, se puede contar actualmente con una técnica molecular estandarizada, altamente sensible, específica y confiable en nuestra región.

METODOLOGÍA

OBTENCIÓN DE LAS HECES DE LOS TRIATOMINOS

Para la presente investigación se utilizaron heces preservadas en papel de filtro, de 15 triatominos infectados por *T. cruzi* y 15 sin infección, las cuales fueron facilitadas por el Laboratorio de Referencia Nacional de Inmunodiagnóstico de Chagas (LRNICH) (Maracay, Venezuela). Las especies de los vectores fueron seleccionadas aleatoriamente de acuerdo a la disponibilidad de insectos del laboratorio de referencia: 20 (*Rhodnius prolixus*), 5 (*Panstrongylus geniculatus*) y 5 (*Triatoma maculata*).

Para los controles positivos se emplearon vectores infectados procedentes del LRNICH, los cuales fueron mantenidos y alimentados por xenodiagnóstico artificial en el Laboratorio de Diagnóstico Serológico de Enfermedades Infecciosas del Postgrado en Biología Aplicada de la Universidad de Oriente, estado Sucre.

Xenodiagnóstico artificial

Los triatominos positivos a infección por *T. cruzi* (n = 8) se colocaron en frascos de plástico de 50 ml, con una pieza de papel de filtro (Whatman N° 1) en el fondo de éstos y cubiertos con una tela tipo tul. Se obtuvo sangre anticoagulada de personas no infectadas para *T. cruzi*. La sangre se colocó dentro de guantes de látex, los cuales se anudaron a cada extremo, éstos se colocaron sobre los envases que contenían los triatominos. Los insectos ascendieron por las paredes del frasco en busca del alimento y se dejaron alimentar por un tiempo aproximado de 30 minutos. Luego, se esperó que los triatominos defecaran y se retiró el papel filtro con una pinza estéril. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su procesamiento y posterior aislamiento del ADN (Russomando *et al.*, 1996) (Apéndice 1).

Para la estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *T. cruzi* en vectores, se inició ensayando dos protocolos de extracción de ADN. Se utilizaron columnas de sílica (QIAamp DNA mini kit, Qiagen) que retienen específicamente el ADN y admiten el paso de otras sustancias contaminantes (Qiagen, 2010); y el kit de Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) en el que se emplean soluciones como SDS-hipotónica para la lisis nuclear, solución precipitadora de proteínas, entre otras y se basa principalmente, en la precipitación del ADN mediante el uso de isopropanol (Doyle *et al.*, 1996).

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS DE HECES PRESERVADAS EN PAPEL DE FILTRO

Extracción con QIAamp DNA mini kit (Qiagen)

Para la extracción del ADN de las muestras fecales, se siguieron las instrucciones descritas en el inserto de la casa comercial, como se detalla a continuación: fueron recortados 3 círculos del área manchada con las heces de los triatomíneos del papel de filtro, cada uno es equivalente a 0,5 µl de materia fecal. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad y se agregaron 180 µl de buffer de lisis (ATL), se incubaron a 85°C por 10 minutos, pasado el tiempo se centrifugó rápidamente a máxima velocidad. Se añadieron 20 µl de proteinasa K a la solución; se aplicó vórtex y se incubó a 56°C por 1 hora.

Transcurrido el tiempo, se centrifugó a máxima velocidad con la finalidad de sedimentar los restos que quedaron en las paredes y la tapa del tubo. Posteriormente, se adicionaron 200 µl de un segundo buffer de lisis (AL) a la muestra, se mezcló con vórtex y se incubó a 70°C por 10 minutos, para luego centrifugar rápidamente a máxima velocidad. Se procedió a retirar los círculos de papel de filtro y adicionar a cada tubo 200 µl de etanol (96,00–

100%), se mezcló haciendo pulsos con el vórtex y se realizó una centrifugación a 14 000 rpm por 1 minuto. La mezcla se aplicó a la columna de QIAamp DNA mini kit (en un tubo de recolección de 2 ml), se centrifugó a 8 000 rpm durante 1 minuto, luego se colocó en un tubo de recolección de 2 ml y se descartó el tubo que contenía el filtrado.

Para el lavado de la columna se agregaron 500 µl de tampón de lavado 1 (AW1), se centrifugó nuevamente a 8 000 rpm por 1 minuto. Se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 ml y se descartó el tubo que contenía el filtrado. Se procedió a realizar el paso anterior, agregando 500 µl de tampón de lavado 2 (AW2) y se centrifugó por 3 minutos a 14 000 rpm. Se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 ml, se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. Esta última centrifugación, se efectuó con la finalidad de eliminar los restos de buffer AW2 que pudieron haber permanecido en la columna.

Finalmente, se colocó la columna en un tubo limpio de 1,5 ml y se adicionaron 150 µl de tampón de elución (AE), se incubó a 25°C durante 1 minuto y se centrifugó a 8 000 rpm por 1 minuto. Se obtuvo la solución con el ADN purificado y se almacenaron las muestras a -20°C hasta su procesamiento.

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN DE CULTIVO DE EPIMASTIGOTES (AISLADO CHHP)

Para la extracción y purificación del ADN de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP) fueron utilizados dos protocolos, los cuales son especificados a continuación:

Extracción con QIAamp DNA mini kit (Qiagen)

Se empleó el aislado CHHP, el cual es mantenido en el Laboratorio de

Diagnóstico Serológico de Enfermedades Infecciosas del Postgrado en Biología Aplicada de la Universidad de Oriente, en medio de cultivo LIT (pH 7,4) por pasajes semanales del cultivo. Previo a la extracción del ADN de epimastigotes, se procedió a realizar 3 lavados con fosfato buffer salino (PBS) (pH 7,4) para posteriormente centrifugar a 3 400 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, con la finalidad de eliminar los restos de medio de cultivo que pudieran interferir en el proceso de extracción. El sedimento de parásitos fue suspendido en un volumen final de 2 ml de PBS. Luego se siguieron las instrucciones descritas en el inserto de la casa comercial.

Extracción con WizardGenomic DNA Purification Kit (Promega)

En este caso, se tomaron 2 ml de la suspensión de parásitos en PBS y se colocaron en un tubo Eppendorf, se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 minutos a 18°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento. Luego se agregaron 200 µl de solución lisante de células y se incubó la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente, invirtiendo el tubo de 2 a 3 veces durante la incubación, este se centrifugó nuevamente a 14 000 rpm durante 5 minutos a 18°C. Posteriormente, se descartó la mayor cantidad de sobrenadante posible y se mezcló vigorosamente en vórtex durante 15 segundos. Se añadieron 300 µl de solución lisante de núcleos a la resuspensión anterior y se mezcló por inversión, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se adicionaron 100 µl de solución precipitante de proteínas y se mezcló vigorosamente en el vórtex, durante 20 segundos y se incubó la muestra a 0°C por 5 minutos, luego se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos a 4°C.

El sobrenadante fue trasvasado a un tubo Eppendorf limpio que contenía 500 µl de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló y se centrifugó bajo las

mismas condiciones del paso anterior. Se procedió a decantar el isopropanol y se agregaron 500 µl de etanol al 70,00% a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14 000 rpm por 3 minutos a 4°C y se decantó el etanol para luego dejar secar el sedimento a 37°C durante 2 horas.

Finalmente, el sedimento seco, fue resuspendido en 150 µl de solución rehidratante de ADN, se incubó a temperatura ambiente por 24 horas y se almacenó a -20°C hasta su posterior procesamiento.

AMPLIFICACIÓN DE ADN SATÉLITE DE *T. CRUZI*

Para el desarrollo de la PCR se siguió el protocolo descrito por Ndao *et al.* (2000), el cual se basa en la amplificación de un segmento del ADN satélite de *T. cruzi*. Se utilizó, el par de cebadores TCZ3 (5'-TGCACTCGGCTGATCGTTT- 3') y TCZ4 (5'-ATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3'), los cuales permitieron la amplificación de tres fragmentos del ADN satélite del parásito de 168 pb, 360 pb y 550 pb.

La amplificación del ADN extraído de heces de vectores y de cultivo axénico de epimastigotes (aislado CHHP), se realizó en un volumen final de reacción de 50 µl. La mezcla de reacción estuvo constituida por los reactivos siguientes: 14 µl de agua bidestilada y estéril; 4 µl de MgCl₂ 25 mmol.l⁻¹; 10 µl de buffer verde 5X, Promega; 1 µl de desoxirribonucleótidos (dNTP) 10 mmol.l⁻¹, Promega; 0,25 µl de cada cebador (TCZ3 y TCZ4) 0,4 µmol.l⁻¹ y 0,5 µl de la enzima Taq ADN polimerasa 5 u/µl, Promega.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Gene Amp, PCR system 9700), agregando 20 µl de la muestra de ADN en la mezcla de reacción, los tubos se colocaron en el termociclador y éste se programó para que realizara un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C/1 minuto, luego 29

ciclos de desnaturalización a 94°C/30 segundos, alineamiento a 54°C/30 segundos, 54°C/90 segundos y extensión a 72°C/30 segundos, 72°C/90 segundos, por último una extensión final a 72°C/5 minutos, estabilización a 37°C/10 minutos, para finalizar a 12°C.

ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

Los productos obtenidos en la prueba de PCR se separaron en geles de agarosa al 2,00%, teñidos con bromuro de etidio 0,5 µg.ml⁻¹ en solución tampón Tris-acetato 0,04 mol.l⁻¹, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,001 mol.l⁻¹, pH 8,0 (TAE 1X) y un sistema de electroforesis horizontal. Se empleó un voltaje de 59 voltios por 2 horas. Posteriormente, las bandas de ADN separadas en el gel fueron visualizadas y fotografiadas empleando un transiluminador UV (Gel doc, Biorad).

ANÁLISIS DE DATOS

Para la determinación de la sensibilidad, la especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo de la prueba de PCR de ADN satélite de *T. cruzi*, se emplearon las fórmulas descritas por Wayne (1999) (Apéndice 2) y se presentaron los resultados en forma de tablas y figuras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo, la extracción del ADN mediante el uso simultáneo de dos protocolos, permitió hacer comparaciones para determinar cual de ellos ofrecía mejores resultados en cuanto a la calidad del ADN. Para la extracción del mismo, en ambos casos se utilizó cultivo axénico de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP). Para verificar que se contaba con la presencia de ADN para la estandarización de la PCR, el eluato de la extracción fue visualizado en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (Lamprea *et al.*, 2004; De Jesús *et al.*, 2005).

En la figura 1 se presenta la imagen de los ADNs genómicos, la cual muestra que la extracción utilizando columnas (Qiagen) permite la obtención de un ADN más puro (carril 1 y 2). Esto se puede observar por la gran cantidad de material que se visualiza (carril 3) utilizando la extracción con isopropanol (Promega), en donde se evidencia un exceso de señal, lo que podría indicar la presencia de proteínas, ARN y otros componentes celulares que no se pudieron eliminar en el proceso de purificación y que pueden influir negativamente en las reacciones de amplificación (Zulantay *et al.*, 2009). En este sentido, el método que demostró ser más eficaz en la recuperación del ADN fue el kit de la casa comercial Qiagen, el cual permite una mayor eliminación de posibles interferentes de la reacción y una muestra más purificada, por ende fue el protocolo de elección para realizar la extracción de ADN de los vectores de referencia infectados o no por *T. cruzi*.

Resultados similares fueron obtenidos en el trabajo realizado por Zulantay *et al.* (2009), en el cual evaluaron distintos protocolos de extracción y purificación de ADN en sangre periférica de pacientes chagásicos crónicos y

deyecciones de triatomos infectados. En ese caso, los métodos se basaron tanto en la precipitación por solventes orgánicos, como en la utilización de microcolumnas. Esos autores demostraron que la extracción y purificación del ADN utilizando columnas, permite una mayor recuperación del ADN y una purificación más óptima lo cual es indispensable para la reacción de PCR.

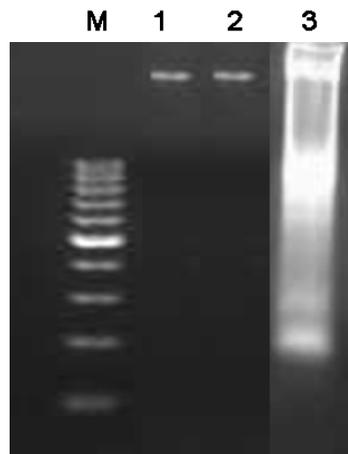


Figura 1. Productos de extracción de ADN a partir de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP) utilizando columnas de sílica y extracción con isopropanol. Electroforesis unidimensional en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, 1-2: ADN genómico extraído de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP) mediante columnas (Qiagen), 3: extracción con isopropanol (Promega), M: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas).

En contraste, Ramírez *et al.* (2009) realizaron investigaciones empleando métodos como el fenol cloroformo y pruebas comerciales para la extracción de ADN de *T. cruzi*, de sangre de pacientes chagásicos en fase crónica, con la finalidad de valorar cual método permitía la obtención de una mayor cantidad y calidad del ADN y cual de ellos proporcionaría una mejor sensibilidad en las subsecuentes reacciones de amplificación. En ese caso concluyeron que, el método de extracción con fenol cloroformo es ideal para

la detección y amplificación de ADN de *T. cruzi*. En tal sentido, se puede señalar que uno de los pasos más importantes en las reacciones de PCR es la escogencia de un método de extracción ideal, que se ajuste al tipo de muestra que se está empleando (Fernández, 2004).

Seleccionado el protocolo de extracción que permitiera obtener la mejor calidad de muestra de ADN, para optimizar las condiciones de la amplificación, se procedió a estandarizar la prueba de PCR, siguiendo el protocolo descrito por Ndao *et al.* (2000). En primer lugar, se probaron diferentes diluciones del ADN extraído del cultivo axénico de *T. cruzi* (1/10 hasta 1/1280), cuya concentración en el medio de cultivo era de $41,10 \times 10^6$ parásitos/ml; así como también, se modificó el número de ciclos de la prueba del protocolo original de 25 a 29 ciclos, se aumentó progresivamente la temperatura de alineamiento de 50°C a 54°C y el tiempo de desnaturalización del ADN de 30 segundos a 1 minuto. Estas modificaciones permitieron observar de forma nítida la presencia de las bandas específicas de 168 pb y 360 pb de *T. cruzi* en las muestras de cultivo analizadas. De igual manera, se obtuvieron dichas bandas en las muestras de ADN altamente diluidas (1/1280) (Figura 2).

La figura 2 corresponde a los productos de amplificación obtenidos a partir del ADN de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP), al cual se le realizaron diluciones seriadas desde 1/10 hasta 1/1280; en la misma, se evidencia que a medida que se aumenta la dilución, las bandas específicas se observan con mayor nitidez. Al respecto se puede inferir que, el ADN extraído de cultivo se encuentra altamente concentrado y se ha descrito que las elevadas concentraciones de ADN tienen la capacidad de inhibir a la enzima Taq polimerasa, por lo que se inhibe la reacción de amplificación (Maldonado, 1998; Inniset *et al.*, 1995).

Una vez estandarizadas las condiciones de la PCR con ADN de *T. cruzi* proveniente de cultivo axénico, se procedió a analizar las heces de los vectores de referencia, con la finalidad de determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba.

En la figura 3 se observan los productos de amplificación del ADN sin diluir (por duplicado), extraído de las heces de un triatomino *R. prolixus* infectado con *T. cruzi* (carril 1 y 2) y el ADN diluido 1/1 280 de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP) (carril 3). Al respecto, es importante destacar que en el primer caso, las bandas específicas de 168 pb, 360 pb y 550 pb de *T. cruzi* se presentan con mayor nitidez que en las muestras de ADN de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*.

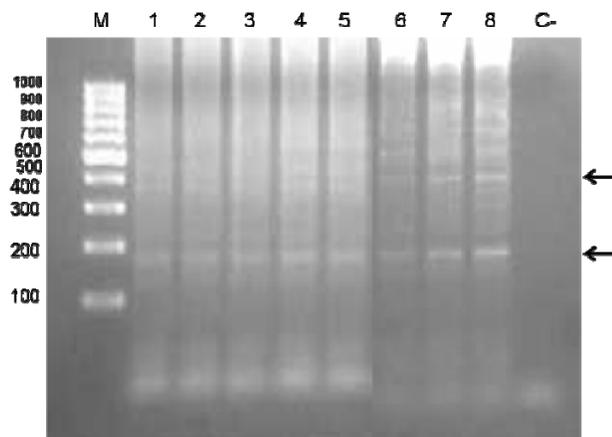


Figura 2. Productos amplificados mediante la PCR de ADN satélite, basada en los cebadores TCZ3 y TCZ4, del ADN de *T. cruzi* extraído de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP). Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, M: marcador de peso molecular 100pb (Fermentas), 1-8: diluciones del ADN de cultivo 1/10 - 1/1280, C-: agua bidestilada. Flechas indican los productos específicos esperados de *T. cruzi* (168 pb y 360 pb).

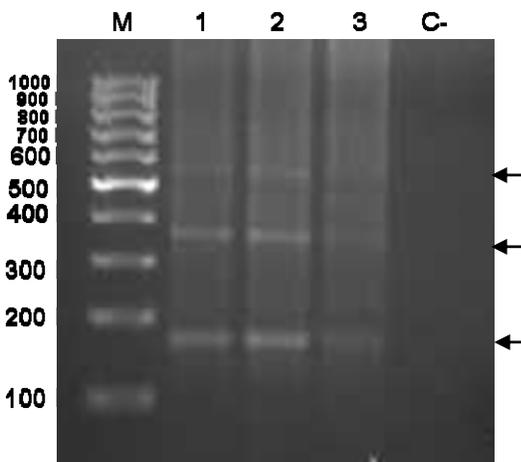


Figura 3. Productos amplificados mediante la PCR de ADN satélite, basada en los cebadores TCZ3 y TCZ4, del ADN de *T. cruzi* extraído de una mezcla de heces de vectores (controles positivos) y de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP). Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, M: marcador de peso molecular 100pb (Fermentas), 1-2: ADN *T. cruzi* sin diluir extraído de heces de *R. prolixus*, 3: ADN de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP) diluido 1/1280, C-: agua bidestilada. Las flechas indican los productos específicos de amplificación esperados de *T. cruzi* (168 pb, 360 pb y 550 pb).

Debido a que en las heces del insecto la cantidad de parásitos es comparativamente mucho menor que en la del cultivo axénico ($41,10 \times 10^6$ parásitos/ml), la cantidad de ADN extraído será también menor. Esto a su vez, disminuye la posibilidad de inhibición de la enzima polimerasa, por consiguiente una reacción de amplificación más óptima (Queiroz *et al.*, 2001).

Establecidas las condiciones óptimas de la PCR, tanto en cultivo de epimastigotes como en heces de vectores, se procedió a analizar las muestras de heces preservadas en papel de filtro de los triatomíneos de referencia infectados o no por *T. cruzi*. En la figura 4 se puede observar que en todas las muestras de heces provenientes de vectores infectados se amplificaron las bandas esperadas de 168 pb, 360 pb y 550 pb.

Asimismo, al analizar las muestras de heces de vectores sin infección, en 14/15 no se observaron las bandas específicas de amplificación. Sólo una muestra (figura 5, carril 3) se amplificó la banda específica de 168 pb. En este sentido, no se puede afirmar que se trate de un falso positivo, ya que los vectores de referencia eran alimentados con sangre de gallinas y se conoce que las aves son refractarias a la infección (Kierszenbaum *et al.*, 1976), por lo que se deduce que posiblemente, se cometió un error técnico al seleccionar y empaquetar las heces en papel de filtro y enviarlas al laboratorio donde éstas iban a ser procesadas.

En la figura 5 se visualizan también algunos productos de amplificación no específicos, estos pueden generarse por diversas condiciones y constituyentes de la reacción. Las situaciones más reportadas que dan lugar a la aparición de estos productos son, temperaturas de alineamiento fuera de los rangos recomendados para los iniciadores empleados; concentraciones inadecuadas de la enzima polimerasa. Igualmente las concentraciones de $MgCl_2$ y un elevado número de ciclos, entre otros (Eckert y Kunkel, 1991).

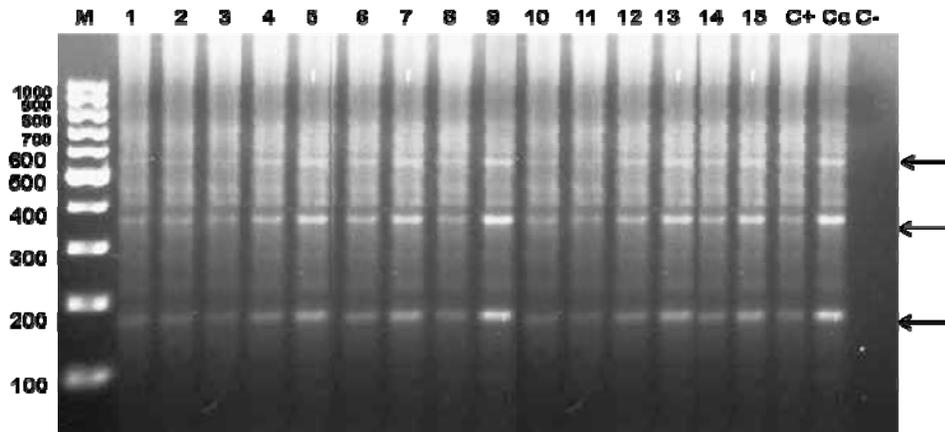


Figura 4. Productos amplificados mediante la PCR de ADN satélite de *T. cruzi*, basada en los cebadores TCZ3 y TCZ4, de las muestras de heces de los vectores de referencia infectados con *T. cruzi*. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular 100pb (Fermentas). Pozos 1 al 15: muestras evaluadas. C+: Control positivo de heces de triatominos de referencia infectados. Cc: Control positivo de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP). C-: agua destilada. Las flechas indican los productos específicos de amplificación esperados de *T. cruzi* (168 pb, 360 pb y 550 pb).

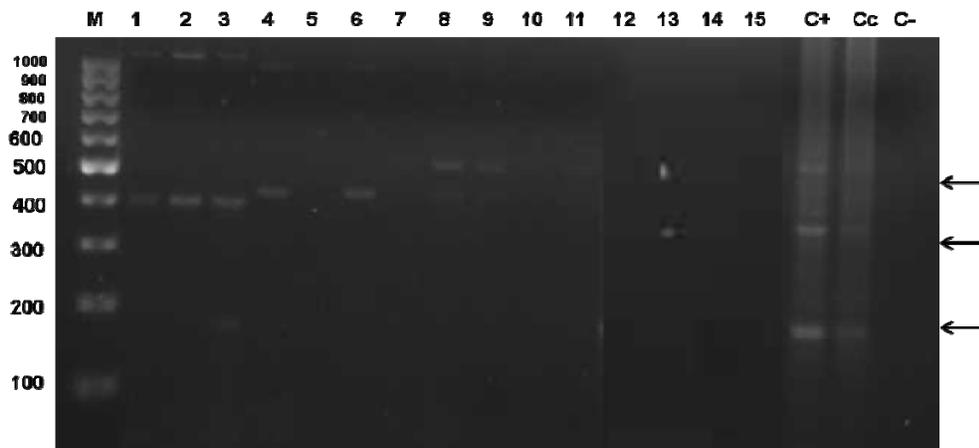


Figura 5. Productos amplificados mediante la PCR de ADN satélite de *T. cruzi*, basada en los cebadores TCZ3 y TCZ4, de las muestras de heces de los vectores de referencia no infectados con *T. cruzi*. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular 100pb (Fermentas). Pozos 1 al 15: muestras evaluadas. C+: Control positivo de heces de triatomíneos de referencia infectados. Cc: Control positivo de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado CHHP). C-: agua destilada. Las flechas indican los productos específicos de amplificación esperados de *T. cruzi* (168 pb, 360 pb y 550 pb).

Es importante destacar que en muchas de las muestras que se utilizan para el diagnóstico de *T. cruzi* y de otros agentes patógenos, se encuentran otras sustancias y componentes que pueden actuar como interferentes en la reacción y propiciar la aparición de productos de amplificación no específicos. Tal es el caso de las muestras fecales, en donde se hallan muchos sedimentos, partículas, bacterias y células; de allí la importancia de la purificación de este tipo de muestras para así minimizar la amplificación de fragmentos que no corresponden al ADN en cuestión (Queiroz *et al.*, 2001).

La prueba de PCR estandarizada, utilizando ADN satélite (TCZ3 y TCZ4) de *T. cruzi*, presentó 100% de sensibilidad y 93,33% de especificidad.

Asimismo, el valor predictivo negativo fue de 100% y el valor predictivo positivo de 94,00% (tabla 1).

Tabla 1. Especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los resultados obtenidos con la prueba de PCR para la detección de ADN satélite de *T. cruzi* en muestras de heces de vectores.

Vectores triatominos	Técnica PCR ADN-sat		Sens.	Espec.	VP+	VP-
	Positivos	Negativos				
Vectores infectados por <i>T. cruzi</i>	15	1	100%	93,33%	94,00%	100%
Vectores no infectados por <i>T. cruzi</i>	0	14				
Total	15	15				

PCR ADN-sat: Reacción en cadena de la polimerasa de ADN satélite; Sens.: Sensibilidad; Espec.: especificidad; VP+: valor predictivo positivo; VP-: valor predictivo negativo; %: porcentaje.

Existen numerosas técnicas de PCR para el diagnóstico de *T. cruzi* basadas en distintos cebadores y blancos de amplificación. Dentro de estas podemos mencionar: la PCR del espaciador intergénicoribosomal (González *et al.*, 1994), PCR anclado sobre secuencias repetitivas dispersas o Clon 6 (Araya *et al.*, 1997), la PCR de la región variable del minicírculo del ADN del kinetoplasto (ADNk) y las secuencias repetidas en tándem del ADN nuclear, siendo las dos últimas las más utilizadas en el diagnóstico de *T. cruzi* en pacientes chagásicos, tanto en su fase aguda como en la crónica (Junquera *et al.*, 1996; Carrada 2004; Coronado *et al.*, 2006).

Ramírez *et al.* (2009) realizaron estudios basados en contrastar 5 técnicas para la detección de *T. cruzi* en sangre de pacientes chagásicos crónicos, entre ellas evaluaron técnicas serológicas y moleculares como la PCR del ADNk y ADNs, utilizando en el primer caso los cebadores específicos del

minicírculo de *T. cruzi* 121 y 122; para el ADNs el par de cebadores TCZ1 y TCZ2. De igual forma, en su estudio evaluaron distintos protocolos de extracción de ADN parasitario de las muestras de sangre para seleccionar aquel que le proporcionara una muestra de mayor calidad y así optimizar su reacción de amplificación. Para la extracción, el protocolo que le aportó la mejor concentración y calidad de ADN fue el fenol cloroformo, el cual también aumentó en un 17,00% la sensibilidad de la PCR de ADNs y un 13,00% para la PCR de ADNk. En ese estudio, la sensibilidad de la PCR de ADNk y la de ADNs fue de un 70,00% y 75,00%, respectivamente y el límite de detección de ADN fue de 0,5 fg de ADN parasitario/ml y 0,1 fg, respectivamente.

Zulantay *et al.* (2009) demuestran que la PCR de deyecciones de insectos alimentados mediante xenodiagnóstico de pacientes chagásicos, basada igualmente en los cebadores específicos del minicírculo de *T. cruzi* 121 y 122 (ADNk) y la extracción y purificación de ADN utilizando columnas, es el método de elección para el diagnóstico de enfermedad de Chagas crónica, con los que obtuvieron hasta un 96,00% de sensibilidad para la PCR. De manera similar, Molina *et al.* (2007) registraron un 100% de sensibilidad y especificidad en la detección de *T. cruzi* en heces de vectores, mediante el uso de PCR de ADNk basada en los cebadores KNS1 y KNS2, los cuales amplifican productos de 293-340 pb. También, Chiurillo *et al.* (2003) reportaron el uso de secuencias teloméricas con un 100% de sensibilidad, aplicada a muestras de sangre y heces de triatominos.

El uso de los cebadores TCZ1 y TCZ2 para el diagnóstico de *T. cruzi* ha sido ampliamente reportado en todo el mundo. Brazet *et al.*, (2007), emplearon este par de cebadores para la detección de ADN de *T. cruzi* en muestras del tracto digestivo de *Triatoma infestans* en días sucesivos después de la alimentación de los mismos con ratones Balb/C, experimentalmente

infectados con *T. cruzi* y la visualización del parásito en las heces de los triatomíneos por microscopía. Ellos demostraron que existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos métodos, obteniendo que después de 30 días de alimentados los insectos, la sensibilidad fue de 90,00% para la PCR y de sólo un 20,00% para la microscopía.

Diversos estudios, han demostrado que la sensibilidad y especificidad de la PCR va a depender de factores propios de la reacción, como el par de iniciadores utilizados, la calidad y la cantidad del templado, las concentraciones de polimerasa y MgCl₂, entre otros parámetros a tomar en cuenta, para la mayor optimización de una prueba de PCR y por ende mayor calidad de los productos amplificados. La evaluación de cada uno de estos parámetros y el estricto control de los mismos garantizan resultados confiables y con buena sensibilidad y especificidad (Eckert y Kunkel, 1991; Moreira, 1998; Fernández, 2004).

En el campo del diagnóstico de la enfermedad de Chagas, las técnicas a utilizar se deben seleccionar de acuerdo a la fase en la que se encuentra la infección; en base a esto, se debe elegir aquella que permita la visualización del parásito por examen directo de la sangre del paciente; detección de anticuerpos contra el mismo o la identificación directa del ADN de *T. cruzi* mediante biología molecular (Maldonado, 1998; Chávez *et al.*, 2007).

Con respecto a la PCR de ADN satélite, existen pocas referencias sobre la utilización del par de cebadores TCZ3 y TCZ4. Este trabajo corresponde al primer estudio realizado con dichos cebadores para el diagnóstico de *T. cruzi* en heces de insectos vectores. En la presente investigación, se logró demostrar que a través del uso de la PCR, basada en los cebadores TCZ3 Y TCZ4, se pueden obtener resultados confiables, de esta manera se garantiza

un diagnóstico preciso y específico de triatomíneos portadores del parásito (Coronado *et al.*, 2006; Braz, 2007).

Los resultados de este estudio permiten concluir que la detección de ADN de *T. cruzi* en insectos vectores a través de PCR, es una herramienta altamente sensible y específica. Además, permite resaltar que el seguimiento y el control de cada una de las condiciones de la extracción, purificación y amplificación del ADN son puntos claves en los resultados de la PCR; por lo mismo deben ser optimizados y estandarizados según la disponibilidad y necesidades de cada laboratorio. Es de suma importancia la implementación de estas técnicas en estados donde la zoonosis es endémica, como en el estado Sucre y así complementar y contribuir a un mejor diagnóstico, tanto en vectores portadores del parásito como en pacientes en las distintas fases de la enfermedad de Chagas.

CONCLUSIONES

El método de extracción de ADN en columnas, permite obtener una muestra de mayor calidad que garantizará una prueba con resultados más confiable.

La utilización de papel filtro para la recolección de heces de vectores transmisores de *T. cruzi* es un método práctico, seguro y que permite la obtención de una cantidad de muestra apropiada para la extracción de ADN.

La gran cantidad de ADN obtenida de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* es un factor de inhibición de la PCR, por lo tanto, se deben realizar diluciones de la muestra cuando se utilicen controles positivos de este tipo de cultivo.

En la presente investigación se logró estandarizar una prueba de PCR utilizando los cebadores TCZ3 y TCZ4 para el diagnóstico de vectores reduvídeos infectados por *T. cruzi* altamente sensible y específica, lo cual representa una nueva herramienta de diagnóstico molecular para el estado Sucre.

BIBLIOGRAFÍA

Acha, P. y Szyfres, B. 2003. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Volumen III Parasitosis*. Tercera edición. OPS. Publicación científica y tecnológica 580. Washington, D.C.

Araya, J.; Cano, M.; Gomes, H.; Novak, E.; Requena, J.; Alonso, C.; Levin, M.; Guevara, P.; Ramírez, J. y Da Silveira, J. 1997. Characterization of an interspersed repetitive DNA element in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 115(6): 563-570.

Bastien, J. 1998. The kiss of death: Chagas disease in the Americas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 4(6): 432-433.

Becerril, M. y Romero, R. 2004. *Parasitología médica de las moléculas a la enfermedad*. Mc Graw Hill. México.

Botero, D. y Restrepo, M. 2003. *Parasitosis humanas*. Cuarta edición. Corporación para investigaciones biológicas. Medellín.

Botero, L.; Mejía, A. y Triana, O. 2007. Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. *Biomédica*, 27(1): 120-132.

Braz, L. 2007. Comparison of Polymerase Chain Reaction with microscopic examination to detect *Trypanosoma cruzi* in *Triatomainfestans* digestive tract samples. *Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo*, 49(1): 40-48.

Braz, L.; Raiz, R.; Amato-neto, V.; Alárcon, R.; Gakiya, E. y Okay T. 2008. Suitability of a rapid DNA isolation and amplification for detection of *Trypanosoma cruzi* in *Triatomainfestans* dry fecal spots collected on filter paper. *Parasite*, 15: 595-598.

Breniere, S.; Bosseno, M.; Revollo, S.; Rivera, M.; Carlier, Y. y Tibayrenc, M. 1992. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46: 335-341.

Carrada, T. 2004. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 51(4): 205-219.

Castillo, D. y Wolff, M. 2000. Aspectos del comportamiento de los triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Biomédica*, 20: 59-64.

Chávez M., Fuentes I., Gárate T. y Cañavate C. 2007. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(3): 29-37.

Chiari, E. 1999. Chagas disease diagnosis using Polymerase Chain Reaction, hemoculture and serologic methods. *Memories do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(1): 299-300.

Chiurillo, M.; Crisante, G.; Rojas, A.; Peralta, A.; Dias, M.; Guevara, P.; Añez, N. y Ramírez, J. 2003. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10: 775-779.

Coronado, X.; Zulantay, I.; Reyes, E.; Werner, A.; Venegas, J.; Rodríguez, J.; Solari, A. y Sánchez, G. 2006. Comparison of *Trypanosoma cruzi* detection by PCR in blood and dejections of *Triatominae* fed on patients with chronic Chagas disease. *Acta Tropica*, 98(3): 314-317.

De Jesús, R.; Moreno, N. y Martínez, J. 2005. Ensayo de dos métodos de extracción de ADN de ratón para ser usado en el control genético de ratones consanguíneos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Científica*, 15(2): 134-140.

Dorn, P.; Engelke, D.; Rodas, A.; Rosales, R.; Melgar, S.; Brahney, B.; Flores, J. y Monroy, C. 1999. Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas disease vectors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(5): 740-745.

Dorn, P.; Flores, J.; Brahney, B.; Gutierrez, A.; Rosales, R.; Rodas, A. y Monroy, C. 2001. Comparison of polymerase chain reaction on fresh tissue samples and faecal drops on filter paper for detection of *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius prolixus*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 503-505.

Doyle, K.; Miles, J. y Promega Corporation. 1996. Promega protocols and applications guide. Tercera edición. Editorial Madison: Promega Corporation. Estados Unidos.

Eckert, K. y Kunkel, T. 1991. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *Genome Research*, 1: 17-24.

Elias, M.; Vargas, N.; Tomazi, L.; Pedroso, A.; Zingales, B.; Schenkman, S. y Briones, M. 2005. Comparative analysis of genomic sequences suggests that *Trypanosoma cruzi* CL Brener contains two sets of non-intercalated repeats of satellite DNA that correspond to *T. cruzi* I and *T. cruzi* II types. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 140(2): 221-227.

Feliciangeli, D. 2009. Control de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Logros pasados y retos presentes. *Interciencia*, 34(6): 393-399.

Fernández, F. 2004. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(6): 355-360.

Ferrer, E.; Da Conceicao, F.; Campioli, P.; Lares, M.; López, M.; Rivera, M.; Vietri, M.; Medina, M.; Salcedo, M.; Morocoima, A. y Herrera, L. 2008. Validación de protocolos de PCR para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas. *Salus Online*, 12(1): 163-174.

Gil, J.; Pavia, P.; Montilla, M.; Flores, A.; Quintero, C.; Mercado, M.; Vacca, M., Nicholls, S. y 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. *Biomédica*, 27(1): 83-91.

Gomes, Y.; Lorena, V. y Luquetti, A. 2009. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Memories do Institute Oswaldo Cruz*, 104(1): 115-121.

González, N.; Galindo, I.; Guevara, P.; Novak, E.; Scorza, J.; Añez, N.; Valera, M. y Ramírez, J. 1994. Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 385-389.

Guevara, P.; Quispe, S.; Abreu, M.; Bladés, N. y Reyes, M. 2007. Mejoramiento del procesamiento de muestras para la detección molecular de infecciones por *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en vectores. *Salus*, 11(1): 91-92.

Innis, M.; Gelfand, D. y Sninsky, J. 1995. PCR Strategies. Editorial Academic Press. California.

Junquera, A.; Chiari, E. y Wincker, P. 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of northerneastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(2): 129-132.

Kierszenbaum, F.; Ivanyi, J. y Budzko, D. 1976. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, 30(1): 1-6.

Koneman, E. y Allen, S. 2008. Diagnóstico microbiológico texto y atlas a color. Sexta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Lamprea, N.; López, L.; Santacruz, D.; Guerrero, J. y Burbano, C. 2004. Modificaciones técnicas en el uso de microsatélites y AFLP para el estudio poblacional de diversas especies de peces en el río SINÚ, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6(1): 72-78.

Maldonado, E. 1998. Biología molecular en medicina. Editorial Limusa. México.

Molina, Z.; Rosales, J.; Galaviz, L. y Molina, D. 2007. Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en triatomíneos silvestres de Nuevo León, México. *Salud Pública de México*, 49(1): 37-44.

Moncayo, A. y Luquetti, A. 1990. Multicentre double blind study for reevaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Memories do Institute Oswaldo Cruz*, 85(4): 489-495.

Moreira, D. 1998. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Research*, 26(13): 3309-3310.

Morocoima, A.; Chique, J. y Herrera, L. 2010. *Eratyrus mucronatus* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): Primer registro para el estado Anzoátegui (Venezuela). *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 50(2): 307-310.

Moser, D.; Kirchhoff, L. y Donelson, J. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(7): 1477-1482.

Ndao, M.; Kelly, N.; Normandin, D.; Dick, J.; Whiteman, A.; Kokoskin, E.; Arevalo, I. y Ward, B. 2000. *Trypanosoma cruzi* infection of squirrel monkeys:

Comparison of blood smear examination, commercial enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as screening test for evaluation of monkey-related injuries. *Comparative medicine*, 50(6): 658-665.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2007. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Argentina.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2010. La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana). Nota descriptiva N° 340.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1982. Boletín epidemiológico de OPS. Publicación científica.

Pavia, P.; Cuervo, C.; Montilla, M.; Nicholls, S. y Puerta, C. 2003. Diseño y estandarización de una prueba de PCR para la detección específica de *Trypanosoma cruzi*. *Infectio*, 7(3): 129-135.

Pavia P.; Montilla M.; Flórez C.; Herrera G.; Ospina J.; Manrique F., Nicholls R. y Puerta C. 2009. Reporte del primer caso de enfermedad de Chagas transplacentaria analizado por APPCR en Moniquirá, Boyacá. *Biomédica*, 29 (4): 513-522.

Qiagen. 2010. QIAamp DNA Stool Handbook. Segunda edición.

Queiroz, A.; Santos, P.; Sassaroli, A.; Hársi, C.; Monezi, T. y Mehnert, D. 2001.

Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4614-4618.

Ramírez, J.; Guhl, F.; Umezawa, E.; Morillo, C.; Rosas, F.; Marin, J. y Restrepo, S. 2009. Evaluation of adult chronic Chagas heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12): 3945-3951.

Rivas L. y López C. 1993. Parasitología Molecular. R.B Servicios Editoriales. España.

Rodríguez, V. 2011. Lucha contra las enfermedades de la pobreza. Editorial Biblioteca nueva. Bilbao.

Romero, R. 2007. *Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Tercera edición. Editorial médica panamericana. México.

Russomando, G.; Figueredo, A.; Almiron, M.; Sakamoto, M. y Morita, K. 1992. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(11): 2864-2868.

Russomando, G.; Rojas, A.; Almiron, M.; Figueredo, A.; Ferreira, M. y Morita, K. 1996. *Trypanosoma cruzi*: Polymerase chain reaction-based detection in dried feces of *Triatominae*. *Experimental Parasitology*, 83: 62-66.

Schenone, H. 1999. Xenodiagnosis. *Memories do Institute Oswaldo Cruz* 94(1): 289-294.

Soto, A. 2009. Clave pictórica de triatóminos (Hemiptera: Triatominae) de Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 49(2): 259-274.

Villegas, V.; Sánchez, M. y Chuaire, L. 2009. Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. *Colombia Médica*, 40(3): 347-352.

Werner, A.; Heitmann, I.; Jercic, M.; Jofré, M.; Muñoz, P.; Noemí, I.; Sapunar, J.; Torres, M. y Zulantay, I. 2008. Parte I. Introducción y epidemiología. *Revista Chilena de Infectología*, 25(3): 190-193.

Zulantay, L.; Muñoz, C.; Martínez, G.; Rodríguez, J. y APT, W. 2009. Optimización de la PCR para kADN de *Trypanosoma cruzi* en sangre periférica y deyecciones de triatóminos alimentados en individuos chagásicos crónicos, según método de extracción y purificación. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, 68(2): 142-149.

APÉNDICES



Apéndice 1. Xenodiagnóstico artificial realizado en el Laboratorio de Diagnóstico Serológico en Enfermedades Infecciosas (Postgrado en Biología Aplicada, UDO-Sucre).

Apéndice 2. Clasificación de sujetos de acuerdo al estatus de la enfermedad y el resultado de la prueba diagnóstica.

Resultado del test	Enfermedad		3. Total
	1. Presente	2. Ausente	
Positivo	a	b	a + b
Negativo	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	

$$\text{Sensibilidad} = a / (a + c) \times 100$$

$$\text{Especificidad} = d / (b + d)$$

$$VPP = a / (a + b)$$

$$VPN = c / (c + d)$$

Donde:

a = número de individuos con la enfermedad y positivos por la prueba diagnóstica que se está evaluando (verdaderos positivos).

b = número de individuos sin la enfermedad pero positivos con el test que se está evaluando (falsos positivos).

c = número de individuos con la enfermedad pero negativos con el test que se está evaluando (falsos negativos).

d = número de individuos sin la enfermedad y negativos por la prueba que se está evaluando (verdaderos negativos).

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	IMPLEMENTACIÓN DE UNA PRUEBA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN DE ADN SATÉLITE DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE VECTORES INFECTADOS
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
ESTABA SALAZAR, ANÁSTASIS MARÍA	CVLAC	19.683.215
	e-mail	tata_jg28@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Trypanosoma cruzi</i> , ADN satélite, PCR.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

El objetivo principal del presente trabajo fue la implementación de una prueba de alta sensibilidad y especificidad, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para el diagnóstico molecular de *Trypanosoma cruzi* en triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas. Para el proceso de estandarización de la prueba, en primer lugar, se analizaron las heces preservadas en papel de filtro de 30 insectos reduvídeos, 15 infectados y 15 sin infección, previamente identificados y enviados por el Laboratorio de Referencia Nacional de Inmunodiagnóstico de Chagas (Maracay, Venezuela). El ácido desoxiribonucleico (ADN) fue extraído y purificado empleando columnas de sílica de la casa comercial Qiagen. La PCR, se llevó a cabo utilizando los cebadores TCZ3 y TCZ4 que amplifican fragmentos específicos de ADN del parásito de 168 pb, 360 pb y 550 pb. El criterio de positividad de la prueba fue la observación de las bandas específicas del ADN de *T. cruzi* con los pesos moleculares anteriormente mencionados. Los resultados fueron expresados en porcentaje de sensibilidad y especificidad obteniendo un 100% y un 93,33%, respectivamente. Asimismo, se obtuvo un valor predictivo negativo y positivo de 100% y 94,00%, respectivamente. Este trabajo constituye unas de las primeras investigaciones realizadas utilizando el par de cebadores TCZ3 y TCZ4 en heces de triatomíneos y representa una herramienta de gran valor en el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en vectores.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
BERRIZBEITIA, MARIOLGA	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	6.119.292
	e-mail	mberriz@hotmail.com
MELFRAN, HERRERA	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	12.660.798
	e-mail	liangelve@hotmail.com
GUZMÁN, MILITZA	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8.954.225
	e-mail	militzaguz@yahoo.es

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

12	08	03
----	----	----

Lenguaje: Spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis – EstabaA.doc	Application/Word

Alcance:

Espacial: Internacional

Temporal: Temporal

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciada en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio:

Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *Martínez*
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

Juan A. Bolanos Cunele
JUAN A. BOLANOS CUNELE
Secretario



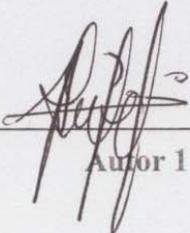
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

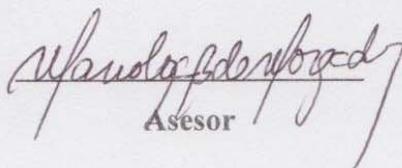
JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.


Autor 1


Asesor

POR LA COMISIÓN DE TESIS:

