

73
ej^o



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA POR CUATRO AISLADOS MEXICANOS DE *Trypanosoma cruzi* EN MODELO MURINO.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARIA DE LOURDES CABALLERO GARCIA



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Ciudad Universitaria, D.F., a 20 de Marzo de 1996.

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Estudio de la Respuesta Inmune Humoral inducida por cuatro aislados
mexicanos de Trypanosoma cruzi en modelo murino".
realizado por Caballero García María de Lourdes
con número de cuenta 8632963-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

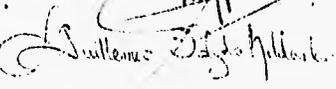
Atentamente

Director de Tesis Propietario Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez. 

Propietario Dr. Alejandro Cruz Reyes 

Propietario Biol. Gabriela Rosas Salgado. 

Suplente M. en C. Azucena Herróez Zamorano. 

Suplente Dr. Guillermo Salgado Maldonado. 

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM) el haberme otorgado una beca para la elaboración del presente trabajo que formó parte del proyecto "Caracterización, purificación y clonación de antígenos específicos de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*." Clave IN 211794.



"Las notas insitadas, originales y complejas con el profundo sentimiento de un canto hecho jazz, acompañan mi loco entusiasmo que suele manifestarse en un pequeñísimo sueño hecho realidad, de una visión fantástica e increíble que acompañan mágicos seres eucariontes llamados protozoarios..."

La inmunidad, un protozario y las notas de jazz revoloteando entre los eritrocitos, son solo una pequeña muestra de un regalo divino, en donde complejidad, belleza y armonía suelen no estar separados".

DEDICATORIA

A mi madre, porque con su ejemplo de valentía,
amor y gran apoyo, siempre me ha impulsado a
salir adelante.

A mi padre...

A: María Teresa Rouré, Norma Bautista y Laura Parra,
por sus primeras enseñanzas y útiles consejos que siempre
llevaré imborrables en el difícil camino de ser chagologa.

A mis seis alegres mosqueteros:
Viviano, Ciro, Falco, Génaro, Aristeo y Lupita.

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos que me han ayudado a conocer y amar la vida, influyendo directa e indirectamente en mi formación personal y académica.

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme la oportunidad de ser universitaria.

A la Facultad de Ciencias donde forjé mi vocación de bióloga y de la cual he adquirido el gran compromiso de contribuir en favor de los seres que me rodean.

A la Dra. Bertaha Espinoza, por sus consejos, paciencia y entusiasmo que de forma importante ayudó a acentar las bases para iniciarme dentro de la investigación.

Al Comité de Sinodales por sus atinadas observaciones en la revisión del presente trabajo.

A todo el personal del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas encabezado por los M.V.Z. Georgina Díaz Herrera, Carlos Villagrán y Gerardo Arrellín por su ayuda en el cuidado de los animales de laboratorio.

Al Sr. José Avilez (fotógrafo) y Rafael (dibujante) por contribuir en la realización de las ilustraciones de éste trabajo.

A los "cuates" del laboratorio que indiscutiblemente dieron al ambiente de trabajo un toque original de peculiar alegría: Vicky, Norma Espinoza, Normita, Alf, Verito, Salvador, Alejandro, Lolín, Gina (Giniferolde), Chema y Betty boo.

A mis otros compañeros del I.I.B. por muchas cosas: Claudita I y Claudita II, Martha, Rocío, Irena, Isabel Pérez, Julio César, Sra Ester, Isabel, Amade y a los que me faltaron.

A los "Megablastos" ese inolvidable grupo de amigos en la facultad, por su alegría, entusiasmo y compañerismo.

A la Familia Vives por hacerme sentir como uno de sus miembros. Su presencia fue y será muy importante.

A la memoria de mis ratones...
Su sangre fue la tinta que hizo posible este trabajo.
Hoy al verlo terminado una gran satisfacción me invade
y quiero compartirla como forma de agradecimiento
porque se que su sacrificio no fue inútil.

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	2
1.1. El parásito	
1.1.a. Biología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.1.b. Posición Taxonómica	3
1.1.c. Morfología	4
1.1.d. Ciclo de Vida	6
1.2. Enfermedad de Chagas	8
1.2.a. Distribución Geográfica	9
1.2.b. Enfermedad de Chagas en México	9
1.2.b.I. Vectores	10
1.2.b.II. Reservorios	11
1.3. Patología de la Enfermedad	11
1.4. Otras vías de infección en humanos	14
1.4.a. Enfermedad de Chagas congénita	14
1.4.b. Enfermedad de Chagas por hemotransfusión	15
1.5. Modelo murina en la infección por <i>T. cruzi</i>	16
1.6. Heterogeneidad de aislados de <i>T. cruzi</i>	17
1.7. Respuesta Inmune	18
1.7. a. Respuesta Inmune Celular	18
1.7. b. Respuesta Inmune Humoral	21
2. JUSTIFICACION	26

3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAL Y METODOS	28
4.1. Pársitos	28
4.2. Ratonos	28
4.3. Establecimiento del modelo murino	28
4.3.1. Infección a ratón Balb/c apartir de epimastigotes de cultivo	29
4.3.2. Mantenimiento de la fase de tripomastigote en modelo murino	30
4.3.3. Infección	30
4.4. Curvas de Parasitemia	30
4.5. Preparación de extractos totales de epimastigotes	31
4.6. Cuantificación de Proteínas de extractos de epimastigotes	31
4.7. Ohtención de suero de ratones infectados	32
4.8. Análisis Inmunológico	32
4.8.1. Ensayo de ELISA	32
4.8.2. Ensayo de Inmunotransferencia	33
4.8.3. Ensayo de Inmunotransferencia para determinación de Isotipos	33
4.8.4. Detección del isotipo IgE	34
4.9. Análisis estadístico	35
5. RESULTADOS	36
5.1. Mortalidad producida por los diferentes aislados de <i>T. cruzi</i>	36
5.1.1. Cinetica de mortalidad individual	37
5.1.2. Mortalidad acumulada	38
5.2. Análisis de la parasitemia producida por cuatro aislados de <i>T. cruzi</i>	39
5.3. Parasitemia y producción de anticuerpos	40
5.4. Identificación de proteínas antígenicas	47
5.4.1. Extractos totales de <i>T. cruzi</i>	47
5.4.2. Caracterización de proteínas antígenicas	48

5.5. Determinación de isotipos anti- <i>T. cruzi</i>	54
5.5.1. Isotipos contra el aislado Ninon	54
5.5.2. Isotipos contra el aislado H5	54
5.5.3. Isotipos contra el aislado Querétaro	55
5.5.4. isotipos contra el aislado Z10	55
5.6. Determinación del Isotipo IgE	66
6. DISCUSION	67
7. CONCLUSIONES	77
8. BIBLIOGRAFIA	78
APENDICE I	88
APENDICE II	89
APENDICE III	90
APENDICE IV	92

RESUMEN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, es una enfermedad compleja, de difícil diagnóstico y con una prevalencia que se vé favorecida por las condiciones socioeconómicas y educativas de la población que esta expuesta. Su agente causal es un protozooario parásito hemoflagelado de la especie *Trypanosoma (S) cruzi*. Durante la infección provocada por este parásito, la producción de anticuerpos influye en la muerte o sobrevivencia del hospedero. El objetivo del presente trabajo fue analizar la respuesta inmune humoral en ratones singénicos infectados con cuatro diferentes aislados de *T. cruzi*. El ensayo inmunoenzimático (ELISA) e inmunotransferencia (Western blot), se usaron para el análisis de sueros de ratones Balb/cANN infectados con los aislados mexicanos Z10 (Yucatán), Ninoa (Oaxaca), Querétaro (Querétaro) y H5 (Yucatán) de *T. cruzi*. Se siguió el curso de la parasitemia y se evaluaron: carga parasitaria, presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi*, antígenos reconocidos por los diferentes isotipos de anticuerpos producidos. Se encontró que en el desarrollo de la infección hubo diferencias significativas en la mortalidad inducida por los diferentes aislados. Los aislados Z10 y Querétaro fueron los que indujeron el mayor porcentaje de mortandad, siendo Z10 el más virulento al producir un 100% de mortalidad, siguiendo Querétaro con un 100 y 80% de mortalidad, mientras que el aislado H5 produjo porcentajes intermedios de muerte y Ninoa no indujo mortalidad. No se encontró correlación entre el nivel de anticuerpos y el grado de virulencia de los aislados. En la infección producida por los cuatro diferentes aislados se detectaron anticuerpos que reconocen antígenos de 45-50 y 70 kDa que parecen ser inmunodominantes. En los sueros de ratones infectados con cada aislado de *T. cruzi*, se observó que IgG2a e IgG2b predominan en los aislados que no inducen mortalidad. Se reporta también la presencia del isotipo IgA anti los aislados Ninoa y H5, mientras que el isotipo IgE no fué detectado. Finalmente se discuten estos resultados en función de la respuesta inmune celular al que están asociados. Este trabajo proporciona datos que apoyan la heterogeneidad biológica entre aislados mexicanos de *T. cruzi* lo cuál influyó directamente sobre el desarrollo de la inmunidad humoral y que permite sugerir que los mecanismos inmunosupresores del parásito para evadir el sistema inmune son dependientes de los diferentes aislados de *T. cruzi*.

1. INTRODUCCION

Durante muchos años en el Continente Americano, la enfermedad de Chagas fué considerada como una enfermedad exótica y rara, restringida exclusivamente a Brasil. Sin embargo, con los adelantos de las técnicas de inmunodiagnóstico y el mejoramiento de métodos epidemiológicos ha sido posible una apreciación más realista sobre ésta enfermedad. Hoy se sabe que la enfermedad de Chagas es una de las enfermedades parasitarias que está presente en toda América y principalmente Latinoamérica, lo que constituye un problema de salud pública (Lewinson, 1979). Su agente causal descrito en 1909 por Carlos Chagas, es un protozoario parásito de nombre *Trypanosoma cruzi* descubierto en el intestino medio de un insecto de la familia reduviidae, con su descubrimiento se reconoció una nueva enfermedad y un parásito con un ciclo de vida muy complejo capaz de crecer y multiplicarse en células de mamíferos (Chagas, 1909; Brener y Krettli, 1990).

1.1. El parásito

1.1.a. Biología de *Trypanosoma cruzi*.

T. cruzi, protozoario parásito, es un hemoflagelado del orden kinetoplástida, llamado así por la presencia de un cinetoplasto, estructura con una gran concentración de ADN mitocondrial organizado en redes de círculos unidos llamados maxicírculos y minicírculos, típicamente localizado cerca de la bolsa flagelar de estos organismos y cuya presencia y función esta relacionado con desarrollo. Siendo un monoflagelado, el flagelo emerge del blefaroblasto hacia el fondo de la bolsa flagelar la cual puede ser abierta por una o mas vacuolas contráctiles. Junto al flagelo se forma una membrana ondulante a lo largo del cuerpo que agitándose es siempre propagada hacia la parte anterior del flagelo con solo dos o tres ondulaciones (Schmith y Roberts, 1989; Sleigh, 1989). La presencia de una abertura apical en la bolsa flagelar comienza

como una depresión formando un túnel que continua en un tubo cilíndrico estrecho transcurriendo en lo profundo de la célula y cuya importancia en casi todas las especies de flagelados consiste en abrir o cerrar la bolsa flagelar. Un beflaroblasto, cuerpo basal o centriolo se encuentra localizado anterior al cinetoplasto, es un cilindro compuesto de nueve fibrillas igualmente divididas y que presenta un contenido de ADN sin que se sepa con exactitud su origen, su función es desconocida. Todas las formas tienen un solo núcleo de tipo vesicular y la reproducción sexual no ha sido observado directamente. Su alimentación ocurre por pinocitosis, la cuál involucra el paso de alimento a la bolsa flagelar, absorbiéndole directamente a través en un alargamiento de vacuolas que se forman al final de la misma (Noble y col., 1989). Basado en las características del desarrollo que tienen en su hospedero invertebrado son clasificados en la sección Stercoraria por desarrollar formas infectivas en el intestino del vector, siendo su hospedero intermediario un insecto de la familia reduviidae principalmente de la especie *Triatoma* (Cox, 1987 ; Schmidt y Roberts, 1989).

1.1.b. Posición Taxonómica (Levine y col., 1980)

Reino :	Protista Haeckel, 1860
Subreino:	Protozoa Goldfuss, 1818, emd. Vonsiebold, 1846
Phylum:	Sarcomastigophora Honingberg y Balamuth, 1963
Subphylum:	Mastigophora Diesing, 1866
Clase:	Zoomastigophorea Calkins, 1909
Orden:	Kinetoplastida Honingberg, 1963
Suborden:	Trypanosomatina Kent, 1880
Familia:	Trypanosomatidae Doflein, 1911
Género:	<i>Trypanosoma</i> Gruby, 1843
Subgénero:	<i>Schizotrypanum</i> Chagas, 1909
Especie:	<i>Trypanosoma cruzi</i> Chagas, 1909

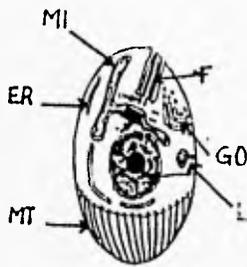
1.1.c. Morfología

De acuerdo a su desarrollo, *T. cruzi* presenta cuatro estadios morfológicos: amastigote, epimastigote, tripomastigote y promastigote (Jocklik, Willet y Amos, 1986; Schmidt y Roberts, 1989) pero algunos autores como Dusanic (1991) consideran solo tres estadios morfológicos. En éste trabajo consideraremos la clasificación morfológica propuesta por Dusanic, 1991 y Mehlhorn y Piekarski, 1993 (Figura 1).

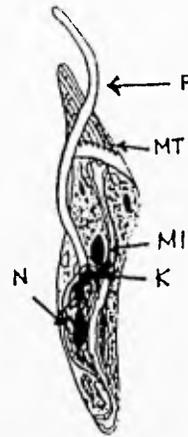
Amastigote. Tiene una forma esférica u oval de 2-4 μ m de diámetro y presenta un flagelo corto. Constituye la forma de división que ocurre intracelularmente en el tejido de los hospederos mamíferos.

Epimastigote. Los organismos tienen la forma elongada de aproximadamente 20 μ m de longitud, su flagelo es libre y el cinetoplasto está localizado anterior al núcleo. Constituye la forma que se multiplica dentro del tubo digestivo del vector, así como en los medios de cultivo axénicos.

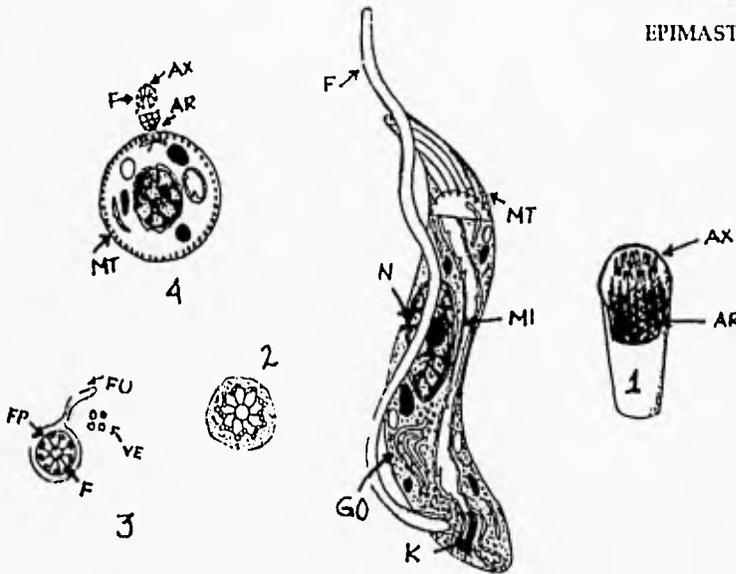
Tripomastigote. Mide aproximadamente 20 μ m de longitud, su cinetoplasto está localizado posterior al núcleo, tiene un flagelo y una membrana ondulante que se extiende a lo largo del organismo. El tripomastigote metacíclico es la forma encontrada en el recto del insecto vector reduvido y considerado como la fase infectiva en el hospedero mamífero. El tripomastigote encontrado en sangre periférica de mamíferos es capaz de establecer infecciones intracelulares principalmente en tejidos como corazón, esófago y colon y transmitir la infección al vector cuando este se alimenta de sangre infectada. En contraste con la forma de "c" encontrada en la sangre del mamífero infectado, los tripomastigotes metacíclicos presentes en el insecto son delgados y usualmente rectos.



AMASTIGOTE



EPIMASTIGOTE



TRIPOMASTIGOTE

Figura 1. *Trypanosoma*: esquema con los tres estadios morfológicos y su ultraestructura. 1) Flagelo (representación tridimensional), 2) Aparato basal (corte transversal), 3) Saco del flagelo (corte transversal) y 4) Tripomastigote (corte transversal) AR=Varilla axilar; AX= Axonema; B=Aparato basal; DG=Inclusión densa, glucosoma (lugar de transformación de la glucosa en glicerato-3-fosfato); ER=Retículo endoplásmico; F=Flagelo; FP=Bolsa del flagelo; FU=Canal digitado; GO=Aparato de Golgi; K= Cinetoplasto; L=Lípido; MI=Mitocondria; MT=Microtubulos; N=Núcleo; VE=Vesícula. (Tomado de Mehlhorn, H and Piekarski, G.1993).

1.1.d. Ciclo de Vida

Considerado como digenético, el ciclo se inicia cuando el insecto se ha alimentado con sangre que contiene tripomastigotes circulantes, y ha desarrollado la forma infectante conocida como tripomastigote metacíclico en su intestino medio, a través de multiplicación por fisión binaria de epimastigotes. Los tripomastigotes metacíclicos salen en las deyecciones del insecto, el cuál permanece alimentándose durante algunas horas, ingiriendo varias veces su peso corporal en sangre y defecando en la misma proporción sobre la piel o mucosas del hospedero mamífero. Los tripomastigotes penetran la membrana de mucosas, conjuntiva, abrasiones en la piel o pequeñas heridas causadas por el piquete del insecto, debido al arrastre de la materia fecal hacia estas zonas. Una vez dentro los tripomastigotes invaden células cercanas al sitio de entrada y en éstas células son cercados por vacuolas endocíticas. Aunque ocurre una fisión fagolisosomal, los parásitos no mueren, diferenciándose al estado de amastigote. Los amastigotes se multiplican profusamente por fisión binaria en el citoplasma celular, llenando la célula y produciendo su lisis, liberando parásitos hacia la circulación donde se transforman rápidamente en tripomastigotes sanguíneos, diseminándose vía hemática por todo el organismo y penetrando nuevas células del hospedero, transformándose así nuevamente en amastigotes, repitiendo este proceso varias veces más. El ciclo se completa cuando un insecto libre de infección se alimenta sobre un mamífero infectado, pica y succiona sangre contaminada con tripomastigotes sanguíneos y reinicia los mecanismos antes mencionados (Romero y Rojas, 1988; Dusanic, 1991; Mehlhorn y Piekarski, 1993) (Figura 2).

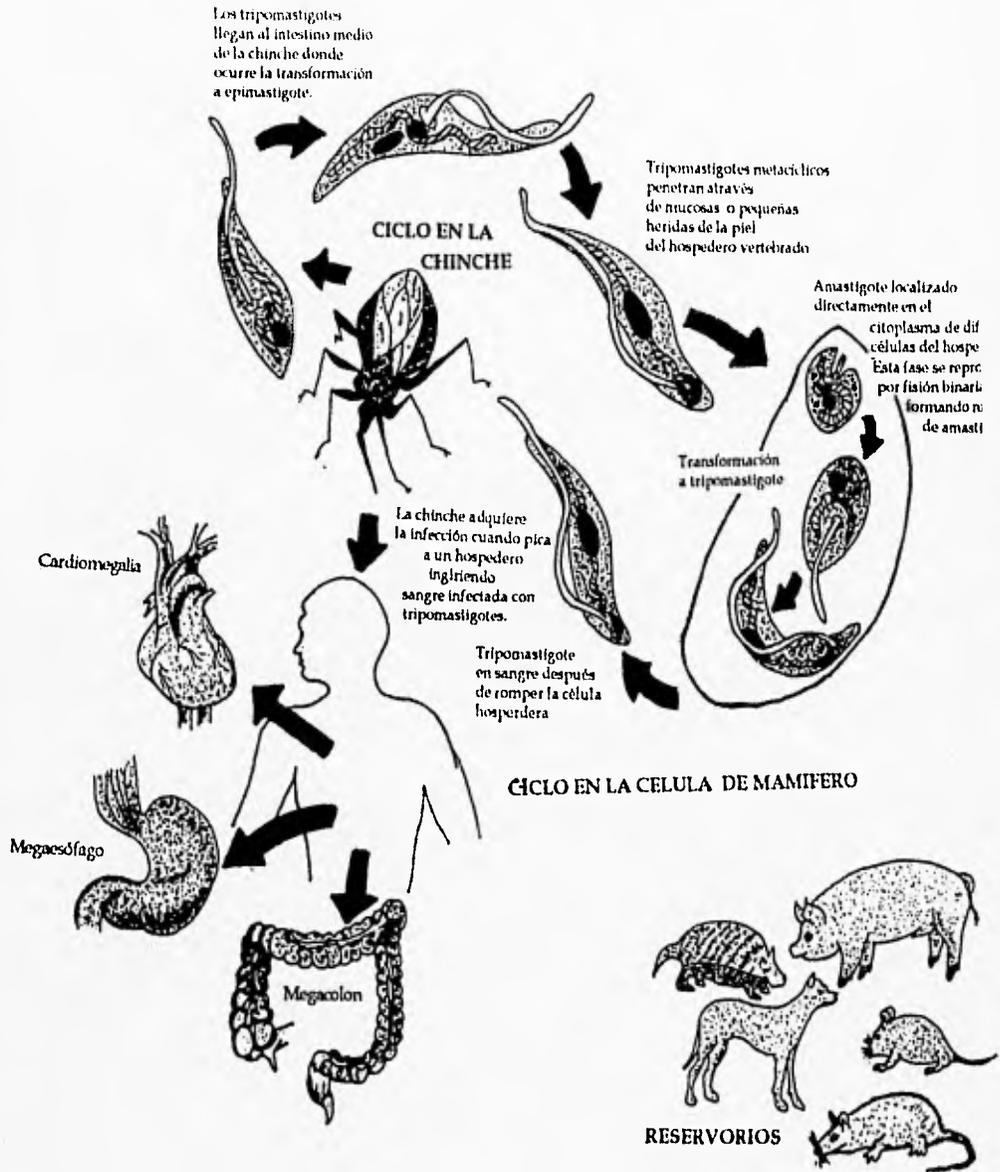


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. La Figura muestra las diferentes fases de desarrollo en el insecto vector y en el hospedero vertebrado (Modificado de Romero, H y Rojas, P. 1988; Mehlhorn, H and Piekarski, G, 1993).

1.5. Enfermedad de Chagas

Una primera descripción de la enfermedad se da en Brasil en 1587, donde es conocida como Mal de Bicho y es caracterizada por recto distendido, estos signos se asociaron al crecimiento de colon presente en casos crónicos de la enfermedad. Posteriormente en 1590, se da la primera descripción del insecto redúvido por un sacerdote misionero en Tucuman Argentina, un área endémica de la Enfermedad de Chagas (Tizard, 1992). Otros datos que comprueban la existencia de la enfermedad, son los escritos de Charles Darwin en un capítulo en "The Journal of the Voyage of H. M. S. B. Beagle" al describir el contacto que tuvo con una especie de redúvido muy común en la Villa de Luxan, provincia de Mendoza, Argentina, conocida como benchuca y que por sus características correspondía a *Triatoma infestans*, uno de los más importantes vectores de *T. cruzi* en Argentina, Chile y partes de Brasil (Adler, 1959). Esta es una provincia argentina que años más tarde, se reportó como área de alta incidencia de la Enfermedad de Chagas y en la que Darwin estuvo expuesto a la infección en más de una ocasión. Aunque es imposible afirmar con certeza que Darwin fue víctima de la Enfermedad de Chagas, hay dos puntos que no pueden pasarse por alto como son: sus síntomas, que encajan en lo descrito para esta enfermedad y las condiciones óptimas en las que se mantuvo expuesto a la infección con *T. cruzi* (Adler, 1959). Pero el evento definitivo que vendría a confirmar la existencia de la enfermedad, fue su descubrimiento realizado en 1909 por Carlos Chagas, en el Estado de Minas Gerais, Brasil, quien describe las formas clínicas, su patología y además al transmisor, el hospedero intermedio, reservorios y un modelo de transmisión (Chagas, 1909; Lewinson, 1979).

1.2.a. Distribución Geográfica

La infección por *T. cruzi*, es considerada como una zoonosis parasitaria que constituye un problema de salud pública en los países latinoamericanos (Schenone y Rojas, 1989) al involucrar una gran variedad de vectores y reservorios mamíferos. Su distribución ocurre desde la zona sur de los Estados Unidos hasta Argentina y Chile limitándose únicamente al Continente Americano (Acha y Szyfres, 1986). La prevalencia de infecciones altas se da principalmente en países de Sudamérica (Dusanic, 1991).

1.2.b. Enfermedad de Chagas en México

En México, hablar sobre la enfermedad de Chagas implica enfrentar un problema complejo donde el primer paso es conocer la magnitud real de la enfermedad. Durante muchos años, ésta enfermedad no ha sido considerada importante en el país. Sin embargo el primer registro de la enfermedad se da en 1940, cuando se diagnostica el primer caso de infección humana (Mazzotti, 1940). De ahí hasta 1980 se tenía el registro de 141 casos humanos comprobados parasitológicamente, aumentado en los últimos 12 años con 46 casos más, haciendo un total aproximado de 187 (Tay y col., 1992). Al hablar de la distribución de la enfermedad de Chagas en México, diversos reportes han dado a conocer varias zonas endémicas y otras zonas aparecen con una prevalencia variable (Velasco-Castrejón, 1992; Tay y col., 1992).

Trabajos basados en encuestas seroepidemiológicas muestran datos que permiten calcular una infección de entre tres y cuatro millones de mexicanos afectados; entre 1949 y 1985 el análisis de un total de 6672 personas revela una seroprevalencia menor al 6% en los estados de Zacatecas, Jalisco, Guerrero y Oaxaca, (Salazar, De Haro y Uribarren, 1988) sin embargo estos datos no concuerdan en otros reportes como un estudio realizado en Mialuthán, Oaxaca que reporta una

prevalencia de 88% en niños en etapa escolar (Tay y col., 1986). También en la comunidad de Chila del mismo estado de la República, evaluaciones electrocardiográficas demostraron anomalías cardíacas significativas en pacientes que mediante análisis serológicos resultaron positivos, sugiriendo al estado de Oaxaca como una región del país con índices elevados de infección por *T. cruzi* (Goldsmith y col., 1992). También se han registrado nuevos casos al sur de Chiapas en la frontera con Guatemala y cercano a la Costa del Pacífico, así como en el Estado de Hidalgo principalmente en regiones áridas del Mezquital, las Huastecas potosina, hidalguense, veracruzana y tamaulipeca; mientras que la Selva Lacandona y El Marqués de Comillas presentaron una seropositividad elevada mayor al 20% en 1988 (Velasco- Castrejón, 1992). En el estado de Puebla, aplicando encuestas clínico epidemiológicas se detectó una seropositividad del 10% (Pérez y col., 1994) y en el estado de Guerrero se confirma la existencia de la infección por *T. cruzi* en 20 comunidades (Anderson y col., 1990) colocándolo como una zona geográfica de la República Mexicana que debe ser tomada como zona de alta prevalencia de enfermedad de Chagas.

1.2.b.i. Vectores

Se sabe que más de 110 especies de insectos de la familia Reduviidae y subfamilia Triatominae actúan como vectores de la Enfermedad de Chagas en Latinoamérica y se ha encontrado que 53 especies de triatomíneos se encuentran infectadas en forma natural y 36 se pueden encontrar en viviendas humanas (Acha y Szyfres, 1986). Como ejemplo de insectos vectores eficientes, se encuentran: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* y *Triatoma dimidiata* (Acha y Szyfres, 1986; García y Azambuja, 1991; Schenone y Rojas, 1989). Sin embargo en la República Mexicana, el género *Triatoma* es el que está más ampliamente distribuido con especies entre las que se encuentran: *T. phyllosoma*, *T. barberi* y *T. dimidiata*, considerándose a *T. barberi* como la

principal especie transmisora de *T. cruzi* en México (Zárate y Zárate, 1985). No obstante, otras especies como *Diperalogaster maxima* al extremo sur de Baja California, *Rhodnius prolixus* al sureste del país o bien *Eratyrus cuspidatus*, *Behnius costaricensis* y *Panstrongylus geniculatus* en Veracruz, han sido reportadas como transmisores (Salazar, De Haro y Uribarren, 1988; Tay y col., 1992).

1.5.b.II. Reservorios

Otro aspecto importante en el estudio de la Enfermedad de Chagas en México, es el que concierne a los reservorios, un tema poco estudiado y por lo tanto un área con poca información de lo que ocurre en el país. Fue en 1947 cuando se reporta a *Didelphis marsupialis* (tlacuache) como el primer caso de un reservorio infectado con *T. cruzi* en México (Aguirre, 1947). Posteriormente, Mazzotti y Días en 1949, reportaron a *Dasyus novemcinctus* (armadillo) y *Canis familiaris* (perro) como otras dos especies de mamíferos infectadas. Un estudio más reciente, realizado en 1979 por Tay y cols., reportó como reservorio a *Mus musculus* (ratón). Por otro lado, según datos presentados hasta 1985, los estados de la República Mexicana en donde ha sido reportada la presencia de reservorios infectados con *T. cruzi* son muy pocos (Tay y col., 1992), además de que, como los mismos autores lo comentan, estos datos no pueden considerarse como representativos debido a la falta de estudios bien diseñados. Finalmente en 1993, un estudio realizado en el estado de Morelos, reporta la presencia de reservorios peridomésticos de *T. cruzi* como importantes en la infección para esa zona del país, señalando a *Suis domesticus* (cerdo) como un reservorio infectado naturalmente (Bautista, 1993).

1.3. Patología de la enfermedad

Se conocen de tres a cuatro fases en el desarrollo de la infección (Rassi y col., 1992).

Periodo de incubación.

Tiene una duración de 7 a 10 días, comenzando poco después de la penetración al tejido conectivo del hospedero, provocando una reacción inflamatoria local conocida como signo de Romana si la vía de entrada fue a través de la mucosa palpebral, teniendo como consecuencia un edema indoloro en los párpados, conjuntivitis y adenopatía regional; o bien chagomas de inoculación si la vía de entrada fue en cualquier otro lugar del cuerpo; en algunos casos pueden presentarse edemas generalizados. Durante este periodo preliminar de incubación los amastigotes proliferan dentro de las células del tejido infectado para desarrollarse en tripomastigotes. Al romper la célula los tripomastigotes se liberan hacia el torrente sanguíneo para infectar de nuevo a otras células propagándose la infección (Dusanic, 1991; Rassi y col., 1992).

Fase aguda

Esta fase tiene una duración de de 4-5 semanas post-infección. Es muy frecuente en niños menores de 5 años y con menor incidencia después de los 15 años (Tizard, 1992), pero también puede presentarse a cualquier edad. La enfermedad se manifiesta por una reacción febril de moderada severidad que raramente excede de los 40°C, con carácter de intermitente o continúa.

Hay dolor muscular, sudor, hepatoesplenomegalia moderada, irritabilidad extensa, linfadenopatía, anorexia y algunas veces vómito y diarrea. Puede haber manifestaciones de miocarditis con dilatación cardíaca y cambios electrocardiográficos, hipotensión y taquicardia; la agresión al sistema nervioso central puede manifestarse por una encefalomielitis o meningoencefalitis de consecuencias letales en un 8% de los casos y que afecta principalmente a niños (Rassi y col., 1992; Tizard, 1992). Las lesiones en la fase aguda de la enfermedad son de

tipo inflamatorio, caracterizadas por una ruptura de células y la aparición de tripomastigotes en la sangre en donde antígenos y sustancias tóxicas son liberadas, aunque el parásito puede encontrarse en cualquier parte del organismo tiene predilección por células del sistema reticuloendotelial, músculo esquelético o cardíaco y por el sistema nervioso central aunque la infección en células del músculo liso en esófago y colon son también frecuentes en algunos casos, en éstos sitios los infiltrados celulares están compuestos por neutrófilos polimorfonucleares, monocitos y linfocitos (Acha y Szyfres, 1986; Rassi y col., 1992; Tizard, 1992).

Fase indeterminada o de latencia

Caracterizada por una serología positiva y/o un xenodiagnóstico positivo. Los parásitos continúan una lenta multiplicación intracelular dentro de los órganos y tejidos del hospedero.

Durante esta fase no hay manifestaciones clínicas o de alteraciones electrocardiográficas y radiológicas habiendo una disminución casi total en la sintomatología. Su patología no es particularmente remarcable y no muestra evidencias de daño en el funcionamiento de órganos.

La fase permanece latente durante años, reportándose que en áreas endémicas ésta se manifiesta durante las tres primeras décadas de vida (Acha y Szyfres, 1986).

Fase crónica

Es la forma más evidente de la enfermedad de Chagas, no solo por incapacitar a las personas infectadas en la edad mas productiva de su vida, sino porque con frecuencia los lleva a la muerte. Esta fase de la enfermedad se presenta solo en un 10 al 30% de individuos infectados, siendo los megasíndromes y la cardiopatía chagásica la forma más común e importante, aunque puede haber manifestaciones menos comunes como encefalitis,

exocrinopatías y endocrinopatías. En los órganos afectados hay disfunción del tejido debido a una hipertrofia de las capas musculares así como también fibrosis que trae como consecuencia un engrosamiento de la pared de los órganos (Acha y Szyfres, 1986; Dusanic, 1991). Sus manifestaciones pueden aparecer 10 o 30 años después de la fase aguda, avanzando progresivamente hasta lograr la total destrucción del tejido, provocado por sustancias citotóxicas liberadas por el parásito (Kierszenbaum y col., 1986).

En varias áreas endémicas de América Latina se observa con más frecuencia la forma digestiva de la infección chagásica consistente en visceromegalias, especialmente en megacolon y megasófago (Acha y Szyfres, 1986). En México se han descrito algunos casos de estos megasíndromes para los Estados de Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Jalisco y Tabasco, donde, sin embargo, la cardiopatía chagásica crónica es más conocida (Reyes, 1984).

1.4. Otras vías de infección en humanos

1.4.a. Enfermedad de Chagas congénita

Después de que Carlos Chagas sugirió la posibilidad de la transmisión trasplacentaria en la tripanosomiasis americana en 1911 (Referido en Velasco-Castrejón, 1992), diversos estudios reportan del 2 al 4% de transmisión en casos de infantes de madres infectadas usualmente en la fase indeterminada de la enfermedad, se producen abortos espontáneos, nacimientos prematuros o muerte del feto con un 70% de casos de mortalidad (Dusanic, 1991; Tizard, 1992).

Los niños que sobreviven, desarrollan manifestaciones clínicas similares a la fase aguda de la infección. Se cree que su patología es debida a la parasitosis del tejido por *T. cruzi*, aunque los amastigotes han sido observados ocasionalmente en el feto y la placenta. El corazón, músculo esquelético, cavidad visceral, cerebro y piel son frecuentemente afectados. En éstos órganos hay

infiltrado de células mononucleares, algunas veces acompañado por granulomas compuestos de linfocitos, monocitos y macrófagos, mientras que en la placenta se observan reacciones inflamatorias en las vellosidades (Tizard, 1992).

1.4.b. Enfermedad de Chagas por hemotransfusión

En el año de 1950, un elevado número de estudios epidemiológicos demostraron prevalencias significativas de infección chagásica por hemotransfusión en toda Latinoamérica (Dias, 1987). En los últimos años esta vía de infección ha sido considerada como un verdadero problema en la transmisión, y un riesgo hacia otros países libres de vectores como Estados Unidos y Canadá por la migración de personas infectadas (Kirchoff y Neva, 1985). En áreas endémicas, como Brasil, Chile y Venezuela, los niveles de transmisión por este medio constituyen una incidencia elevada y potencialmente peligrosa (Acha y Szfres, 1986). Diversos factores están involucrados en esta forma de infección, la virulencia de aislados de *T. cruzi*, la magnitud de la parasitemia en la sangre del donante, el estado general del receptor, la cantidad y la frecuencia en donaciones son también factores relacionados con los riesgos de infección. En México, el estudio de posible sangre contaminada por este protozoario en bancos de sangre es relativamente nuevo así como la obligación en realizarlo (Diario Oficial México, 1992). Estudios realizados en bancos de sangre de distintos estados de la República Mexicana reportaron una prevalencia de seropositividad que abarca un rango desde 0.67% en análisis realizados en el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, hasta 16.5% en el Hospital Universitario de Puebla, lo que a su juicio les permitió considerar a esta vía de transmisión como potencialmente peligrosa en nuestro país (Velasco-Castrejón y cols., 1992).

1.5. Modelo murino de infección por *T. cruzi*

El modelo murino de la enfermedad de Chagas ha provisto un patrón de estudio que se asemeja a lo que sucede en la enfermedad humana, representando una ventajosa posibilidad de analizar la infección (Andrade y col., 1985; Mortati y col., 1992).

Muchos han sido los trabajos que confirman su importancia, permitiendo comparar la resistencia natural de diferentes cepas de ratón frente a aislados virulentos y no virulentos de *T. cruzi* donde el papel de la resistencia innata es influenciada entre otros factores, por el sexo y la edad del hospedero (Trischmann y col., 1978). Encontrándose que en la infección murina por *T. cruzi*, los estrógenos podrían neutralizar toxinas producidas por el parásito previniendo choques endotóxicos, lo que confiere una mayor resistencia a ratones hembras que a machos (Tay, Alonso y Salazar, 1978). Trischmann en 1978 y posteriormente en 1982, sugiere una asociación entre el fondo genético de las cepas de ratón y la respuesta inmune, encontrando que el curso de la parasitemia varía de acuerdo a la cepa de ratón utilizada, sugiriendo un patrón de altas parasitemias en cepas susceptibles (C57BL/10), y bajas parasitemias en cepas resistentes (C3H), mientras que en las cepas con una susceptibilidad intermedia (Balb/c), la inoculación con alto número de parásitos provocará altas parasitemias e incrementará la mortalidad; esto se explica debido a que la resistencia en el ratón, puede ser gobernada por componentes genéticos, capaces de variar los grados de expresión en susceptibilidad y resistencia a la infección. En conclusión, en el modelo murino los niveles de tripomastigotes en la sangre, su letalidad, la sobrevivencia hasta una fase crónica y su virulencia dependerán de: a) las cepas del ratón y parásito utilizados, b) la cantidad del inoculo en infecciones

experimentales y c) a las diferencias en el tropismo hacia diferentes tejidos del hospedero (Melo y Brener, 1978; Mortati y col., 1992).

1.6. Heterogeneidad en aislados de *T. cruzi*

Estudios de aislados de *T. cruzi* han puesto de manifiesto un comportamiento heterogéneo entre éstos. Esta heterogeneidad puede ser la causa de las diferencias observadas entre aislados de distintos países o de zonas dentro de un mismo país, haciendo variar los cuadros clínicos desde una muerte súbita hasta un comportamiento asintomático (Miles y col., 1981). Se ha sugerido que hay distintos aspectos involucrados en las diferencias encontradas entre los aislados de *T. cruzi*. Por un lado, diferencias en el comportamiento en hospederos a nivel experimental (Andrade, 1974), diferencias en la composición antigénica (Andrade y col., 1981) susceptibilidad al efecto causado por drogas (Andrade, 1979; Andrade y col., 1981; Andrade, Magalhaes y Pontes, 1985), diferencias en patrones izoenzimáticos que demuestran variabilidad genética (Andrade, Brodskyn y Andrade, 1983; Tibayrenc y col., 1986); así como diferencias en los patrones de ADN del cinetoplasto analizado por digestión de endonucleasas (Miles, 1983; Tibayrenc y Ayala, 1988).

Los estudios de aislados mexicanos también presentan heterogeneidad en su comportamiento. Tay y cols., en 1973, encontraron diferencias en curvas de parasitemia, mortalidad y patogenicidad en un modelo "in vivo" de infección con seis aislados mexicanos de diferentes zonas geográficas, mientras que Salazar y col., en 1975 y posteriormente en 1978 utilizaron el mismo modelo de infección, confirmaron la variabilidad que poseen en virulencia los aislados mexicanos de *T. cruzi*, reportando como ejemplo de ello la infección producida en ratones por el aislado "Cocula", la cual indujo una elevada parasitemia, cambios producidos en su apariencia física como la presencia de una parálisis de las extremidades traseras, alta

virulencia y con ello elevados índices de mortalidad, impidiendo a los ratones sobrevivir la fase aguda; contrariamente un estudio realizado por Cruz en 1994, con el aislado "Ninoa", documentó el comportamiento que presenta un aislado no virulento, al no inducir muerte en los ratones ni cambios en su apariencia física. Estudios recientes de el comportamiento "in vitro" de aislados de *T. cruzi* han permitido demostrar heterogeneidad en este parásito. Comparando aislados mexicanos y sudamericanos, López en 1994, observó diferencias en las características de infectividad y metaciclogénesis, que permiten especular en torno a las diferentes características que presentan los aislados y por lo tanto la Enfermedad de Chagas en México respecto a otros países de Latinoamérica. Estudios a nivel genético mediante análisis de ADN total y del cinetoplasto mostraron heterogeneidad en 17 aislados mexicanos de *T. cruzi*, relacionando esta heterogeneidad con el origen geográfico de los aislados del parásito (Zavala-Castro; Velasco-Castrejón y Hernández, 1992). Mientras que Ramos en 1995, realizando un estudio molecular de aislados mexicanos de *T. cruzi* mediante análisis isoenzimáticos y por amplificación de ADN polimórfico (RAPD) reportó similitud entre dieciocho aislados, con excepción de C4 procedente de Jalisco, el cuál presentó un comportamiento diferente y cuya relación es más cercana a el comportamiento de los aislados sudamericanos.

1.7. Respuesta Inmune

1.7.a. Respuesta Inmune Celular

Siendo *T. cruzi*, un parásito con multiplicación intracelular, ha desarrollado mecanismos de infección hacia diferentes tipos celulares tanto células fagocíticas como no fagocíticas (Villalta y Kerszbaum, 1984). Diversos datos han sugerido que durante la fase aguda provocada por *T. cruzi* hay dos eventos importantes en la infección: una activación policlonal

de células T y B seguida de un estado de inmunosupresión, donde la interleucina 2 (IL-2) se vé inhibida teniendo como consecuencia que otros mecanismos del sistema inmune se vean afectados (Ortíz y col., 1980; D'Imperio-Lima y col., 1985; Minoporio y col., 1986; Kierszenbaum y Stein, 1990; Pakinathan y Kuhn, 1992). Mientras que debido a la presencia del parásito se ha reportado el desarrollo de lesiones en diversos tejidos que resultan afectados durante la fase aguda y crónica de la enfermedad observando infiltrados de células inflamatorias (Molina, 1989; Villalta y Kierszenbaum, 1984).

Un primer grupo de células, los macrófagos, que en forma general participan dentro del sistema inmune como grupo de células presentadoras de antígenos (CPA), han jugado un papel simultáneo en la infección por *T. cruzi* al contribuir en los mecanismos de defensa del hospedero y al mismo tiempo proveer un ambiente favorable para la transformación intracelular y crecimiento del parásito (Villalta y Kierszenbaum, 1984).

Experimentalmente se ha demostrado que el efecto tripanomicida de los macrófagos es activado por diversas señales, que pueden incrementar la muerte del parásito mediante la vía del oxido nítrico (Gazzinelli y col., 1992; Metz, Carlier y Vray, 1993). Estas señales son producidas por un grupo de proteínas solubles secretadas por diferentes tipos celulares principalmente células T, y son llamadas citocinas, cuya función consiste en mediar y regular la respuesta inmune. Se ha demostrado que el interferón gama (INF- γ), durante la fase aguda experimentalmente inducida en ratones con *T. cruzi*, es un activador de macrófagos murinos confiriéndole a éstos la capacidad de matar el parásito, permitiéndole al individuo infectado sobrevivir a la fase aguda, incrementando la respuesta inmune específica e induciendo la expresión de diversas células presentadoras de antígenos, además de los macrófagos (Wirth y col., 1985; Reed, 1988). Por otro lado, estudios "in vitro" han presentado evidencias que indican la presencia de otras dos citocinas relacionadas con la activación de macrófagos, por

un lado la presencia del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor estimulante de colonias granulocíticas y macrófagocíticas (GM-CSF), son señalados en una posible acción sinérgica con el INF- γ (Muñoz-Fernández, Fernández y Fresno; 1992; Reed y col., 1987), mientras que Ho y col., en 1992, reportaron que la interleucina 3 (IL-3) tenía la capacidad de activar macrófagos en la infección por *T. cruzi* pudiendo ser este efecto semejante a la acción realizada por el INF- γ lo que permite relacionarla como un mecanismo de defensa en el hospedero.

Los linfocitos T juegan un papel importante dentro de la respuesta inmune celular al contribuir con una actividad antimicrobiana provocada por la presencia del antígeno. Las células T producen citocinas con diversas funciones, con las cuales se incrementa el efecto microbicida de otras células del sistema inmune como monocitos, macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK), también contribuyen en la diferenciación de células B a células plasmáticas para la producción de distintas clases de anticuerpos ayudando en la opsonización del parásito por fagocitosis y en los procesos de lisis por complemento (Levitz, Mathews y Murphy, 1995). De acuerdo a sus funciones, las células T se han dividido en: células T ayudadoras o CD4⁺ y células citotóxicas o CD8⁺, mientras que conforme a las citocinas secretada, se subdividen en dos fenotipos: Th1 que secreta interleucina 2 (IL-2) e INF- γ que favorecen la inmunidad mediada por células y la producción de IgG2a en ratón (Cox, 1987; Romagnani, 1992) y el Th2 con la secreción de: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que favorece la secreción de IgE y la eosinofilia (Morikawa y col., 1995). La importancia de las subclases CD4⁺ y CD8⁺ en ratones infectados con *T. cruzi*, se ha demostrado mediante timectomías en etapa neonatal o eliminando alguna de estas poblaciones de células T por medio de anticuerpos monoclonales anti-CD4 ó anti-CD8 en diferentes cepas de ratón, obteniendo como resultado una alta susceptibilidad y muerte en los individuos infectados

(Kierszbaum, 1995; Tarleton, y col., 1994; Younes-Chennoufi y col., 1988). Trabajos recientes han reportado que los linfocitos T CD8⁺ son importantes en la protección contra *T. cruzi*. Al analizar ratones deficientes en microglobulina β_2 y en la población de linfocitos T CD8⁺, estos organismos presentaron menor resistencia a la infección (Tarleton, 1990, 1991; Tarleton y col., 1992). Sin embargo, otros trabajos apoyan la importancia de las células T CD4⁺ en los mecanismos de defensa del hospedero contra *T. cruzi*, ya que al trabajar con diferentes cepas de ratón consideradas como susceptibles, intermedias y resistentes, a quienes se les eliminó la población de células T CD4⁺, se observó un incremento en la parasitemia y mortalidad de los individuos infectados (Minoporio y col., 1986; Rottemberg y col., 1992). Estos datos contradictorios indican que el papel de las subclases de linfocitos T en la defensa contra *T. cruzi* no ha sido bien esclarecido, de tal forma que hasta la fecha no pueda afirmarse nada concluyente del papel que desempeñan los linfocitos T en la infección provocada por *T. cruzi* (Kierszbaum, 1995).

Cabe mencionar que se han descrito otros tipos de células que también participan en los mecanismos de defensa del hospedero frente a la infección con *T. cruzi* a través de mecanismos tóxicos, ejemplo de ello son los gránulos de eosinófilos, así como las vacuolas fagolisosomales de neutrófilos que mediante la actividad de peroxidasa pueden eliminar al parásito, debido a la producción de niveles altos de H₂O₂. No obstante, es necesario hacer notar que tales mecanismos tóxicos pudieran contribuir a la patogénesis de la enfermedad, ya que se ha reportado que en los órganos infectados se observa una gran infiltración de estas células en tejido miocárdico, trayendo como consecuencia lesiones necróticas y degenerativas (Villalta y Kierszbaum, 1983; Villalta y Kierszbaum, 1984b; Kierszbaum, 1986; Molina y Kierszbaum, 1989).

1.7.b. Respuesta Inmune Humoral.

Se ha detectado la presencia de anticuerpos durante el desarrollo de la infección provocada por *T. cruzi* tanto en pacientes que padecen de la enfermedad, como en modelos animales experimentalmente infectados con el protozoario. A través de diversos estudios, se ha comprobado que los anticuerpos específicos contra el parásito son importantes en el control y resistencia a la infección (Kierszbaum y Howard, 1976; Takehara y col., 1981; Brener y Kretli, 1990), pero también el efecto inmunosupresor, que como ya se mencionó acompaña a la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, involucra daño en la inmunidad humoral (Cunningham, Kuhn y Rowland, 1978; Ramos y col., 1978) y la importante activación policlonal no específica de linfocitos B causada por la presencia del parásito, puede provocar anomalías responsables de la síntesis y secreción de inmunoglobulinas que pueden responder hacia antígenos exógenos, o bien, activadores policlonales con la consecuente perturbación de la inmunidad humoral (Ortiz y col., 1980).

Durante la fase aguda de la infección se ha reportado que la parasitemia comienza a descender a medida que la respuesta mediada por anticuerpos se eleva (Kretli y Brener, 1976); evento que tiene profundas implicaciones en la resistencia hacia el parásito en el modelo experimental murino (Takehara y col., 1981). En modelos animales, usando principalmente los modelos canino y murino, se ha demostrado que una vez que el animal ha sido infectado por *T. cruzi* hay un incremento de las inmunoglobulinas IgG e IgM que llegan a su máximo nivel a partir del día 35 post-infección (Lana y col., 1991; Spinella y col., 1992). Sin embargo, aún cuando se ha podido verificar que los niveles de anticuerpos son bajos durante la fase aguda, De Gaspari y cols., en 1994, reportaron que en esta fase de infección, los tripomastigotes sanguíneos ya han sido cubiertos con anticuerpos de la clase IgG específicos contra el parásito, teniendo éstos un papel muy importante en el control de la infección.

Según diversos estudios los niveles de la inmunoglobulina IgG, tienden a aumentar a medida que la infección avanza hasta la fase crónica, permitiendo con esto la opsonización del parásito y la subsecuente intervención de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (Madeira y col., 1979; Lima y col., 1985; Brener y Kretli, 1990). En el modelo murino, este evento también ha sido observado reportándose una respuesta inmune humoral dominada por diferentes anticuerpos cuyos clases de isotipos específicos contra el parásito son: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (Takehara y col., 1981; Spinella, Liegeard y Hontebryrie-Joskowicz, 1992; Bouhdidi y col., 1994). Su papel protector ha sido asociado con el efecto lítico hacia tripomastigotes sanguíneos mediado por la vía del complemento y se ha sugerido que la porción Fc de IgG es requerida para la destrucción "in vivo" del parásito (Umekita, Takehara y Mota, 1988). Hablando de las clases del isotipo de IgG mencionados anteriormente, se ha encontrado que en modelo murino, la subclase IgG2 es más efectiva contra la infección por *T. cruzi* por su habilidad de fijar complemento y lisar al parásito contribuyendo a los mecanismos de defensa del hospedero (Takehara y col., 1981; Cerban y col., 1993). Se ha mencionado que el isotipo IgG2b está implicado en la resistencia a *T. cruzi*, (Takehara y col., 1981; Rowland, 1992), pero también otros trabajos han reportado a el isotipo IgG2a como importante (Spinella y col., 1992; Bouhdidi y col., 1994), planteando que su síntesis puede ser explicada debido a una producción endógena de interferón γ (INF- γ) que promovería "in vivo" la producción de este isotipo por células B (Forrico y col., 1991). No obstante que se ha mencionado la importancia del isotipo IgG2 en la infección por *T. cruzi*, otro isotipo involucrado en la infección por este parásito es IgG1, el cuál ha sido encontrado en títulos altos, que a su vez han sido relacionado con una avidéz funcional que le hace responder mejor contra antígenos y que hacen a este anticuerpo importante, aún cuando su concentración corresponde únicamente al 10-20 % de todos los anticuerpos (Bouhdidi y col., 1994). Sin embargo otros trabajos proponen que los niveles elevados de IgG1 en suero de ratones infectados, podría

tener efectos que sean benéficos para el parásito, con la posibilidad de actuar como bloqueadores de otros anticuerpos, además de ser dirigidos hacia antígenos no importantes, desviando de ese modo al sistema inmune hacia una respuesta no efectiva (Rowland, Mikhail y Mc Cormic, 1992).

En humanos, durante el curso de la enfermedad de Chagas, se han reportado isotipos anti- *T. cruzi* de las clases IgG1 e IgG3 como importantes contra la infección, siendo probablemente equivalentes al isotipo IgG2 del modelo murino (Cerban, Gruppi y Vottero, 1993).

También se ha reportado la presencia de otras clases de inmunoglobulinas, como ejemplo, se menciona que IgM es una clase de anticuerpo que comienza a detectarse después de los primeros 14 días de infección en el modelo murino (Araujo, Heilman y Magalhães, 1984), también en humanos, utilizando extractos de las tres formas del parásito, éste anticuerpo ha sido detectado en sueros de pacientes en fase aguda de la infección (Primavera y col., 1990). A este anticuerpo se le ha conferido un papel dentro de la resistencia a *T. cruzi* durante la fase aguda de la infección, participando en acciones de lisis mediada por complemento (Powel y Wassom, 1993). No obstante, otro estudio reporta la presencia de este anticuerpo en títulos muy altos durante la fase crónica de la infección inducida experimentalmente, cuestionando con ésto la presencia de este anticuerpo como un rasgo exclusivo de la fase aguda, lo cual no ha podido ser esclarecido totalmente (Bouhdidi y col., 1994).

Trabajos recientes mencionan la presencia de IgA tanto en modelo murino como humano en infecciones por *T. cruzi*, durante la fase aguda, lo que sugiere que este anticuerpo tiene un posible efecto protector contra la infección (Primavera y col., 1990), aunque la importancia real de esta clase de anticuerpo no ha sido bien establecida (Grauert, M Houdayer y Hontebeyrie-Joskowicz, 1993).

Otro estudio reciente señala la presencia del isotipo de la clase IgE en la infección murina por *T. cruzi* (Bouhdidi y col., 1994) y este hallazgo provoca interés debido a que previamente no había

sido reportado la presencia de este anticuerpo en esta infección parasitaria, los autores mencionan que la concentración de este anticuerpo fué similar a los valores que durante el mismo estudio fueron reportados para el anticuerpo IgA, proponiendo que los niveles de IgE en éste análisis fueron significativos y explicando que la función de este anticuerpo puede estar relacionada con la estimulación de mecanismos efectores específicos contra *T. cruzi*, de la misma forma como sucede en infecciones provocadas por helmintos y *Toxoplasma gondii*, (Ridel y col., 1988; Hagan, 1993). Sin embargo el papel del anticuerpo IgE en la infección provocada por *T. cruzi* no está claro.

Lo que sí resulta ser un hecho, es que durante la fase crónica de la infección, los anticuerpos protectores están dirigidos contra epítomos de la superficie de membrana de tripomastigotes sanguíneos independientemente del aislado de *T. cruzi* de que se trate (Krettl y Brener, 1982). A este respecto, otros estudios han reportado que las diferencias entre aislados de *T. cruzi* influyen en la protección, detección y producción específica de ciertas clases de anticuerpos que durante el transcurso de la infección modifican sus títulos de aparición hasta llegar a la etapa crónica, pudiendo establecer una buena respuesta inmune que permita la recuperación de los animales infectados (Mikhail y Rowland, 1990; Pereira y Krettl, 1990; Lincon y Pérez, 1994).

2. JUSTIFICACION

Los estudios realizados a nivel biológico de aislados mexicanos de *T. cruzi* han permitido observar que entre ellos existe heterogeneidad que bien pudiera influir en las diferencias clínicas reportadas en distintas zonas geográficas. Un aspecto importante en la infección son los mecanismos que el sistema inmune utiliza en la defensa del hospedero. Diversos trabajos han reportado la importancia de la inmunidad humoral en esta parasitosis. Por lo que, en este trabajo se escogió el modelo murino de infección para analizar las diferencias a nivel de la inmunidad mediada por anticuerpos inducida por los diferentes aislados del parásito en éste hospedero, lo cuál permitirá sentar las bases para buscar mediante análisis inmunológicos, antígenos importantes que puedan ser usados en inmunoprolaxis y/o inmunodiagnóstico, así como también describir anticuerpos relacionados con la defensa a la infección y relacionar éstos con los mecanismos de inmunidad celular que permitan conocer mejor esta interacción parásito-hospedero.

3. OBJETIVOS

3.A. OBJETIVO GENERAL.

- * Estudiar la respuesta inmune humoral inducida por cuatro aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi* en modelo murino.

3.B. OBJETIVOS PARTICULARES.

- * Caracterizar la infección por *T. cruzi* en sus periodos: agudo y crónico, determinando virulencia y carga parasitaria.
- * Correlacionar la producción de anticuerpos respecto al desarrollo de la parasitemia.
- * Identificar las clases de isotipos que se generan durante el desarrollo de la infección.
- * Identificar la presencia de antígenos inmunodominantes en modelo murino.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. Parásitos

Para el desarrollo del siguiente trabajo se emplearon cuatro aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*: denominados Z10, H5 (Zavala-Castro y col., 1992), Ninoa (Cruz, 1994) (donados por el Dr. Roberto Hernández, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) y Querétaro (donada en su fase de tripomastigote por el Dr. Rubén Del Muro, Facultad de Medicina, U NAM). Su procedencia y origen se indica en la Tabla I.

TABLA I
aislados de *T. cruzi* empleados para el desarrollo del presente trabajo

Aislado	Procedencia	Origen
Ninoa	Oaxaca	Humano
H5	Yucatán	Humano
Querétaro	Querétaro	<i>Triatoma barberi</i>
Z10	Yucatán	<i>Didelphis marsupialis</i>

El origen de éstos aislados fue apartir de reservorios, insectos y hospederos definitivos tanto de la zona centro como del sureste de la República Mexicana.

4.2. Ratones

Se utilizaron ratones de la cepa singénica Balb/cANN hembras de 6-7 semanas, con peso promedio de 18-20 g, producidos y mantenidos en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

4.3. Establecimiento del modelo murino

Los aislados Z10, H5 y Ninoa se cultivaban en fase de epimastigote por lo que fué necesario transformarlos a la fase de tripomastigote para establecer la infección en modelo murino. Cabe

mencionar que el aislado Querétaro fué donado en su fase de tripomastigote en el modelo murino por lo que para este aislado no fue necesario realizar el procedimiento antes mencionado.

4.3.1. Infección a ratón Balb/cANN a partir de epimastigotes de cultivo.

Se cultivaron parásitos de los aislados Z10, H5 y Ninoa agregando 1ml de sangre de ratón sano y 1ml de parásitos en su fase de epimastigote a 4ml de cultivo LIT (Liver Infusion Tryptose) (Apéndice I) a pH 7.2, suplementado con 25mg/ml de hemina (SIGMA) y 10% de suero fetal de bovino (GIBCO) inactivado a 56°C durante 30 minutos (Chiarl y Camargo, 1984; López, 1994).

El cultivo se dejó envejecer durante 20 a 22 días para permitir su transformación a la fase de tripomastigote. Posteriormente se contó el número de parásitos y se realizó la prueba de lisis con complemento de cobayo para determinar el porcentaje de transformación (López, 1994). Una vez realizada la prueba del complemento, se realizó el primer pase de infección a ratones Balb/cANN de cinco días de nacidos, inoculando a tres ratones vía subcutánea en la región de la nuca con 1×10^6 parásitos/ml de cultivo por cada cepa de *T. cruzi*. Se dejaron transcurrir 15 días post-infección y pasado este tiempo se tomó una muestra de sangre a partir de un corte en la región distal de la cola del ratón y se revisó la cantidad de parásitos. Si se detectaban parásitos en circulación eran sacrificados colectándose el total de la sangre de los tres ratones. Esa sangre fue usada para realizar el segundo pase de infección a otros cinco ratones de cinco días de nacidos inoculándoles vía subcutánea en la región de la nuca 100µl de sangre a cada uno con una cantidad de parásitos que no fue determinada debido a la poca cantidad de éstos; una vez infectados se dejaron transcurrir 15 días y pasado este tiempo los ratones fueron sacrificados. Se realizó un tercer pase de infección pero esta vez fue a ratones Balb/cANN hembras de 6 a 7 semanas de edad, inoculándolos vía intraperitoneal con 1×10^6 parásitos/ml, a quienes se les registró la parasitemia, determinando el día en que el número de parásitos fue mayor.

4.3.2. Mantenimiento de la fase de tripomastigote en modelo murino

Una vez establecida la infección en ratones de la cepa Balb/cANN, los animales fueron sacrificados el día máximo de parasitemia colectando la sangre infectada con tripomastigotes mediante un corte en el plexo axilar; para mantener la infección se inocularon con 5×10^5 parásitos/ml vía intraperitoneal a ratones hembras de 8 semanas de edad de la cepa CD-1; realizando periódicamente este mismo paso de acuerdo al comportamiento independiente de cada aislado de *T. cruzi* en los días en que alcanzaba su máximo pico de parasitemia.

4.3.3. Infección

Se obtuvieron tripomastigotes de sangre periférica de ratón de la cepa CD-1 y con ella se infectaron vía intraperitoneal a tres grupos experimentales de ratones de la cepa Balb/cANN, cada uno con cinco individuos. Los inoculos por cada grupo fueron de: 5×10^5 y 1×10^5 parásitos/ml.

4.4. Curvas de Parasitemia

Para detectar los parásitos en sangre y poder observar la carga parasitaria se tomó una muestra de sangre de la región distal de la cola de los ratones infectados, se hicieron diluciones 1:50 y 1:100 en una solución de Alsevers (Apéndice II) para contar el número de tripomastigotes sanguíneos por ml se contaron 10 μ l en cámara de Neubauer (Deane, 1984) utilizando un microscopio óptico MICROSTAR IV, (Reichert Jung) objetivo de 40x. El total de parásitos contados, fue multiplicado por 10^4 para corregir el volumen utilizado en la cámara, este resultado se multiplica por el factor de dilución, obteniendo el valor total de parásitos por mililitro en la sangre. Este procedimiento fue realizado a partir del cuarto día post-infección continuándolo con un intervalo de cada tercer día, hasta que los parásitos desaparecían de circulación o bien los ratones morían a causa de la infección.

4.5. Preparación de extractos totales de epimastigotes

Para la preparación de extractos totales que se usaron como antígenos en las pruebas de detección de anticuerpos, se utilizaron epimastigotes mantenidos en medio de cultivo de los aislados: Querétaro, Z10, H5 y Ninoa con 20 días de crecimiento, los cuales se concentraron por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos. Una vez concentrados, se decantó el sobrenadante y los botones fueron lavados dos veces con amortiguador de fosfato salino (PBS) pH 7.2. De los botones se obtuvo su peso y por cada gramo de peso húmedo se le agregó 5 ml de amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 8.2, conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas con una concentración final de: EDTA 500 mM, PMSF 200 mM, Leupeptin 10 mM, Pepstatin 1 mM y Bestatin 1 mM. Posteriormente la solución fue sonicada en cama de hielo para evitar que se desnaturalicen las proteínas en sonicador (modelo Ultra-Sonics) 60 Hz de amplitud, con pulsos de 2 segundos durante dos minutos, repitiendo el proceso tres veces. Una vez terminado dicho proceso la muestra fue agitada durante cinco minutos en vórtex (Micro Mixer modelo MM-50) para terminar de romper restos celulares, se verificó la lisis celular al microscopio óptico. Finalmente la muestra se concentró por centrifugación a 15000 g durante 30 minutos. Se colectó el sobrenadante de la muestra dividiéndolo en pequeñas alícuotas en tubos Eppendorf y congelándolo a -20°C hasta su uso.

4.6. Cuantificación de proteínas de extractos de epimastigotes

Se llevó a cabo la cuantificación de proteínas de los extractos totales obtenidos para los diferentes aislados utilizando el método de Bradford (1976), distribuido por Bio-Rad. Se construyó una curva patrón utilizando albúmina 1 µg/1 µl en PBS en concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 µg/ml. El blanco consistió únicamente de amortiguador de fosfato salino (PBS) pH 7.2.

Todo el proceso se realizó en una placa suave para ELISA, tomando la lectura del microensayo a 595 nm en un lector de ELISA (Bio-Rad Modelo 3550).

4.7. Obtención de suero de ratones infectados

Este procedimiento fue realizado en los mismos días post-infección que para la determinación de las curvas de parasitemia. Se tomó la mayor cantidad de sangre a partir de la región distal de la cola de cada ratón mediante un pequeño corte. La sangre fue colectada por grupo de acuerdo a cada lote experimental y a cada aislado de *T.cruzi* en tubos Eppendorf. La sangre se procesó dejando que coagulara para posteriormente centrifugar su contenido en microcentrífuga a 300 g durante cinco minutos, el suero fue guardado en pequeñas alicuotas a temperatura de -20° C hasta su uso.

4.8. Análisis inmunológico

4.8.1. Ensayo de ELISA

Para poder verificar la presencia de anticuerpos anti-*T.cruzi*, se llevó a cabo el ensayo inmunoenzimático ELISA (Voller, Bidwell y Barlett, 1979). Se usaron placas de 96 pozos (Costar) en donde se agregó la cantidad de 5µg/pozo del extracto total de los aislados, incubando durante dos horas en cámara húmeda a 37° C. Pasado este tiempo, el pegado inespecífico fue bloqueado con 200µl/pozo de albúmina al 1% diluida en amortiguador de fosfato salino (PBS) pH 7.2, incubado por dos horas en las mismas condiciones anteriores. Una vez bloqueado, se añadieron los sueros de ratón infectados, a una dilución de 1:100, incubando durante toda la noche a 4°C, para posteriormente agregar un segundo anticuerpo anti- IgG (cadena pesada y ligera) de ratón unido a peroxidasa (Zymed) diluido 1:2000, incubándose durante dos horas a 37° C. Después de cada incubación se realizaron tres lavados de diez minutos cada uno con solución PBS-tween 20 al 0.05 % para eliminar pegados inespecíficos. Posteriormente, la reacción en las placas se reveló con

100µl/pozo del sustrato ortofenildiamina (OPD), en amortiguador de citrato- fosfato pH 5 incubando a temperatura ambiente el tiempo necesario para que diera una reacción colorida. Para finalizar se paró la reacción con 50µl/pozo de ácido sulfúrico al 2.5 N y se leyó a 405 nm en un lector de ELISA (Bio-Rad Modelo 3550).

4.8.2. Ensayo de Inmunotransferencia

Con el propósito de identificar el número y características de las proteínas antigénicas reconocidas por los anticuerpos anti-*T.cruzi*, se utilizó la técnica de Inmunotransferencia o Western-blot (Gershoni y Palade, 1982 y 1983). Se realizó una separación de proteínas por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida a 12 % con SDS en condiciones reductoras (Laemmli, 1970) separando 150 µg de proteína de los extractos correspondientes (Apéndice III).

Se transfirieron las proteínas separadas a papel de nitrocelulosa (Apéndice IV). Posteriormente se bloqueó con leche al 10 % diluida en amortiguador de fosfato salino (PBS), toda la noche a 4° C, para luego cortarlo en tiras de 0.5 cm, e incubar éstas por dos horas con los sueros de ratones infectados diluidos 1:500, pasado este tiempo se agregó el conjugado anti-IgG de ratón cadena ligera y pesada unido a peroxidasa, diluido 1:2000, incubado durante dos horas a 37° C. Entre cada periodo de incubación se alternó una serie de tres lavados cada uno de diez minutos con PBS tween 20 al 0.1 %. Finalmente la reacción se reveló con el sustrato 3'3 diaminobenzidina a una concentración de 0.5 µg/ml diluida en amortiguador de fosfato salino (PBS) y se paró la reacción lavando con agua destilada.

4.8.3. Ensayo de inmunotransferencia para determinación de isotipos

Una vez analizada la producción de anticuerpos anti- *T.cruzi* y los antígenos que reconocen, se procedió a realizar el ensayo que permitiera identificar el isotipo al cuál pertenecen los anticuerpos producidos por los ratones infectados. Se realizó una electroforesis para separar las

proteínas de los extractos correspondientes a los diferentes aislados y se transfirió a papel de nitrocelulosa tal y como se refirió anteriormente. Los sueros de ratones infectados fueron incubados a una dilución 1:500, durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron los isotipos: anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgM y anti-IgGA de ratón producido en cabra (Sigma), diluidos en leche 10 % en una dilución 1:2000, dejándolos incubar durante dos horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se agregó un conjugado que consistió en un tercer anticuerpo anti-IgG unido a peroxidasa (Sigma), diluido 1:2000 en PBS tween 20 al 0.1%, que fue incubando durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción se reveló como se indicó anteriormente.

4.8.4. Detección del isotipo IgE

Tomando en cuenta que los niveles de IgE en la sangre son muy bajos, se realizó un ensayo de Western blot preliminar para determinar la sensibilidad del ensayo.

Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con SDS en condiciones reductoras de distintas concentraciones de un anticuerpo monoclonal IgE (SPE-7) producido en ratón, se transfirió a papel de nitrocelulosa, como anteriormente ha sido referido. Una vez transferido el anticuerpo, se bloqueó en leche al 10% diluido en amortiguador de fosfatos (PBS) al 1% y se incubó con el anticuerpo anti-IgE de ratón unido a biotina (Pharmingen) diluido 1:200, durante dos horas a temperatura ambiente, posteriormente se incubó con el conjugado estreptoavidina unido a peroxidasa (Amersham), diluido 1:500, durante dos horas a temperatura ambiente. Una vez que se determinaron las condiciones para detectar IgE, se analizaron los sueros de ratones infectados, transfiriendo las proteínas del extracto a papel de nitrocelulosa y procediendo a realizar la determinación del isotipo como fue referido anteriormente. El papel se cortó en tiras y se incubó con los sueros de ratones infectados, y posteriormente con el segundo

anticuerpo anti-IgE de ratón(Pharmingén) diluido 1:200 durante dos horas a temperatura ambiente, y por último se incubó con el conjugado estreptoavidina unido a peroxidasa (Amersham) diluido 1:500 durante dos horas a temperatura ambiente. Los lavados fueron realizados de la misma forma que refiere la técnica, usando el mismo sustrato para revelar y parando la reacción con agua destilada.

4.9. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados usando los programas Microsoft Excel para desviación estándar y Statgraphics para la prueba de T student comparando dos inoculos distintos en ratones inducida por cada aislado, análisis de varianza y comparación múltiple para comparar el comportamiento entre aislados del parásito.

5. RESULTADOS

5.1. Mortalidad producida por los diferentes aislados de *T. cruzi*

5.1.1. Cinética de mortalidad individual

Se analizó la mortalidad inducida por cuatro aislados de *T. cruzi* en ratones de la cepa Balb/cANN, usando dos diferentes inoculos. La Figura 3, muestra los resultados obtenidos en donde se puede observar que los aislados: Z10, Querétaro y H5 indujeron mortalidad en ratones infectados con los dos tipos de inóculo, no así el aislado Ninoa. Esta mortalidad se inició entre la segunda y tercera semana post-infección. En el grupo donde se usó un inóculo de 5×10^5 parásitos/ml, se observó que los ratones infectados con el aislado Ninoa sobrevivieron en su totalidad. Mientras que en los ratones infectados con el aislado Z10, hubo una sobrevivencia de cuatro individuos al día 24 post-infección, los cuales finalmente murieron el día 26. Por otro lado para el día 28 casi todos los ratones infectados con el aislado Querétaro habían muerto. Finalmente, los ratones infectados con el aislado H5 empezaron a morir al mismo tiempo que en los otros grupos, pero presentaron un número mayor de individuos sobrevivientes respecto a los ratones infectados con los aislados Z10 y Querétaro. En los grupos en que se usó un inóculo de 1×10^6 parásitos/ml, se volvió a observar que en los ratones infectados con el aislado Ninoa no hubo mortalidad. Los ratones infectados con el aislado Z10 empezaron a morir a partir del día 19 post-infección, observando que para el día 36 post-infección todos los ratones habían muerto. El aislado Querétaro por su parte, indujo la muerte de los ratones a partir del día 22, observándose finalmente que tres individuos lograron sobrevivir después del día 30 post-infección. Por último, los ratones infectados con el aislado H5, en forma diferente al grupo infectado con un inóculo de 5×10^5 parásitos/ml, empezaron a morir hasta el día 25 post-infección.

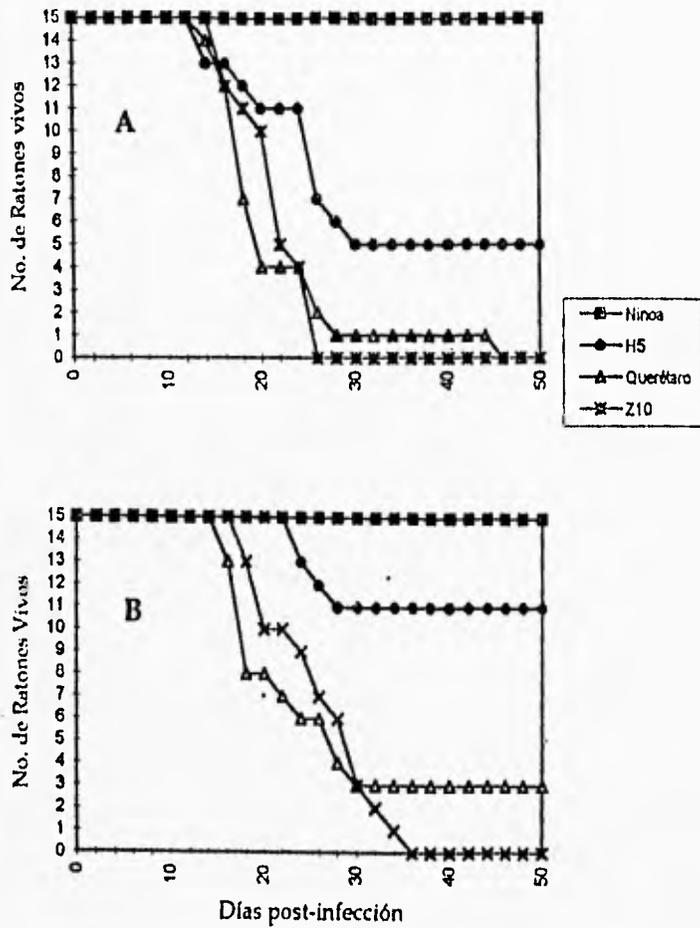


Figura 3. Cinética de mortalidad inducida por cuatro aislados diferentes de *T. cruzi* en ratones Balb/cANN evaluando un total de 15 individuos. Grupo A ratones inoculados con 5×10^5 parásitos/ml y grupo B ratones inoculados con 1×10^5 parásitos/ml.

5.1.2. Mortalidad acumulada

También se evaluó la mortalidad acumulada inducida por los cuatro aislados de *T. cruzi* en modelo murino durante un periodo de tiempo de 150 días de infección. En la Tabla II se observa el resultado promedio de tres experimentos. Pudo observarse que, en los ratones infectados con un inóculo de 5×10^5 parásitos/ml (grupo A) hubo diferencias en el porcentaje de muerte inducido por todos los aislados, en cambio Ninoa no indujo mortalidad. H5 indujo un 66% de muerte, lo cual fue diferente a lo observado en los ratones infectados con los aislados Querétaro y Z10 que presentaron 100% de mortalidad. En el grupo de ratones infectado con un inóculo de 1×10^5 parásitos/ml, (grupo B) el aislado Ninoa tampoco indujo mortalidad. Por otro lado, H5 mostró ser un aislado con un comportamiento más heterogéneo, donde la cantidad de inóculo influyó significativamente sobre el porcentaje de muerte, ya que con este inóculo la mortalidad decreció a un 27% ($p \geq 0.05$). En los ratones infectados con el aislado Querétaro la mortalidad se redujo al 80%, porcentaje que no fue significativa con respecto al porcentaje de mortalidad en el grupo infectado con 5×10^5 parásitos/ml ($p \leq 0.05$). Finalmente se observó que en los ratones infectados con el aislado Z10 se indujo, como en el grupo A, un 100% de mortalidad.

TABLA II
Porcentaje de mortalidad acumulada inducida por cuatro aislados de *T. cruzi*

Porcentaje de Mortalidad Acumulada		
Aislado	Grupo A	Grupo B
Ninoa	0	0
H5	66	27
Querétaro	100	80
Z10	100	100

Porcentaje de mortalidad inducido por cuatro aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi* en modelo murino con dos diferentes inóculos: Grupo A (5×10^5 parásitos/ml) y grupo B (1×10^5 parásitos/ml). Los valores representan el promedio de tres experimentos evaluados hasta el día 150 post-infección.

5.2. Análisis de la parasitemia producida por cuatro aislados de *T. cruzi*.

Para analizar la parasitemia producida por cada aislado de *T. cruzi* en el modelo murino, se realizaron de tres experimentos, evaluando en cada uno de ellos los parámetros de: promedio máximo de parásitos, día de máxima parasitemia, día de aparición y día de desaparición de parásitos en sangre, los resultados se presentan en la Tabla III. Para determinar si existían diferencias entre los valores evaluados de la parasitemia con los dos diferentes inoculos del mismo aislado, se realizó el análisis de T student, y se encontró que no hubo diferencias significativas dependientes del inoculo ($p \leq 0.05$). En cambio, al comparar los valores de parasitemia obtenidos con cada uno de los inoculos (5×10^5 ó 1×10^6 parásitos/ml), pero entre los diferentes aislados, el análisis estadístico de varianza indicó que hubo un comportamiento distinto en promedio máximo de parásitos, día de máxima parasitemia y día desaparición de parásitos circulantes ($p \geq 0.05$). Mientras que en el parámetro día de aparición de parásitos no hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Se encontró por análisis de correlación múltiple que el aislado Ninoa tuvo características en parasitemia totalmente distintas a la de los aislados H5, Querétaro y Z10 ($p \geq 0.05$). Con referencia a estos tres últimos aislados, pudo observarse que también ellos son diferentes entre sí ya que solo se parecen en el día de aparición de parásitos ($p \leq 0.05$), y difieren en promedio máximo de parásitos, día de máxima parasitemia y día de desaparición de parásitos, ($p \leq 0.05$).

TABLA III
Comportamiento en ratones Balb/c AAN de cuatro aislados mexicanos de *T. cruzi*

Aislado	Grupo	Promedio Máximo de Parásitos $\times 10^6$	Día de Máxima Parasitemia	Día de aparición de Parásitos	Día de desaparición de Parásitos
Ninoa	A	1.6 ± 0.1	20 ± 4.1	16 ± 1.8	43 ± 4.9
	B	1.3 ± 0.04	27 ± 5.2	19 ± 3.3	43 ± 4.9
H5	A	10.2 ± 2.9	24 ± 1.2	12 ± 2	44 ± 1.2
	B	6 ± 2.6	22 ± 6.6	12 ± 1.2	41 ± 2.1
Querétaro	A	5.0 ± 2.5	28 ± 4.3	9.0 ± 1.8	40 ± 5.9
	B	3.3 ± 1.1	20 ± 3.0	12 ± 0.5	38 ± 3.5
Z10	A	4.2 ± 1.6	20 ± 0.8	13 ± 0.9	24 ± 3.2
	B	6.2 ± 0.9	24 ± 0.9	13 ± 0.8	33 ± 5.4

La tabla muestra el inoculo usado en cada grupo experimental así como el resultado de cuatro parámetros de parasitemia. Los datos son el promedio de tres experimentos \pm su desviación estándar. Grupo A inoculo de 5×10^5 parásitos/ml y Grupo B inoculo de 1×10^5 parásitos/ml. Los datos fueron analizados con tres pruebas estadísticas. Mediante un análisis de T student no se encontraron diferencias entre los dos inoculos usados para cada aislado. Mientras que con los análisis de varianza y correlación múltiple se observaron características de parasitemia diferentes entre los cuatro aislados que destacó al aislado Ninoa con un comportamiento distinto a los otros tres aislados analizados.

5.3. Parasitemia y producción de anticuerpos

Para evaluar el desarrollo de la parasitemia y su correlación con la producción de anticuerpos anti-*T. cruzi* en diferentes días después de la infección, se analizaron un total de quince ratones por grupo. Analizando carga parasitaria y producción de anticuerpos totales anti-*T. cruzi* por medio del ensayo de ELISA.

El comportamiento de los ratones infectados con el aislado Ninoa se muestra en la figura 4. Se detectaron parásitos en circulación a partir de la segunda semana después del inoculo, llegando a su máximo en la cuarta semana post-infección, decreciendo progresivamente hasta ser indetectable a la séptima semana donde se consideró que los individuos entraron a la fase crónica

de la infección; el número máximo de parásitos fue con 1.6×10^6 parásitos/ml en promedio con un inóculo de 5×10^5 parásitos/ml en el día 20 y 1.3×10^6 parásitos/ml en promedio con un inóculo de 1×10^5 parásitos/ml en el día 28 post-infección. Se observó que los niveles de anticuerpos anti-*T.cruzi*, en el grupo infectado con 5×10^5 parásitos/ml, comienzan a ser altos a partir del día 28 post-infección, tendiendo a aumentar a medida que los días de infección avanzan y observando que la parasitemia comienza a descender. Un comportamiento similar es observado en el grupo infectado con un inóculo de 1×10^5 parásitos/ml, en el cual a partir del día 32 y hasta llegar al día 50 post-infección, se detectó un aumento en el nivel de anticuerpos y al mismo tiempo una disminución de la parasitemia. En general se observó que Ninoa fue el aislado que indujo el nivel más alto de anticuerpos.

En el aislado H5 (Figura 5), se detectaron parásitos en circulación en la segunda semana después de la infección, y comenzaron a desaparecer a partir de la sexta semana post-infección. Este aislado produjo su máximo pico de parasitemia al día 24 post-infección en el grupo infectado con un inóculo de 5×10^5 parásitos/ml, con un promedio de 10.2×10^6 parásitos/ml. Mientras que el grupo infectado con un inóculo de 1×10^5 parásitos/ml presentó al día 22 un promedio de 6×10^6 parásitos/ml. Es interesante hacer notar que este aislado alcanzó los niveles de parasitemia más altos con respecto a los otros aislados estudiados en el presente trabajo. En ambos grupos infectados se observó que la producción de anticuerpos anti-*T.cruzi* comienza a detectarse en niveles altos a partir del día 28 post-infección, al mismo tiempo que la parasitemia comienza a descender.

El comportamiento observado en ratones infectados con el aislado Querétaro se muestra en la Figura 6. El grupo infectado con un inóculo de 5×10^5 parásitos/ml sobrevivió hasta el día 40 post-infección con un pico de parasitemia promedio de 4.2×10^6 parásitos/ml en el día 22. Respecto al grupo infectado con un inóculo de 1×10^5 parásitos/ml el pico máximo de parasitemia

se observó el día 20 con un promedio de 3.3×10^6 parásitos/ml. En los ratones sobrevivientes la parasitemia comienza a ser indetectable al día 38 post-infección. La presencia de anticuerpos es importante solamente hasta el día 28 post-infección en el grupo infectado con un inoculo mayor, mientras que en el grupo infectado con un inoculo menor pudo observarse que el nivel de anticuerpos aumenta a medida que los días post-infección avanzan.

En la Figura 7, se observa el comportamiento de ratones infectados con el aislado Z10, en donde se detectaron parásitos en circulación a partir de la segunda semana post-infección en ambos grupos experimentales, pudiendo evaluarse el desarrollo de la parasitemia y producción de anticuerpos durante un periodo de tres a cuatro semanas post-infección, considerando esta etapa como la fase aguda. Con un inoculo de 5×10^5 parásitos/ml, se alcanzó un pico de parasitemia promedio de 4.2×10^6 parásitos/ml al día 20. Mientras que el grupo inoculado con 1×10^5 parásitos/ml, alcanzó su pico de parasitemia al día 24 con un promedio de 6.5×10^6 parásitos/ml. Respecto a la producción de anticuerpos anti-*T.cruzi* evaluados en los mismos días post-infección, se observó que el nivel de anticuerpos producido en ambos grupos experimentales fue muy bajo y nunca logró incrementarse debido a la muerte de los ratones infectados.

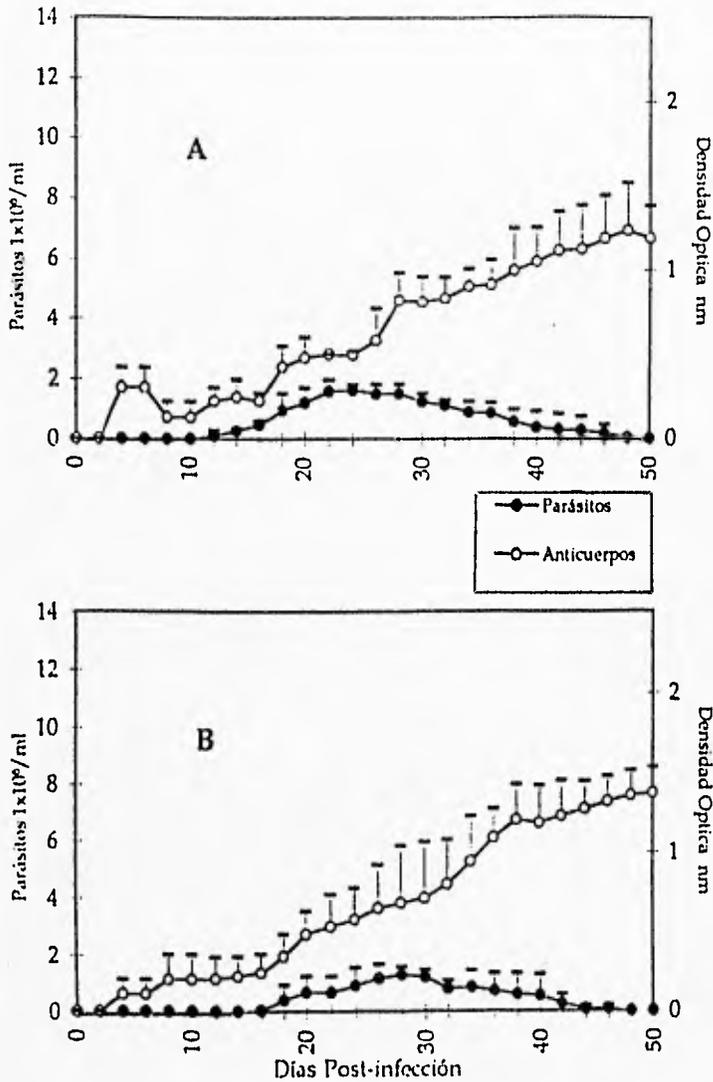


Figura 4. Curvas de parasitemia y producción de anticuerpos anti el aislado Ninoa en modelo murino. Dos grupos experimentales fueron infectados con: (A) 5×10^5 parásitos/ml y (B) 1×10^5 parásitos/ml. Se evaluó el desarrollo de la parasitemia con el microscopio óptico (Objetivo 40x) en una dilución 1:100, y la producción de anticuerpos totales mediante un ensayo de ELISA usando el conjugado anti-ratón IgG unido a peroxidasa (Zymed). Cada punto representa el valor promedio de 15 individuos \pm su desviación estándar (DE) evaluados por cada día.

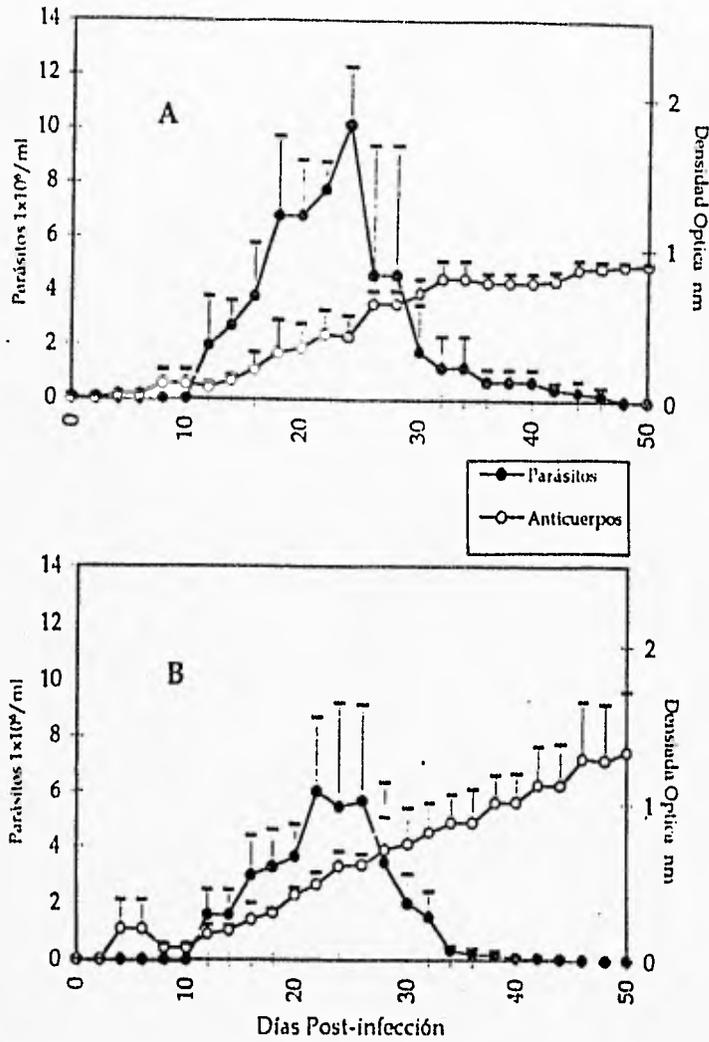


Figura 5. Curvas de parasitemia y producción de anticuerpos anti el aislado H5 en modelo murino. Dos grupos experimentales fueron infectados con: (A) 5×10^5 parásitos/ml y (B) 1×10^5 parásitos/ml. Se evaluó el desarrollo de la parasitemia con el microscopio óptico (Objetivo 40x) en una dilución 1:100, y la producción de anticuerpos totales mediante un ensayo de ELISA usando el conjugado anti-ratón IgG unido a peroxidasa (Zymed). Cada punto representa el valor promedio de 15 individuos \pm su desviación estándar (DE) evaluados por cada día.

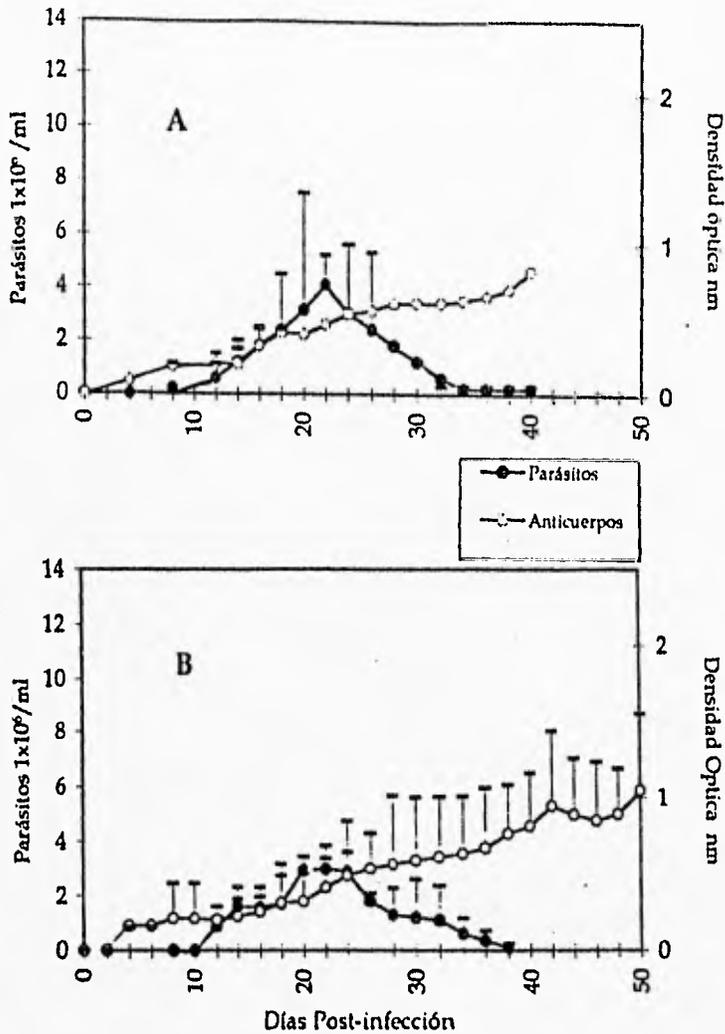


Figura 6. Curvas de parasitemia y producción de anticuerpos anti el aislado Querétaro en modelo murino. Dos grupos experimentales fueron infectados con: (A) 5×10^5 parásitos/ml y (B) 1×10^6 parásitos/ml. Se evaluó el desarrollo de la parasitemia con el microscopio óptico (Objetivo 40x) en una dilución 1:100, y la producción de anticuerpos totales mediante un ensayo de ELISA usando el conjugado anti-ratón IgG unido a peroxidasa (Zymed). Cada punto representa el valor promedio de 15 individuos \pm su desviación estándar (DE) evaluados por cada día.

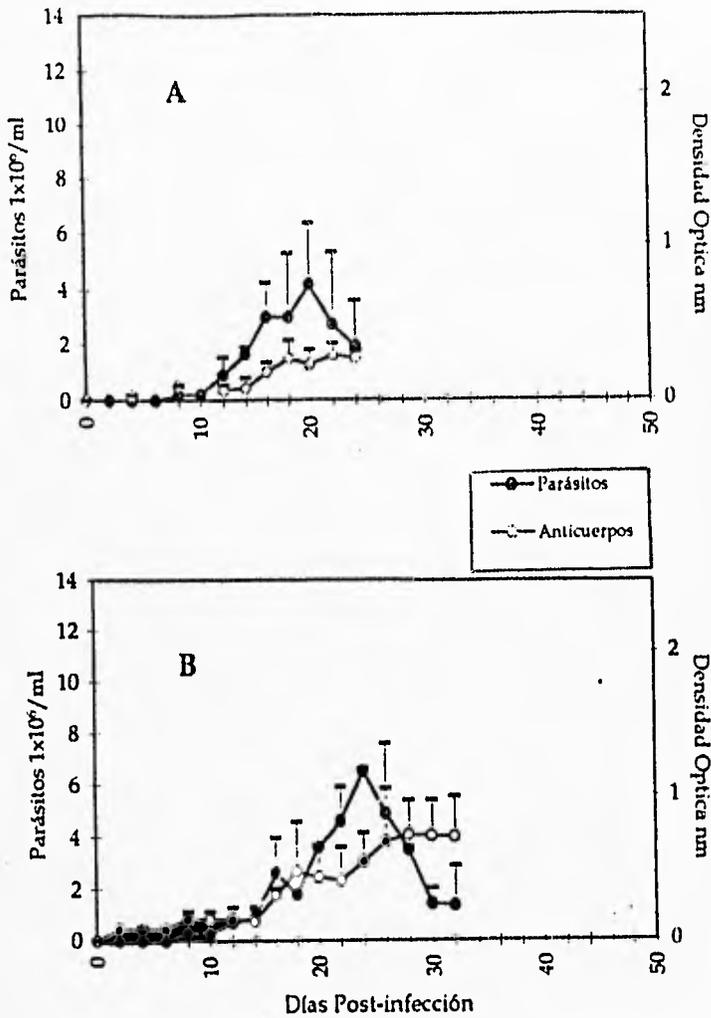


Figura 7. Curvas de parasitemia y producción de anticuerpos anti el aislado Z10 en modelo murino. Dos grupos experimentales fueron infectados con: (A) 5×10^5 parásitos/ml y (B) 1×10^5 parásitos/ml. Se evaluó el desarrollo de la parasitemia con el microscopio óptico (Objetivo 40x) en una dilución 1:100, y la producción de anticuerpos totales mediante un ensayo de ELISA usando el conjugado anti-ratón IgG unido a peroxidasa (Zymed). Cada punto representa el valor promedio de 15 individuos \pm su desviación estándar (DE) evaluados por cada día.

5.4. Identificación de proteínas antigénicas

5.4.1. Extractos totales de *T. cruzi*

Con el fin de analizar los componentes proteicos de los extractos totales correspondiente a cada aislado de *T. cruzi*, se realizó una separación mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida-bisacrilamida al 12% en condiciones reductoras (SDS-PAGE), agregando 10µg de cada extracto, preparados en las mismas condiciones y al mismo tiempo. Se observó un mismo patrón de distribución en las proteínas que no presentan diferencias entre cada uno de los extractos analizados (Figura 8).

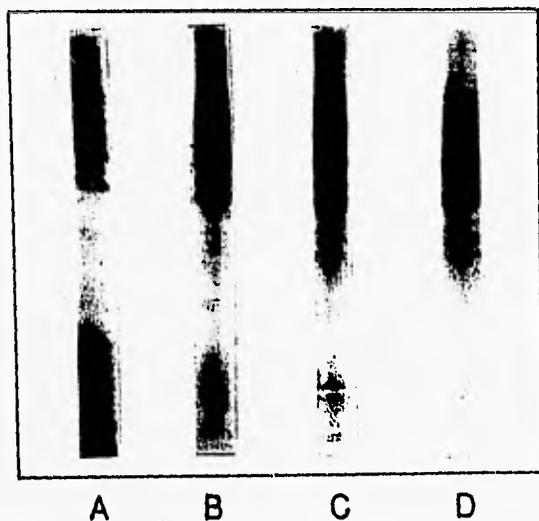


Figura 8. Análisis de proteínas de extractos totales de aislados de *T. cruzi* en SDS-PAGE. Comparación entre extractos totales (10µg) preparados con inhibidores de proteasas. Los extractos fueron separados en geles de poliacrilamida al 12% con SDS y mercaptoetanol, teñidos con azul de Coomassie. A) Nínoa, B) Z10, C) Querétara y D) H5.

5.4.2. Caracterización de proteínas antigénicas

Para identificar las diferentes proteínas antigénicas reconocidas por los ratones infectados, se utilizaron extractos crudos de los aislados: Z10, Ninoa, Querétaro y H5 de *T. cruzi*, con el ensayo de Western blot con los sueros de ratones infectados.

El reconocimiento de los antígenos de *T. cruzi* por los sueros de ratones infectados con el aislado Ninoa se muestra en la Figura 9. Se observó que en los sueros de ratones infectados con los dos inoculos hubo anticuerpos dirigidos contra varias proteínas antigénicas. Se destacó el reconocimiento hacia dos proteínas antigénicas: una de 45-50 kilodaltones partir del día 20 en ambos grupos y otra de 70 kilodaltones a partir del día 20 post-infección en el grupo A y en el día 35 en el grupo B. Hubo también un reconocimiento hacia una proteína antigénica de 133 kilodaltones a partir del día 25 post-infección en el grupo A y en el día 50 post-infección en el grupo B. Otra banda de 25-30 kilodaltones se detectó al día 70 post-infección en el grupo A con una intensidad muy fuerte en ese día y que comenzó a disminuir en los días subsiguientes, éste antígeno también fue reconocido en el grupo B a partir del día 50 pero con una intensidad menor pudiendo observar que este reconocimiento persiste hasta el día 150 de infección.

En el grupo de ratones infectados con el aislado H5 se reconocen varias proteínas antigénicas a partir de día 20 después de la infección en el grupo A y al día 30 en el grupo B (Figura 10). Se observó un reconocimiento hacia proteínas antigénicas de 30, 35, 45-50, 65, 70 y 133 en el grupo infectado con un inoculo de 5×10^5 parásitos/ml. A partir del día 50 post-infección la intensidad de las bandas es mayor en los antígenos de 45-50, 65, 70 y 130. Mientras que en el grupo experimental infectado con un inoculo de 1×10^5 parásitos/ml, hubo un reconocimiento hacia antígenos de: 30, 45-50, 70 y 130 kilodaltones. Pudo notarse que entre ambos grupos experimentales se encontraron diferencias, que consistieron en el número de antígenos

reconocidos, siendo este reconocimiento dirigido a un número mayor de bandas en el grupo A, y observando que aunque en ambos grupos existe un reconocimiento hacia los antígenos de 45-50 y 70 kilodaltones, en el grupo infectado con 5×10^5 parásitos/ml la intensidad de la banda de reconocimiento al antígeno de 45-50 kilodaltones es mayor, mientras que en el grupo infectado con 1×10^5 parásitos/ml, la banda de reconocimiento al antígeno de 70 kilodaltones fue la más intensa.

Los resultados en ratones infectados con el aislado Querétaro permitieron hacer un análisis durante 40 días post-infección en el grupo experimental inoculado con 5×10^5 parásitos/ml, mientras que el grupo inoculado con 1×10^5 parásitos/ml se evaluó hasta el día 150 después de la infección considerando a este último periodo como crónico (figura 11). En ambos casos, hubo un reconocimiento dirigido hacia proteínas de: 35, 40 y 70 kilodaltones a partir del día 25 post-infección en el grupo A y en el día 35 en el grupo B. Se observó que en el grupo de ratones infectados con 1×10^5 parásitos/ml, se detectó una proteína antigénica de 110 kilodaltones que aparece en el día 50 y que es más intensa en el día 150.

Los resultados obtenidos en ratones infectados con el aislado Z10 se muestra en la Figura 12. Pudo observarse que hubo un reconocimiento hacia una proteína antigénica de aproximadamente 70 kilodaltones en los dos grupos, más otra de 35 kilodaltones en el grupo de ratones infectados con 1×10^5 parásitos/ml. En general se observó una respuesta inmune humoral débil en ambos grupos experimentales que comenzó con claridad a partir del día 22 post-infección en el grupo A, mientras que en el grupo B, la respuesta inmune humoral comienza a ser detectada a partir del día 28. Cabe mencionar que este aislado indujo la muerte de todos los ratones infectados.

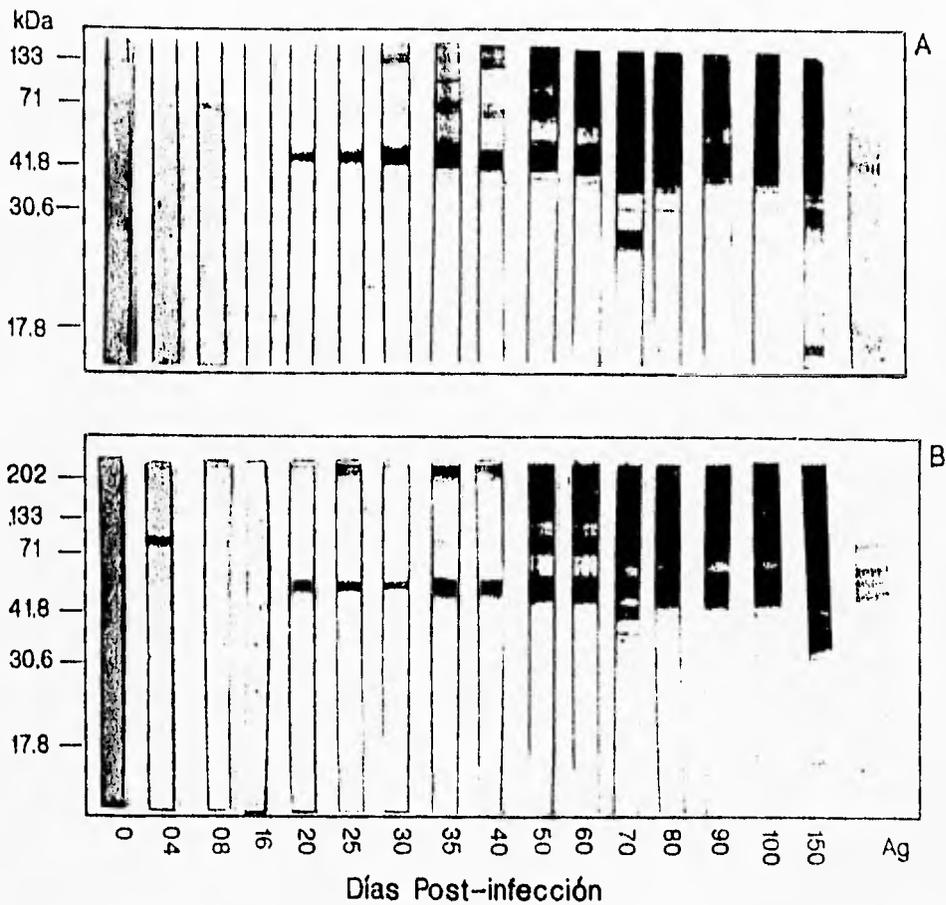


Figura 9. Caracterización de proteínas antigénicas reconocidas por sueros de ratones infectados con el aislado Ninoa por ensayo de Western blot. las proteínas de este aislado fueron separadas por electroforesis en gels de poliacrilamida al 12% con SDS y mercaptoetanol para posteriormente ser transferidas a papel de nitrocelulosa, e incubarse con sueros de ratones infectados a diferentes días post-infección (diluídos 1:200). Posteriormente fueron incubados con un segundo anticuerpo anti- IgG de ratón (cadena pesada y ligera) unido a peroxidasa (diluído 1:2000) para finalmente revelar agregando 3-3 diaminobenzidina como sustrato. Grupo A inóculo de 5×10^5 parásitos/ml y grupo B inóculo de 1×10^5 parásitos/ml.

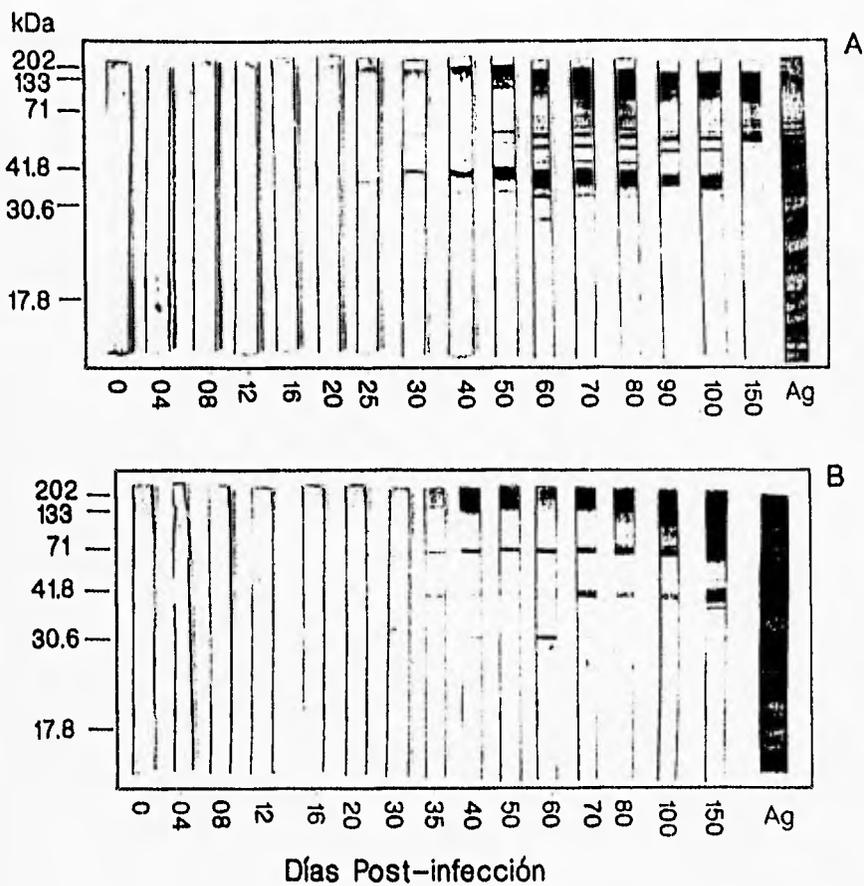


Figura 10. Caracterización de proteínas antigénicas reconocidas por sueros de ratones infectados con el aislado H5 por ensayo de Western blot. Las proteínas de éste aislado fueron tratadas como se indicó en la Figura 9. Grupo A inóculo de 5×10^5 parásitos/ml y grupo B 1×10^5 parásitos/ml.

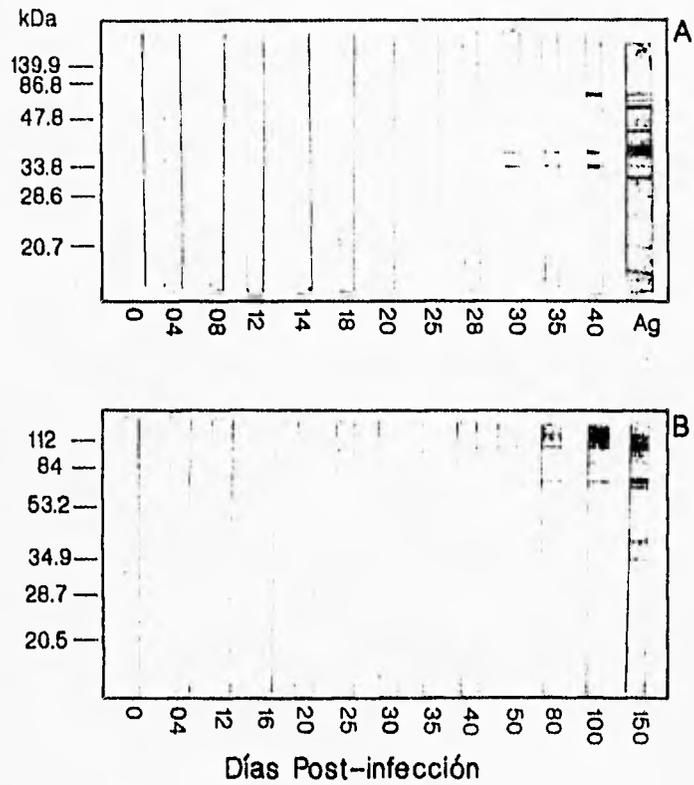


Figura 11. Caracterización de proteínas antigénicas reconocidas por sueros de ratones infectados con el aislado Querétaro por ensayo de Western blot. Las proteínas de este aislado fueron tratadas como se indicó en la Figura 9. Grupo A inoculo de 5×10^6 parásitos/ml y grupo B inoculo de 1×10^6 parásitos/ml.

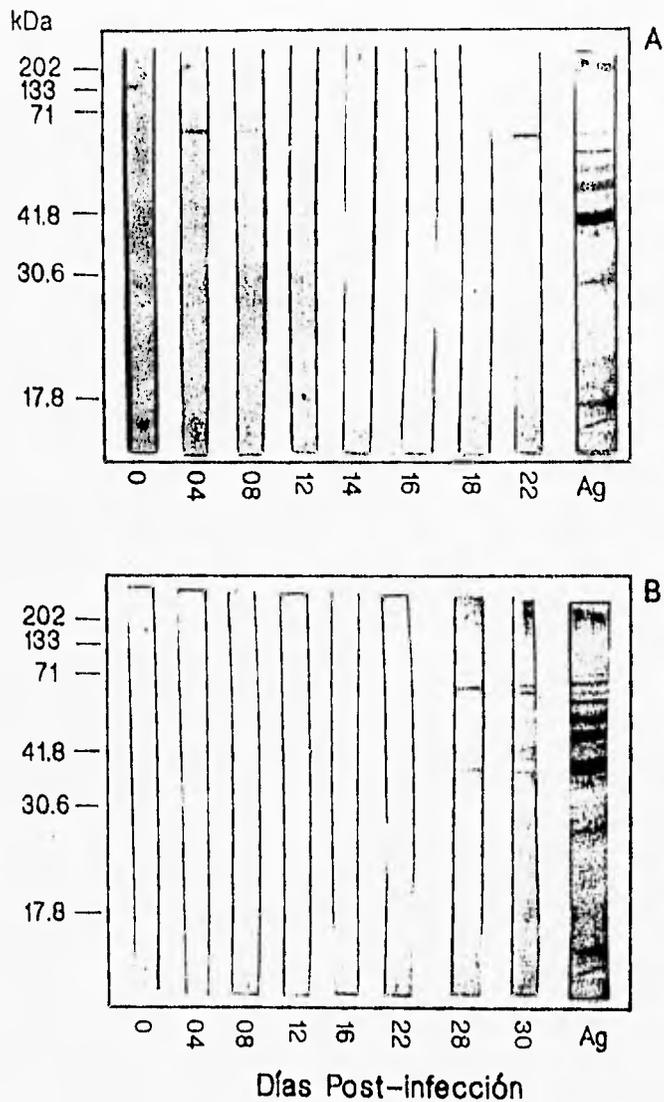


Figura 12. Caracterización de proteínas antigénicas reconocidas por sueros de ratones infectados con el aislado Z10 por ensayo de Western blot. Las proteínas de éste aislado fueron tratadas como se describió en la Figura 9. Grupo A inoculo de 5×10^5 parásitos/ml y grupo B inoculo 1×10^5 parásitos/ml.

5.5. Determinación de isotipos anti-*T. cruzi*.

Utilizando sueros de ratones infectados con un inoculo inicial de 1×10^6 parásitos/ml con cada uno de los aislados, se procedió a realizar un análisis mediante la técnica de Western blot para determinar la clase de inmunoglobulina a la que pertenecen los anticuerpos detectados en éstos sueros.

5.5.1. Isotipos producidos contra el aislado Ninoa

Los sueros de ratones infectados con este aislado de *T. cruzi* se analizaron por un periodo de 150 días después de la infección, pudiéndose detectar varias clases y subclases de inmunoglobulinas con excepción de IgE. La fase aguda estuvo caracterizada por la producción del isotipo IgM, mientras que a partir de la quinta semana después de la infección comenzaron la producción de isotipos: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA (Figura 13 y Tabla IV). Conforme avanza la infección, pudo observarse un aumento en la producción de todas las clases de inmunoglobulinas encontrando que todas están dirigidas hacia dos proteínas antigénicas principales: una de 45-50 kilodaltones y otra de 70 kilodaltones, no obstante en el caso de los isotipos: IgG1 e IgG2a, también existió un reconocimiento contra una proteína antigénica de más de 100 kilodaltones a partir de la octava semana post-infección, mientras que el isotipo IgM estuvo dirigido contra un antígeno de 30 kilodaltones a partir del día 25 post-infección.

5.5.2. Isotipos producidos contra el aislado H5.

En los sueros de ratones infectados con este aislado se detectaron inmunoglobulinas correspondientes a todos los isotipos analizados con excepción de IgE (Tabla V). Se pudo observar la presencia de los isotipos, IgG1, IgG2a, , IgG2b, IgG3, IgM e IgA a partir de la cuarta y quinta semana después de la infección. (Figura 14). Los isotipos IgG2b, IgG3, IgM e IgA estuvieron dirigidos solamente contra la proteína antigénica de 70 kilodaltones. En tanto que se observó que

los isotipos IgG1 e IgG2a están dirigidos contra tres proteínas antigénicas que corresponden a los pesos de 70, 45-50 y 40 kilodaltones (Tabla V). Los resultados correspondientes al isotipo clase IgA, muestran que los niveles de éste isótopo fueron importantes a partir de la novena semana post-infección, siendo entre los días 70 y 80 post-infección cuando este reconocimiento logró detectarse con mayor intensidad (Figura 14).

5.5.3. Isotipos producidos contra el aislado Querétaro.

Los resultados obtenidos en sueros de ratones infectados con el aislado Querétaro, muestran la detección de los isotipos: IgG2a e IgM, durante un periodo de tiempo que abarcó del día 25 hasta el día 150 post-infección en el caso de IgM y del día 40 al 150 en el caso de IgG2a. Mientras que el isotipo IgG1 comenzó a ser detectado solamente a partir del día 90 post-infección (Figura 15 y Tabla VI). Hubo un mayor reconocimiento por IgM entre los días 35 al 50 post-infección, persistiendo hasta el día 150 de infección. La inmunoglobulina IgG2a estuvo dirigida contra una proteína antigénica de 70 kilodaltones, en el caso del isotipo IgM el reconocimiento fue contra dos proteínas antigénicas, una de 40 kilodaltones y otra de 35 kilodaltones (Figura 15).

5.5.4. Isotipos producidos contra el aislado Z10.

Durante el periodo agudo esto es, las dos primeras semanas después de la infección y durante el tiempo de sobrevivencia de los individuos infectados con el aislado Z10, los niveles de inmunoglobulinas detectados en los sueros fueron muy bajos, produciéndose isotipos de la clase IgG1, IgG3 e IgM (Tabla VII). Las dos primeras clases de inmunoglobulinas estuvieron dirigidas contra una proteína antigénica de 45-50 kilodaltones (Figura 16). En el caso del isotipo IgM, su producción fue muy escasa y estuvo dirigida hacia proteínas antigénicas de, 45-50, 35 y 30 kilodaltones con niveles que pudieron ser detectados a partir del día 25 post-infección.

TABLA IV
Isotipos en sueros de ratones infectados con el aislado Ninoa evaluados por Western blot

Ig	Antígenos reconocidos (kDa)															
								70	70	70	70	100	100	100	100	100
IgG1							45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50
IgG2a						45-50	70	70	70	70	100	100	100	100	100	100
IgG2b							45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	100	100
IgG3								70	70	70	70	70	70	70	70	70
IgM					70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
IgA								45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50
	0	04	08	16	20	25	30	35	40	50	60	70	80	90	100	150
DIAS POST-INFECCION																

La tabla muestra los isotipos de inmunoglobulina presente en los sueros y los pesos moleculares de los antígenos contra los que están dirigidos éstos en diferentes días post-infección.

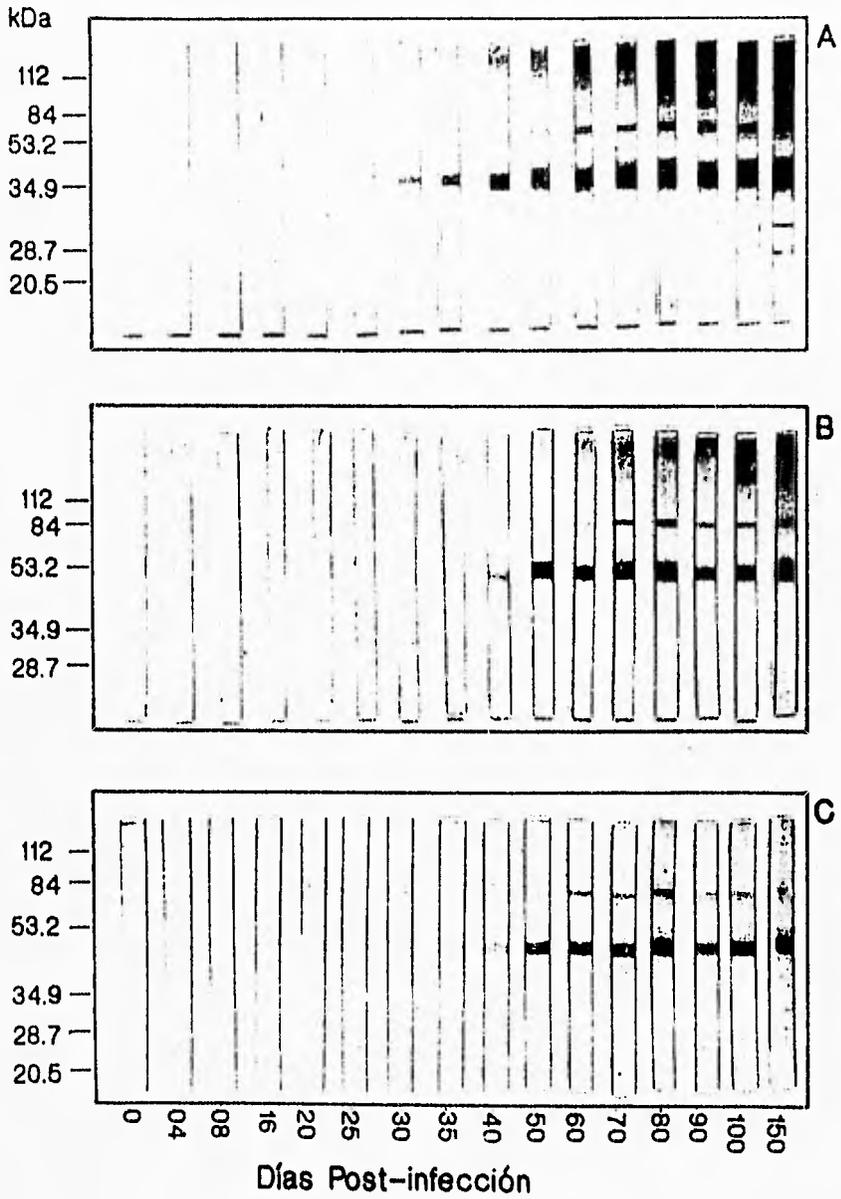


Figura 13. Análisis de isotipos en sueros de ratones infectados con el aislado Ninoa por Western blot. Proteínas del aislado Ninoa fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con SDS y mercaptoetanol para posteriormente ser transferidas a papel de nitrocelulosa. Las proteínas transferidas fueron incubadas con sueros de ratones infectados a diferentes días post-infección diluido 1:500 para después ser incubados con el anticuerpo anti-ratón IgG2a, IgG2b e IgA específico a cadena pesada diluidos 1:2000 e incubar con un tercer anticuerpo anti-cabra IgG (toda la molécula) unido a peroxidasa diluido 1:2000 para finalmente revelar agregando 3-3 diamínobenzidina como sustrato.
A) IgG2a, B) IgG2b y C) IgA.

TABLA VI
Isotipos en sueros de ratones infectados con el aislado H5 analizados por Western blot

IgG1									70	70	70	70	70	70	70	70
											45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50
											40	40	40	40	40	40
IgG2a								70	70	70	70	70	70	70	70	70
								45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50
								40	40	40	40	40	40	40	40	40
IgG2b									70	70	70	70	70	70	70	70
																45-50
																40
IgG3								70	70	70	70	70	70	70	70	70
IgM									70	70	70	70	70	70	70	70
IgA									70	70	70	70	70	70	70	70
	0	04	08	16	20	25	30	35	40	50	60	70	80	90	100	150
DIAS POST-INFECCION																

La tabla muestra los isotipos de inmunoglobulina presente en los sueros y los pesos moleculares de los antígenos contra los que están dirigidos éstos en diferentes días post-infección.

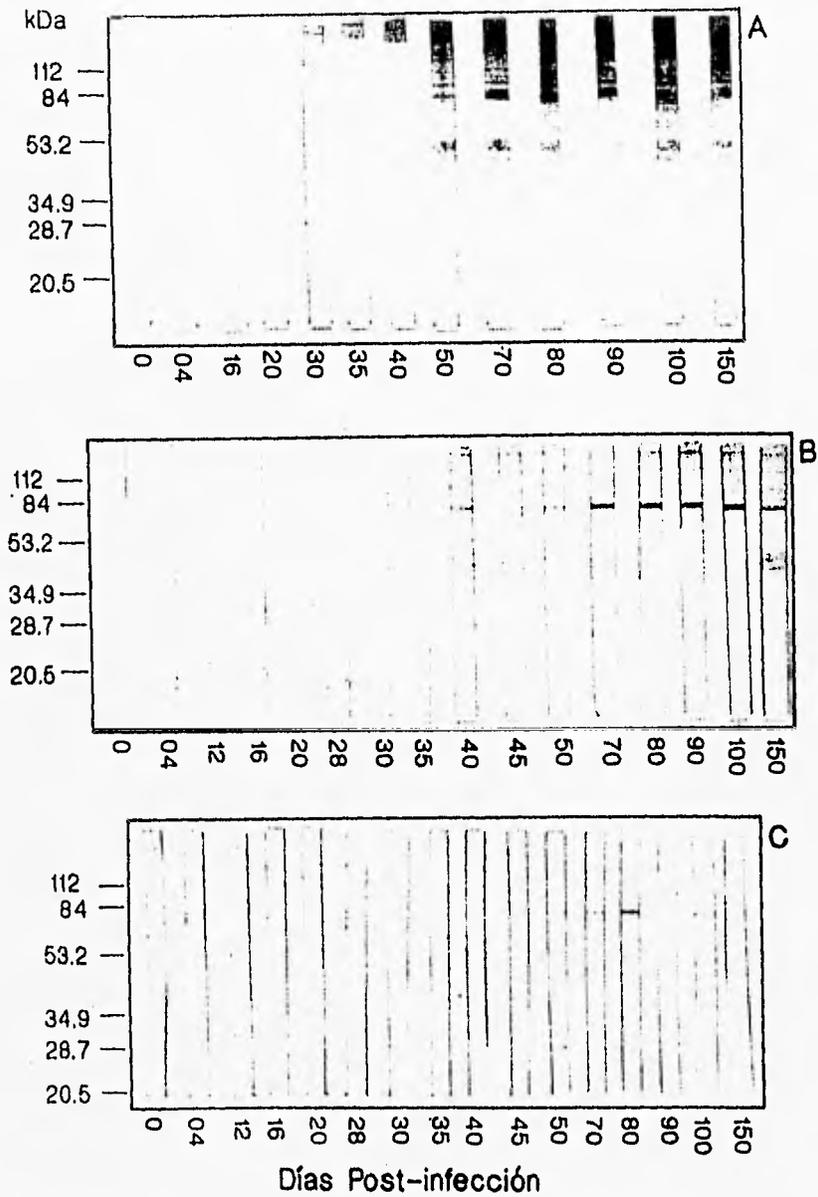


Figura 14. Análisis de isotipos en sueros de ratones infectados con el aislado H5 por Western blot. Proteínas del aislado H5 fueron separadas por electroforesis en gels de poliacrilamida al 12% con SDS y mercaptoetanol para posteriormente ser tratadas como se indica en la Figura 13. A) IgG2a, B) IgG2b y C) IgA.

TABLA VI
Isotipos en sueros de ratones infectados con el aislado Querétaro evaluados por Western blot

Ig	Antígenos reconocidos (kDa)															
	IgG1														70	70
IgG2a								70	70	70	70	70	70	70	70	
IgM					40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
	0	04	08	16	20	25	30	35	40	50	60	70	80	90	100	150
DIAS POST-INFECCION																

La tabla muestra los isotipos de inmunoglobulina presente en los sueros y los pesos moleculares de los antígenos principales contra los que están dirigidos éstos correspondiente a cada día post-infección

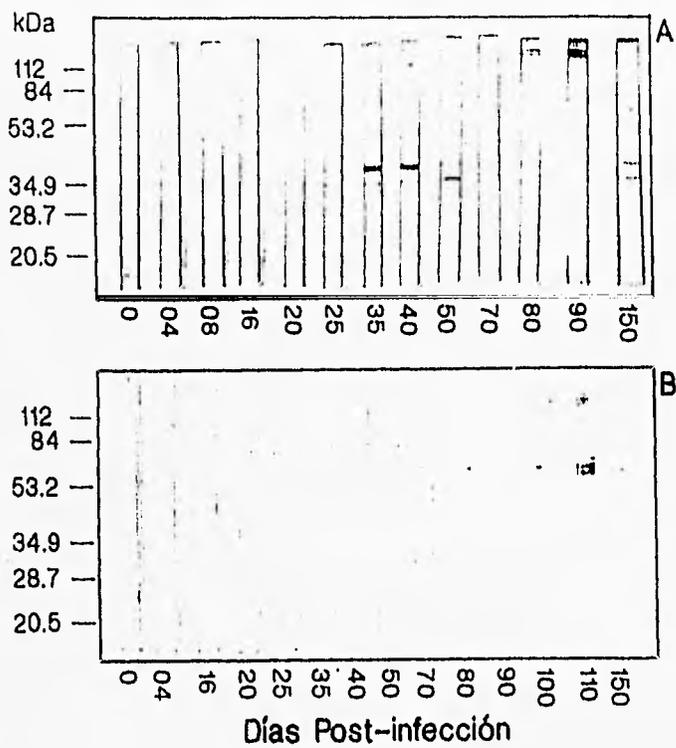


Figura 15. Análisis de isotipos en sueros de ratones infectados con el aislado Querétaro por Western blot. Proteínas del aislado Querétaro fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con SDS y mercaptoetanol para posteriormente ser tratadas como se indica en Figura 13. A) IgM B) IgG2a.

TABLA VIII
Isotipos en sueros de ratones infectados con el aislado Z10 analizados por Western blot

Ig	Antígenos reconocidos (kDa)						
	IgG1		40	40	40	40	40
IgG3				40	40	40	40
IgM						40 35 30	40 35 30
	0	04	08	16	20	25	30
DIAS POST-INFECCION							

La tabla muestra los isotipos de inmunoglobulina presente en los sueros y los pesos moleculares de los antígenos principales contra los que están dirigidos éstos correspondiente a cada día post-infección.

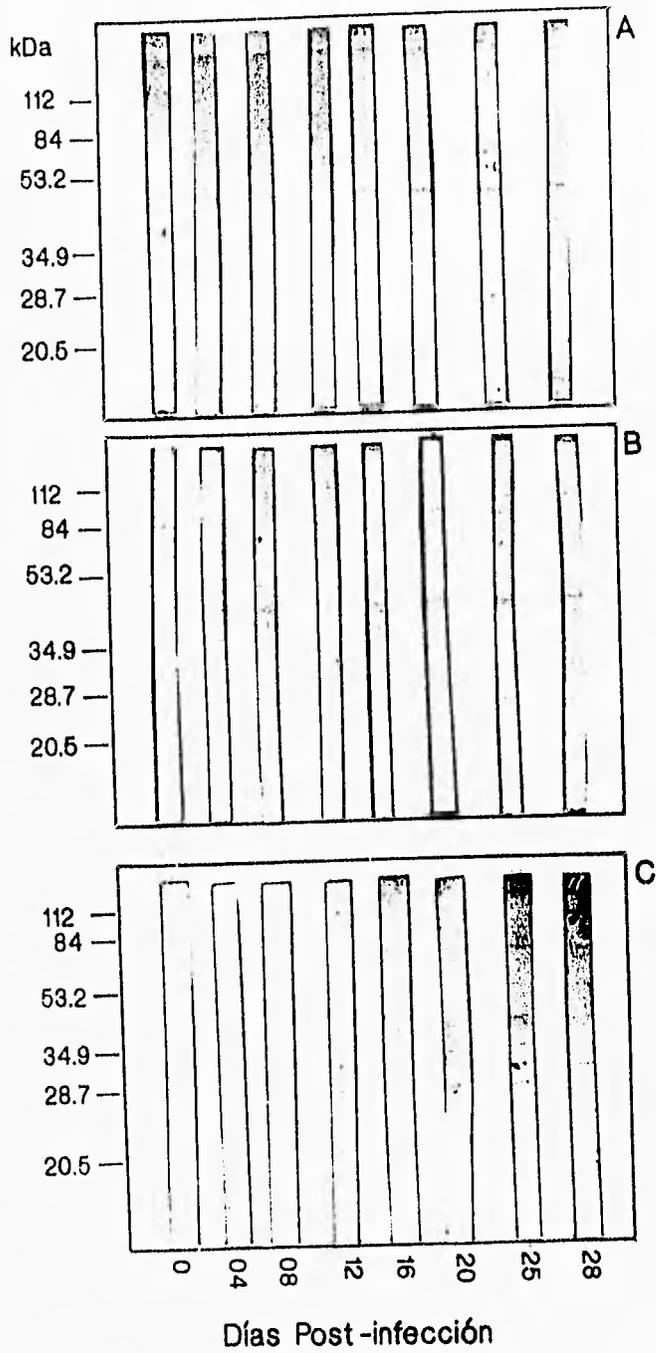


Figura 16. Análisis de isotipos en sueros de ratones infectados con el aislado Z10 por Western blot. Proteínas del aislado Z10 fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con SDS y mercaptoetanol para posteriormente ser tratadas como se indica en la Figura 13. A) IgG1, B) IgG3 y C) IgM.

5.6. Determinación del isotipo IgE

No se detectó IgE en ninguno de los sueros analizados a pesar de que nuestro conjugado anti-IgE podía detectar hasta 0.3 μg de este tipo de inmunoglobulina (Figura 17). Observando que los aislados de *T. cruzi* usados en el presente trabajo no inducen la formación de este isotipo o bien que los niveles producidos son menores a esta concentración.

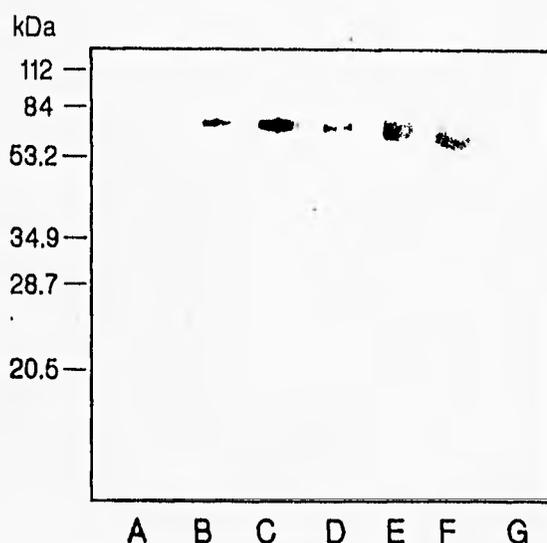


Figura 17. Detección de IgE por Western blot. Se realizó un gel de acrilamida-bisacrilamida en condiciones reductoras al 12% con distintas concentraciones de anticuerpo monoclonal de isotipo IgE producido en ratón: A) 0.3 μg , B) 0.6 μg , C) 1.25 μg , D) 2.5 μg , E) 5 μg , F) 10 μg y G) 20 μg transfiriéndolo a papel de nitrocelulosa. Una vez transferido, el papel fue incubado con un segundo anticuerpo anti-ratón IgE unido a biotina (Pharmingen) diluido 1:200 para posteriormente incubarse con el conjugado estreptoavidina unido a peroxidasa diluido 1:500, y usando 3-3 diaminobenzidina como sustrato.

6. DISCUSION

El modelo murino de infección por *T. cruzi* ha permitido obtener información que puede considerarse importante en la enfermedad provocada en humanos (Andrade y col., 1985; Mortati y col., 1992), no solo porque permite analizar las mismas fases de infección en periodos de tiempo más cortos, sino también porque en este tipo de modelo experimental puede inducirse una respuesta inmune, tanto celular como humoral que coincide también con lo encontrado en humanos (Mortati y col., 1992). En este estudio se analizaron cuatro aislados mexicanos de *T. cruzi* utilizando el modelo murino de infección. De estos aislados se tenían antecedentes de patrones isoenzimáticos y de ADN que revelaron características filogenéticas comunes. Estos estudios representan una base importante para poder asegurar que los resultados obtenidos en nuestro trabajo corresponden a *T. cruzi* y no a otro protozoo de la familia Trypanosomatidae (Ramos, 1995). Por otra parte una caracterización biológica "in vitro" de los aislados: Z10, H5 y Ninoa realizada por López en 1994, reveló patrones heterogéneos en el comportamiento al evaluar metaciclogenesis, infección y virulencia en líneas celulares. Mientras que el aislado Querétaro de acuerdo a análisis previos (Bautista y Parra, comunicación personal), posee la característica de inducir una mortalidad elevada en modelo murino.

Respecto a la cepa de ratón utilizada, estudios realizados por Trischman y cols., (1978 y 1982), han reportado la importancia del fondo genético de diversas cepas de ratón en la susceptibilidad o resistencia a la infección por *T. cruzi*. Según estos autores la cepa de ratón Balb/cANN debe considerarse como una cepa de susceptibilidad intermedia, y debido a este dato, se decidió escoger esta cepa para trabajar con un modelo que no se aproximara a

los extremos de susceptibilidad o resistencia, fenómenos que no permitirían montar y analizar el modelo en cepas biológicamente heterogéneas.

La cantidad de inóculo usada en la infección experimental, ha sido un motivo de controversia, por un lado se ha sugerido que la cantidad a usarse debe ser semejante a lo ocurrido en forma natural sugiriendo usar una cantidad de parásitos representativa, sin embargo como hasta el momento se desconoce la cantidad necesaria de parásitos que debe ser suficiente y capaz de causar una infección en humanos, se considera que el número de parásitos capaz de provocar la infección no puede establecerse con certeza, pero se sugiere usar cantidades de parásitos que permitan establecer el modelo de infección (Carlier y col., 1987). Tomando en cuenta lo anterior se usaron dos inóculos distintos que corresponden a cantidades ya reportadas (Cruz, 1994; De Gaspari y col., 1994; Wallace y col., 1995).

Los resultados obtenidos al evaluar parasitemia, mortalidad, producción de anticuerpos anti-*T. cruzi* e identificación de proteínas antigénicas del parásito en un modelo "in vivo" de infección comparando dos diferentes inóculos del mismo aislado, mostraron que en los ratones infectados con los aislados Ninoa, Querétaro y Z10 no hubo diferencias influenciadas por la cantidad de inóculo, por el contrario, en los ratones infectados con el aislado H5 sí se observaron diferencias en el número de ratones muertos y producción de anticuerpos contra proteínas antigénicas diferentes. Por un lado, al usar un inóculo de 5×10^5 parásitos/ml, el aislado H5 indujo niveles más altos de mortalidad la cuál descendió considerablemente al usar un inóculo menor (1×10^5 parásitos/ml). También un comportamiento diferente se observó en el reconocimiento hacia proteínas antigénicas, observando que en el grupo infectado con una cantidad de 5×10^5 parásitos/ml hubo un reconocimiento hacia un número mayor de antígenos que en los ratones infectados con 1×10^5 parásitos/ml.

También se analizó la evolución de la parasitemia comparando número promedio de parásitos, día de máxima parasitemia y días de aparición y desaparición de parásitos. Se observó que hubo diferencias entre ellos, desatacando que H5 indujo los niveles más altos en el número de parásitos en circulación y Ninoa los más bajos. El aislado Ninoa resultó completamente diferente a los otros aislados. Mientras que los aislados H5, Querétaro y Z10 solo fueron parecidos en el parámetro de día de aparición de parásitos, siendo diferentes en los otros parámetros que se analizaron. Los resultados fueron interesantes debido a que con ellos se confirma "in vivo" la heterogeneidad reportada en estudios genéticos "in vitro" por diversos autores en torno a los aislados mexicanos de *T. cruzi* (Zavala-Castro, Velasco-Castrejón y Hernández, 1992; López, 1994).

Al analizar la mortalidad inducida por cada aislado en el modelo, se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad. Los ratones infectados con el aislado Ninoa no indujeron muerte y los resultados coincidieron con lo observado en los estudios "in vitro" por López en 1994 e "in vivo" por Cruz en 1994, quienes reportaron a este aislado como el menos virulento de los aislados analizados. Por otro lado el aislado H5, el cuál durante ensayos realizados "in vitro", fue reportado como virulento, mostró diferencias en su comportamiento "in vivo" induciendo niveles medios de mortalidad. Se observó que el aislado Querétaro indujo niveles altos de muerte, encontrando porcentajes de 80 y 100% según el inóculo empleado. Finalmente el aislado Z10 indujo una mortalidad de 100% este dato coincide con su capacidad infectiva en líneas celulares reportada "in vitro" por López en 1994, lo que permite catalogar a este aislado como altamente infectivo y virulento. En concreto, se encontraron tres patrones de comparación diferentes en cuanto a mortalidad, el primero que señala a Z10 y Querétaro como aislados muy virulentos, el segundo mostrando a Ninoa como un aislado no virulento y el tercero con el aislado H5, que

tuvo un comportamiento de virulencia media. Lo anterior resultó importante ya que permitió comparar mecanismos de respuesta inmune inducidos por diferentes aislados: avirulentos, medianamente virulentos y virulentos.

Se observó que los aislados Z10 y Querétaro que indujeron porcentaje de mortalidad más elevada en los ratones infectados produjeron un nivel bajo de anticuerpos que probablemente no le permitieron a los ratones controlar la infección. Por el contrario, los aislados Ninoa que no induce mortalidad y H5 que induce porcentajes medios de muerte, mostraron durante las primeras dos semanas post-infección el mismo patrón asociado a una baja producción de anticuerpos, pero a medida que los días avanzaban se observó un incremento en el nivel de anticuerpos en los ratones infectados que probablemente les ayudó a sobrevivir, este resultado confirma que los anticuerpos son importantes en la resistencia a la infección como ya fue propuesto por otros autores (Kierzembraum y Howard, 1976; Brener y Kretli 1986). Nuestros resultados parecen indicar que las diferencias anteriormente mencionadas están directamente relacionadas con el aislado del parásito utilizado en la infección, ya que los ratones utilizados eran singénicos esto es, con el mismo fondo genético.

Se ha mencionado que durante el desarrollo de la infección por *T. cruzi* se presenta un efecto inmunosupresor en la fase aguda tanto en humanos como en el modelo murino, lo que le permite al parásito evitar su destrucción por mecanismos inmunes (Ramos y col., 1978, Ortíz y col., 1980; Cunningham y col., 1978). En los cuatro aislados de *T. cruzi* analizados en este trabajo se observó que este mecanismo inmunosupresor está presente durante la fase aguda, esto es las dos primeras semanas post-infección. Se ha reportado que las deficiencias relacionadas con el efecto inmunosupresor están directamente relacionadas con la proliferación de macrófagos supresores, activación policlonal de linfocitos T, o deficiencias en la producción de ciertas citocinas como la interleucina 2 (IL-2) e interferón γ (IFN- γ), que

juntos constituyen los elementos necesarios para establecer una buena respuesta inmune, por ejemplo la activación de células B y con ello la consecuente producción de anticuerpos (Muñoz, y col., 1992; Torrico y col., 1991; Pakianathan y Kuhn, 1992). Si asociamos este evento con la producción de ciertos isotipos relacionados con la resistencia a *T. cruzi*, tenemos que las subclases de IgG en ratón, específicamente IgG2a e IgG2b han sido implicados como isotipos importantes en la resistencia a la infección por éste parásito (Takehara y col., 1981; Spinella y col., 1992). Posiblemente habilitando un mecanismo de actividad fítica ó incrementando la fijación de complemento dando como resultado la opsonización al parásito con la subsecuente fagocitosis através de células dependientes de anticuerpos (Lima-Martins y col., 1985). Nuestros resultados permitieron observar que en los ratones infectados con aislados considerados como poco virulentos (H5 y Ninoa) la producción del isotipo IgG2a estuvo dirigido contra dos proteínas antigénicas una de 45-50 y otra de 70 kilodaltones. Mientras que en el suero de ratones infectados con el aislado virulento Querétaro la producción del isotipo IgG2a estuvo dirigido contra un antígeno de 70 kilodaltones pero no así contra el de 45-50 kilodaltones. Finalmente en el caso de los ratones infectados con el aislado Z10 no se observó la producción de este anticuerpo. Estos resultados permiten hipotetizar la posibilidad de un efecto protector del antígeno de 45-50 kilodaltones que conferiría resistencia a la infección permitiendo la sobrevivencia de los individuos infectados. En un futuro se plantean para el estudio de este antígeno, estudiar un grupo de aislados de *T. cruzi* mayor al número que se estudió en el presente trabajo comparando aislados virulentos y no virulentos que permitirán saber si nuestra hipótesis pudiera ser válida. Una vez identificado el antígeno de 45-50 kilodaltones, se propone continuar su estudio a nivel inmunológico y bioquímico para iniciar una caracterización completa. Es importante mencionar que en el presente trabajo, se usó un extracto total de epimastigotes debido a que

en el laboratorio es la fase del parásito que puede producirse en cantidades muy grandes, y apoyados en trabajos como el de Spinella y cols., 1992, hay evidencias para decir que no existen diferencias entre el uso de un extracto de epimastigotes y uno de tripomastigotes lo que permite darle validez a nuestro trabajo.

Por otra parte, una activación policlonal de células B se ha reportado durante el desarrollo de la infección en ratones infectados por *T. cruzi*, donde probablemente diversas clases de anticuerpos son sintetizados y producidos en forma anormal con la consecuente perturbación de la respuesta inmune humoral que puede persistir hasta la fase crónica de infección (Ortiz y col., 1980, D'Imperio-Lima y col., 1985). Por otro lado la presencia de algunos anticuerpos específicos como IgG e IgM están directamente implicados en la resistencia a la infección (Primavera y col., 1990; Bouhdidi y col., 1994), otros anticuerpos como IgA e IgE cuya importancia no ha sido bien establecida han sido detectados también en este tipo de infección parasitaria (Bouhdidi y col., 1994). El análisis comparativo de la producción de isotipos inducido por los cuatro aislados de *T. cruzi* estudiados aquí, indicó que con excepción de los ratones infectados con el aislado Z10, los ratones infectados con los aislados Ninoa, Querétaro y H5 indujeron la producción de IgG específicamente los isotipos IgG2a e IgG2b. Pudo observarse que los isotipos IgG2a, IgG1 e IgM en los ratones infectados con el aislado Ninoa fueron los anticuerpos circulantes que tuvieron reconocimiento hacia un número mayor de antígenos. En tanto que en los ratones infectados con el aislado H5 se observó que los isotipos dirigidos a un número mayor de antígenos fueron los anticuerpos de la clase IgG1 e IgG2a. Finalmente en los ratones infectados con el aislado Querétaro se observó que el isotipo IgM fue el anticuerpo que estuvo dirigido a un número mayor de proteínas antagónicas, siendo éstas una de 40 y otra de 35 kilodaltones.

Los mecanismos responsables de la presencia del isotipo IgG2a están asociados a las células T CD4+. Donde el fenotipo Th1 está relacionado con la secreción de IgG2a por células B regulada por la citocina IFN γ (Spinella y col., 1992). Este evento resulta ser interesante ya que se ha mencionado que las células CD4+ podrían estar implicadas con un efecto protector en la infección murina por *T. cruzi* (Kierszbaum, 1995). Por otro lado, diversos estudios han mencionado la importancia de la citocina IFN γ como importante para prevenir la supresión inmune y la muerte en el modelo experimental murino (Reed, 1988; Torrico y col., 1991). Sin embargo también se ha postulado que durante la fase aguda, un efecto inmunosupresor causado por el parásito, mediante mecanismos hasta ahora desconocidos, pudiera estar interviniendo en la baja producción de INF- γ a través de la activación de otra citocina, la IL-10 la cuál inhibiría la producción de INF- γ (Silva y col., 1992). De acuerdo a lo observado en nuestro trabajo, podemos apoyarnos en esta hipótesis para suponer que hay mecanismos inmunosupresores en el parásito que le permiten su evasión del sistema inmune, pero que las diferencias encontradas en este trabajo en relación a la virulencia entre los aislados de *T. cruzi* supone que estos mecanismos inmunosupresores dependen del aislado del parásito.

Cabe mencionar que en los ratones infectados por aislados virulentos (Querétaro y Z10), no se observó la producción del isotipo IgG2b, lo que también permite confirmar la importancia de este anticuerpo en la resistencia a la infección por *T. cruzi* como lo han descrito los trabajos de Takehara y col., 1981 y Powel y Wasson, 1993. Nuestros resultados al apoyar lo descrito por estos autores, también proponen que juntos los isotipos IgG2a e IgG2b tienen un accionar que le permite al individuo una resistencia a la infección, y que según lo observado en nuestro estudio, en los ratones infectados con los aislados Querétaro y Z10, la falta de uno de éstos anticuerpos o de los dos no les permitió a los individuos sobrevivir.

La presencia de IgM en el desarrollo de la infección por *T. cruzi* está directamente involucrada con la resistencia durante la fase aguda de infección por medio de mecanismos inmunes que incluyen la lisis por complemento (Powel y Wasson, 1993). Se sabe que IgM es uno de los primeros anticuerpos generados en la respuesta inmune primaria ante cualquier infección, hecho que se ha observado también en la infección provocada por *T. cruzi* (Araujo y col., 1984; Primavera y col., 1990). Sin embargo los datos obtenidos con nuestros aislados muestran diferencias ya que este anticuerpo fue detectado contra los cuatro aislados del parásito, pero con diferencias en el tiempo de aparición, siendo a partir de los días 20-25 post-infección en ratones infectados con Z10 y Querétaro, mientras que en el caso de los aislados Nino y H5 la producción de este anticuerpo se detectó a partir del día 40 post-infección. Este resultado es comparable a lo observado por Bouhdidi y col., en 1994, cuestionando así la presencia de este anticuerpo como rasgo característico de la fase aguda de la infección. La aparición tardía de este isotipo podría ser determinante para la sobrevivencia del parásito proponiendo que durante la fase aguda de infección, algunos aislados del parásito posean mecanismos que impidan la secreción de IgM, probablemente a través de las deficiencias reportadas en la producción de IL-2 (Pakianathan y Kuhn, 1992), ya que esta interleucina está directamente involucrada en la secreción del isotipo IgM y que durante el desarrollo de la infección el daño producido en IL-2 puede ser reversible teniendo como consecuencia un aumento de este isotipo durante la fase crónica de la infección.

Es importante también señalar la presencia del isotipo IgA, detectado solamente en sueros de ratones infectados por los aislados H5 y Nino. La presencia de este isotipo en el suero de ratones infectados con un aislado considerado como no virulento, durante el periodo crónico puede tener implicaciones directas en lesiones de mucosas como consecuencia de alteraciones digestivas (Primavera y col., 1990). Es importante mencionar que durante los estudios

realizados por Cruz en 1994, el aislado Ninoa presentó un tropismo preferente hacia músculo esquelético, pero en ese estudio no se analizaron órganos involucrados con el sistema digestivo, por lo que en posteriores estudios se propone analizar con detalle la histología de la región anatómica mencionada, en ratones infectados con este aislado para poder determinar con fundamentos lo dicho por Primavera y col., 1990 en relación a la presencia de IgA como indicador de lesiones en mucosas digestivas desarrolladas durante en la fase crónica en la infección por *T. cruzi*.

Finalmente la presencia del isotipo IgE ha sido reportada por varios autores durante infecciones provocadas por helmintos (Bout y col., 1980) sin embargo, en infecciones provocadas por protozoarios la función de este anticuerpo no ha sido bien establecida. Un reporte previo realizado por Bouhdidi y col., en 1994, indicó la presencia de éste anticuerpo en la infección provocada por *T. cruzi*, sin embargo en nuestro análisis no se detectó la presencia de éste anticuerpo en ninguno de los sueros de ratones infectados por los diferentes aislados. Se considera que el no haber detectado este isotipo no se debió a falta de sensibilidad en el ensayo ya que la prueba para IgE detectó niveles hasta de 0.3µg de inmunoglobulina. Mientras que Bouhdidi y col., en 1994, reportaron una concentración de 6µg de IgE en ratones infectados con el aislado mexicano Tehuantepec. Este resultado es una indicación más de la heterogeneidad entre los aislados mexicanos de *T. cruzi*.

Este trabajo proporcionó resultados que permitieron caracterizar biológica e inmunológicamente cuatro aislados de *T. cruzi* en un modelo murino de infección. Mucho se ha mencionado respecto al uso del término "aislado o cepa" para denotar a una población de parásitos de la misma especie en una o más características específicas. El termino de "cepa" en bacteriología se define como una población homogénea que provienen de un organismo aislado de un sitio determinado, lo cuál es una definición que no puede ser válida para *T.*

cruzi, ya que organismos genéticamente distintos han sido aislados de una misma región geográfica y un mismo hospedero o vector. Trabajos como el de Thompson, 1988 aceptan el término de "cepa" aplicable a parásitos definiendo el término como a la serie de variantes dentro de las especies que han sido caracterizadas usando uno o mas criterios, mientras que el término de aislado solo podrá usarse hasta el momento en que un organismo ha sido bien caracterizado. Los criterios que éstos autores usan para caracterizar una cepa son de dos tipos: extrínsecos cuando pueden tener bases genéticas influenciadas por un amplio rango de factores ambientales o del hospedero como: comportamiento, epidemiología sensibilidad a agentes químicos e inmunología, o bien intrínsecos los cuales están relacionados a el genoma del organismo como: ADN, cromosomas, bioquímica y morfología. Basándose en la clasificación propuesta por Thompson , 1988, se considera que los resultados encontrados aquí junto a los análisis hechos por otros autores (Zavala-Castro y col., 1992; Cruz, 1994; López, 1994; Ramos, 1995) permiten tener bases suficientes para indicar que el grupo de aislados mexicanos de *T. cruzi* analizados en este trabajo cuenta con un nivel de caracterización muy completa que permite llamarlos cepas.

En resumen se pudo confirmar la heterogeneidad biológica de los aislados de *T. cruzi* y la diversidad de las variantes respuesta inmune humoral, apoyando la necesidad de hacer esta clase de estudios en otros aislados, para tener una imagen más cercana a la realidad de la complejidad de la interacción parásito- hospedero en la infección por *T. cruzi*.

FALTA PAGINA

No.

77

8. BIBLIOGRAFIA

Acha, P. N. y Szyfres, B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y animales. OPS/OMS Pub. Cient. No. 53. EUA. 89 pp.

Adler, S. 1959. Darwin's Illnes . Nature 184: 1102-1103.

Aguirre, P. E. 1947. Presencia de *Trypanosoma cruzi* en mamíferos y triatomídeos de Monterrey, Nuevo León. Arch. Med. Mex. 5: 359-363.

Anderson, N., Morales, A., Nava, E., Martínez, E., Rodríguez, Y., Young, P. and Howard, M.K. 1990. *Trypanosoma cruzi* infection in the Mexican State of Guerrero: a seroepidemiological (ELISA) survey of 20 communities. J. Trop. Med. Hig. 93: 341- 346.

Andrade, S. G. 1974. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baio (Contribuição a o estudo da Patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). Rev. Patol. Trop. 3: 65-121.

Andrade, S. G. 1979. Patología da Doença de Chagas experimental: o problema das cepas do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com a resposta aos quimioterápicos. Rev. Med. da Bahia. 25: 256-261.

Andrade, S. G., Andrade, V., Rocha Filho, F. e Barral Netto, M. 1981. Análise antigênica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 23: 245-250.

Andrade, V., Brodskyn, C. and Andrade, S. G. 1983. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77: 796-799.

Andrade, S. G., Andrade, V., Magalhães, B.J. and Netto, P.M. 1985. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Trop. Med. and Parasitol. 79: 397- 407.

Araujo, F. G., Heilman, B. and Tighe, L. 1984. Antigens of *Trypanosoma cruzi* detected by different classes and subclasses of antibodies. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 78: 672- 677.

Bautista, B. J. 1993. Estudio de reservorios domésticos de *Trypanosoma cruzi* en la Jurisdicción Sanitaria 2. Jotutla Moreles. Tesis. Prof. Fac. de ciencias, UNAM. 78 pp.

Bouhdidi, A., Truyens, C., Rivera, M.T. Bazin, H. and Carlier, Y. 1994. *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotypic hypergammaglobulinemia and parasite- specific response involving high IgG2a concentrations and highly avid IgG1 antibodies. Parasite. Immunol. 16: 69- 76.

Bout, D., Rousseaux, R., Carlier, Y. and Capron, A. 1980. Kinetics class and subclass of total immunoglobulins and specific antibodies to *Schistosoma mansoni* during murine infection. *Parasitol.* 80: 247.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brener, Z and Kretzli, A. U. 1990. Immunology of Chagas' disease. In modern parasite biology: Cellular, immunological and molecular aspects. De. Freeman Company, New York. 247 pp.

Carlier, Y., Rivera, M. T., Truyens, C., Puissant, F and Milaire, J. 1987. Interactions between chronic murine *Trypanosoma cruzi* infection and pregnancy: fetal growth retardation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 534-540.

Carban, F.M., Gruppi, A. and Vottero-Cima, E. 1992. *Trypanosoma cruzi*: Involvement of IgG isotypes in the parasitemia control of mice immunized with parasite exoantigens of isoelectric point 4.5. *Exp. Parasitol.* 75: 137-145.

Carban, F.M., Gea, S., Menso, E. and Vottero-Cima, E. 1993. Chagas' disease: IgG isotypes against *Trypanosoma cruzi* cytosol acid antigens in patients with different degrees of heart damage. *Clin. Immun. Immunopath.* 67: 25-30.

Chagas, C. 1909. Nova Tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1: 159-218.

Cox, F. E. G. 1987. Modern Parasitology. Parasitic Protozoa. Ed. (Blackwell). Oxford, London. pp 1-7.

Cox, F. E. G. and Liew, E.Y. 1992. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immun. Today.* 13: 445-448.

Chiari, E and Camargo, E.P. 1984. Culturing and Cloning of *Trypanosoma cruzi*. In: Morel, M. (Ed). *Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil. Genes and antigens of parasites.* pp 23-26.

Cruz, R. D. 1994. Caracterización biológica de un aislamiento mexicano de *Trypanosoma cruzi*. Tesis. Prof. Fac. de Ciencias, UNAM. 74 pp.

Cunningham, S. D., Kuhn, E. R. and Rowland, C. E. 1978. Suppression of Humoral Response during *Trypanosoma cruzi* infections in mice. *Infect. Immun.* 22: 155-160.

D'Avila, R.D., Jones, M. E., Tostes, S., Reis, L. E., Gazzinelli, G., Colley, D. G. and McCurley, L.T. 1993. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48: 637-644.

D' Imperio Lima, M. R., Joskowicz, M., Coutinho, A., Kiptus, T. and Eisen, H. 1985. Very large isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Eur. J. Immunol. 15: 201-203.

Deane, M. P., Moriearty, P. L. and Thomanz, N. 1984. Cell differentiation in trypanosomatids and other parasitic protozoa In: Morel, M. (Ed). Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brazil. Genes and antigens of parasites. pp 11-22.

De Gaspari, E. N., Stolf, A. M. S., Umezawa, E. S., Zingales, B. and Abrahamsohn, I.A. 1994. *Trypanosoma cruzi*: Studies on the reactivity of antibodies bound to the surface of blood forms at the early phase of the infection. Acta. Trop. 56: 79-87.

Diario Oficial Mexico. 1992.

Dias, J. C. 1987. Control of Chagas' disease in Brazil. Parasitol. Today. 3: 336-341.

Dusanic, G. D. 1991. *Trypanosoma cruzi* (*Schistotrypanum cruzi*). In: (Ed) Academic Press, London. Parasitic Protozoa. Vol. 1. 137- 194 pp.

García, E. S. and Azambuja. 1991. Development and Interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. Parasitol. Today. 79: 240-244.

Gazzinelli, R. T., Urdal, D. L. and Tushinsky, R. J. 1992. The microbicidal activity of interferon γ - treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L- arginine -dependt, notrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . Eur. J. Immunol. 22: 2501-2506.

Gershoni, J. M. and Palade, G. E. 1982. Electroforetic transfer of proteins from Sodium dodecil- polyacrylamide gels to a positive charged membrane filter. Anal. Biochem. 124: 396-405.

Gershoni, J. M. and Palade, G. E. 1983. Protein blotting: Principles and applications. Anal. Biochem. 131: 1-15.

Goldsmith, R. S., Zarate, R. J., Zarate, L. G., Morales G., Kagan, Y., Drickey, R. and Jacobson, L.B. 1992. Clinical and epidemiological studies of Chagas' disease in rural communities of Oaxaca, Mexico and eight years follow up: Bol. PHAO. 26: 47-57.

Grauert, M. R., Houdayer, M. and Hontebeyrie-Joskowicz, M. 1993. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. Clin. Exp. Immunol 93: 85-92.

Hagan, P. 1993. IgE and protective immunity to helminth infections. Parasite. Immunol. 15: 1-4.

Ho, J. L., Reed, S. G., Sobel, J., Arruda, S., Hui, S., Wick, E. and Grabstein, E. 1992. Interlekin-3 induces antimicrobial activity against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi* and tumoricidal activity in human peripheral blood-derived macrophages. *Infect. Immun.* 60: 1985-1993.

Hontebeyrie-Joskowicz, M. 1993. Immunopathologie de la trypanosomiase americane. *Bull. Ins. Pasteur.* 91: 75-88.

Jocklik, W. K., Willett, H. P. and Amos, B. 1986. *Microbiología Medica. De Panamericana. Argentina.* 1454 pp.

Kierszemabaum, F. and Howard, J. G. 1976. Mecanisms of resistencia against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: The importance of antibodies and antibody-forming capacite in the Biozzi high and low responder mice. *J. Immunol.* 116: 1208-1211.

Kierszemabaum, F., Villalta, F. and Po-Ho, T. 1986. Role of inflammatory cells in Chagas' disease. III. Kinetics of human eosinophil activation upon interaction with parasites. (*Trypanosoma cruzi*). *J. Immunol.* 136: 662-666.

Kierszemabaum, F. and Szein, M. B. 1990. Mecanisms underlying immuno suppression induced by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today.* 6: 261-263.

Kierszemabaum, F. 1995. What are T-cell subpoblations Really Doing in Chagas' disease? *Parasitol. Today.* 11: 7-8.

Kirchohoff, L. V. and Neva, F.A. 1985. Chagas' disease in latinamerican inmigrants. *JAMA.* 254: 3058-3060.

Krettl, A. U. and Brener, Z. 1976. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 116: 755-760.

Krettl, A.U. and Brener, Z. 1982. Resistance agains *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 128: 2009-2012.

Laemmli, O K. 1970. Cleavage of Structural Proteins the Asembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.

Lana, M., Viera, L. M., Machado-Cohelho, G. L., Chiari, E., Veloso, V. M. and Tafuri, W.L. 1991. Humoral Immune Response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz.* 86: 471-473.

Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, E. C., Polijansky, G., Sprague, V., Vaura, J. and Wallace, F. G. 1980. A Newly Revised Classification of the Protozoa. *J. Protozol.* 27: 37-58.

Levitz, M. S., Mathews, L. H. and Murphy, W. J. 1995. Direct antimicrobial activity of T cells. *Immunol. Today*. 16: 387-391.

Lewinson, R. 1979. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and of the American Tripanosomiasis (foot- notes to the history of Chagas' disease). *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73: 513-523.

Lima-Martins, M. V. C., Sánchez, G.A., Krettli, A.U. and Brener, Z. 1985. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. *Parasite. Immunol.* 7: 367- 376.

Lincon, T.A y P rez, R.R. 1994. Cinetica de la Respuesta Inmune Humoral en ratones inmunizados e inoculados con *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 36: 119- 125.

López, O. M. V. 1994. Caracterización biológica "in vitro" de 17 cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis. Prof. Fac. de Ciencias, UNAM. 96 pp.

Madeira, E. D., De Andrade, A. F. B., Bunn-Moreno, M. M and Barcinsky, B. 1979. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi*: Characterization of the effector cell from normal human blood. *Infect. Immun.* 25: 34-38.

Mazzoti, L. 1940. Dos casos de enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca. *Gac. M. d. (Mexico)* 70: 417-420.

Melo, R. C. and Brener, Z. 1978. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.* 64: 475-482.

Melhorn, H and Piekarski, G. 1993. *Fundamentos de Parasitología*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp 32 y 43.

Metz, G., Carlier, Y and Vray, B. 1993. *Trypanosoma cruzi* upregulates nitric oxide release by INF- γ - preactivated macrophages, limiting cell infection independent of the respiratory burst. *Parasite. Immunol.* 15: 693-699.

Mikhail, S. K. and Rowland, C. E. 1990. *Trypanosoma cruzi* antigen-specific antibody response in immunized mice during acute and chronic infection. *J. Parasitol.* 76: 690-697.

Miles, M. A., Póvoa, M. M., Prata, A., Cedillos, R.A., De Souza, A.A. y Macedo, V. 1981. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause venezolan and brazilian forms of Chagas' disease? *The Lancet*. 1: 1338- 1340.

Miles, M. A. 1983. The epidemiology of South American tripanosomiasis- biochemical and immunological approaches and their relevance to control. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 5-23.

Mifon, G and Louis, J. 1993. CD8⁺ T cell and immunity to intracellular pathogens. *Parasite. Today*. 9: 196-197.

Minoporio, P. M., Eisen, H., Forni, D., D' Imperio Lima M.R., Joskowics, M. and Coutinho, A. 1986. Polyclonal responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T and B responses. *Scand. J. Immunol.* 24: 661-668.

Molina, H.A. and Kiersebaum, F. 1989. Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* "in vitro" causes bystander cardiac cell damage. *Immunol.* 66: 289-295.

Morikawa, K., Tohny, K., Ishida, H., Matsuura, N. and Kakudo, K. 1995. Different migration patterns of antigen-presenting cells correlate with Th1/Th2-type responses in mice. *Immunol.* 85: 575-581.

Mortati, R. C., Fonseca, S. L., Coelho, J., Oliveira, A. and Moreno, M. 1992. Follow-up of patent and supatent parasitemias and development of muscular lesions in mice inoculated with very small number of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 75: 233- 239.

Muñoz, F. M. A., Fernández, M.A. and Fresno, M. 1992. Sinergism between tumor necrosis factor- α - and interferon- γ on macrofages activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* : trough a nitric oxide dependent mecanism. *Eur. J. Immunol.* 22: 301-307.

Noble, E.R., Noble, G.A., Shad, G.A. and MacLannes, A.J. 1989. *Parasitology, the biology of animal parasites.* Ed. Philadelphia, London. pp 28-34.

Ortiz, O. L., Parks, D. E., Rodríguez, M. and Weigle, O. W. 1980. Polyclonal B lymphocytes activation during *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 124: 121-126.

Pakianathan, D.R. and Kuhn, R.E. 1992. interleukin- 2 receptors in experimental Chagas' disease. *Infect. Immun.* 60: 3904-3908.

Pereira, M. E. S. and Krettl, A. U. 1990. The effect of reinoculation with trypomastigotes on the level of protective antibodies in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian. J. Med. Biol. Res.* 23: 283-292.

Prez, F. R., Jimenez, D. M., Quiroz, F. L., Negrete, M. C., Reyes-López, P.A. y Rosales-Encinas, J. L. En: *Memorias del XI Congreso Nacional de Parasitología.* Universidad Nacional Autónoma de Quer taro, Quer taro. No. de Trabajo 126. 25 al 27 de Agosto de 1994.

Petray, B., Rottenberg, E., Berlot, G., Corral, R.S., Diaz, A., Orn, Anders. and Grinstein, S. 1993. Effect of anti- γ - interferon and anti-interleukin-4 administration on the resistance of mice agains infection with reticulotropic and niotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol. Lett.* 35: 77-80.

Powel, M. R. and Wassom, D. L. 1993. Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. I. Antibody isotype profiles. *Parasite Immunol.* 15: 215-221.

Primavera, K. S. C., Umezawa, E. S., Peres, B.A., Camargo, M. E. and Hoshino-Shimizu. 1990. Chagas' disease: IgA, IgM and IgG antibodies to *T.cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and different chronic forms of the disease. *Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 32: 172-180.

Ramírez, C. L., Tay, J y Salazar, S. P. M. 1975. Cambios histológicos producidos en el ratón por cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inv. Salud. Pública (México)*. 35: 131-153.

Ramos, C., Lamoyi, E., Feoli, M., Rodríguez, M., Pérez, M and Ortíz, O. L. 1978. *Trypanosoma cruzi*: Immunosuppressed response to different antigens in the infect mouse. *Exp. Parasitol.* 45: 190-199.

Ramos, M. V. 1995. Estudio Molecular de aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*. Tesis. Prof. Fac. de Química, UNAM. 66 pp.

Rassi, A., Luquetti, O. A., Rassi, A. Jr., Rassi, S. G. and Rassi, A. G. 1992. Chagas' disease clinical features. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M.E. and Rassi, A. (Ed) ISBT Brazil'92 Sao Paulo Brazil. Chagas' disease (American trypanosomiasis) Its impact on transfusion and clinical medicine. 81-101 pp.

Reed, S. G., Nathan C H. and Phill, D. 1987. Recombinant granulocyte/ macrophage colony stimulating factor activates macrophage to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. *J. Exp. Med.* 166: 1734- 1746.

Reed, S. G. 1988. In vivo administration of recombinant INF γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections, *J. Immunol.* 12: 4342-4347.

Reiner, S. L. 1994. Parasites and T helper cell development. *Parasitol. Today*. 10: 485-488.

Reyes, L. P. 1984. Enfermedad de Chagas en México. *Arch. Inst. Cardiol. México*. 54: 1-2.

Ridel, P. R., Auriault, C., Doroy, F., Leite, P., Santoro, F., Neyrinck, J.L., Kusnierz, J.P. and Capron, A. 1988. Protective role de IgE in immunocompromized rat toxoplasmosis. *J. Immunol.* 141: 978-983.

Romagnani, S. 1992. Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the "natural" immune response? *Immunol. Today*. 13: 379-381.

Romero, R. H y Rojas Navarro P. 1988. Manual de infecciones parasitarias. Desinlimed, Caracas. pp 34.

Rottenberg, M. E. 1992. Control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice deprived of T-cell help. *Scand. J. Immunol.* 36: 261-268.

Rowland, E. C., Mikhail, K. S. and McCormic, T. S. 1992. Isotype determination of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody in murine Chagas' disease. *J. Parasitol.* 78: 557-561.

- Salazar, S. P. M., Tay, J., Navarrete, F. y Ramos, S. 1975. Comportamiento en ratón de una cepa mexicana de *Trypanosoma cruzi* de peculiar virulencia. Rev. Inv. Salud. Pública (México) 35: 37-45.
- Salazar, S. P. M., Jimenez, M. J., Tay, J. y Cárdenas, R.L. 1978. Estudio comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* en el ratón blanco. Rev. Lat-amer. Microbiol. 20: 51-57.
- Salazar, S. P. M., De Haro, A. I. and Uribarren, B.T. 1988. Chagas' disease in Mexico. Parasitol. Today. 4: 348-351.
- Schenone, H y Rojas, A. 1989. Algunos datos y observaciones programáticas en relación a la epidemiología de la enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasitol. 44: 66-86.
- Schmidt, G. D. and Roberts, L. S. 1989. Foundations of Parasitology. Ed. Timer Mirror/ Mosby College Publishing, USA. pp 55-65.
- Silva, J. S., Morrissey, P. J., Grabstein, K., Mohler, M. K., Anderson, D. and Reed, S. 1992. Interlekin 10 and Interferon γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J. Exp. Med. 175: 169-174.
- Sleigh, M. A. 1989. Protozoa and other protists. Cambridge University Press. New York. 342 pp.
- Soto, M. N., Yamashiro-Kanashiro, E. H., Tanji, M.M., Kaneno, R., Higuchi, M.L. and Duarte, A.J.S. 1992. CD8⁺ cell and natural cytotoxic activity among spleen, blood and heart lymphocytes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. Infect. Immun. 60: 1024-1030.
- Spinella, S., Liegeard, P. and Hontebryrie-Joskowicz, M. 1992. *Trypanosoma cruzi*: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. Exp. Parasitol. 74: 46-56.
- Takehara, A. H., Perini, A., Da Silva, H. M. and Mota, Y. 1981. *Trypanosoma cruzi*: Role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. Exp. Parasitol. 52: 137-146.
- Tarleton, R. L. 1990. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. 133: 717-724.
- Tarleton, R. L. 1991. The role of T-cells subpopulations in experimental Chagas' disease. Res. Immunol. 142: 130-133.
- Tarleton, R. L., Koller, B.H., Latour, A. and Postan, M. 1992. Susceptibility of β -microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. Nature. 356: 338-340.

Tarleton, R. L., Sun, J., Zhang, L. and Postan, M. 1994. Depletion of the T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental chagas' disease. *Infect. Immun.* 62: 1820-1829.

Tarleton, R. L. 1995. The Role of T Cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasitol. Today.* 11: 7-8.

Tay, J., Gutierrez, Q. M., Salazar, S. P. M., Castillo, M. y Ortega, G. M. 1973. Estudio sobre seis cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inv. Salud Pública (México)* 33: 67-76.

Tay, J., Alonso, G. T. y Salazar, S. P. M. 1978. Efecto de las hormonas (progesterona y testosterona) sobre la patogenicidad de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 29: 45-50.

Tay, J., Salazar, S. P. M., Velasco, M., De Haro, Y., García, Y. Y. y Gutierrez, Q. M. 1979. Estudio epidemiológico, de la enfermedad de Chagas en el Estado de Jalisco. *Rev. Sal. Públ. (México)* 21: 145-149.

Tay, J., Salazar, S. P. M., Ontiveros, A., Jiménez, J., De Haro, I., García, Y. y Gutierrez, Q. M. 1986. Epidemiologic study of Chagas' disease in a town in Oaxaca, México. *PHAO Bull.* 20: 358-365.

Tay, J., Aguilera, R. L., Castrejón-Velasco, O. y Quiroz, G. M. 1984. *Parasitología Médica*. De Francisco Mndez, México. 105-127 pp.

Tay, J., Schenone, H., Sánchez, T. J. y Robert, L. 1992. Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Bol. Chil. Parasitol.* 47: 43-53.

Thompson, R. C. A. 1989. In *Parasitology in Fucus*. Bunnang, D., Curio, E., Dubrenetz, J. F., Enders, B., Franz, M., Frenkel, J. K., Grüntzig, J., Gustafsson, M., Hass, W., Harinasuta, K. T., Heidrich, H. G., Hinz, E., James, E. R., Köhler, P., Kunz, W., Lloyd, S., Mehlhorn, H., Thompson, R. C. A., Vercruyse, J., Voigt, W. P., Wakelin, D., Walldorf, V., Weiland, G and Wernsdorfe, W. H. (Ed) Springer-Verlag, Germany. pp: 391-411.

Tibayrenc, M., Hoffmann, A., Pouch, O., Echalar, L., Le Pont, F., Lemesre, J. L., Desjeux, P. and Ayala, F. J. 1986. Additional data on *Trypanosoma cruzi* isozymic strains encountered in Bolivian domestic transmission cycles. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 442-447.

Tizard, I. 1992. *Immunology and pathogenesis of tripanosomiasis*. Ed. CRC Press. USA. 237pp.

Torrico, F., Heremans, H., Rivera, M. T., Van Marck, E., Billiau, A. and Cartier, Y. 1991. Endogenous IFN γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* 146: 3626-3632.

Trischman, T., Taniwitz, H., Wittner, M. and Bloom, B. 1978. *Trypanosoma cruzi*. Resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* 45: 160-168.

Trischman, T. and Bloom, B. 1982. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 35: 546-551.

Umekita, L. F., Takehara, H.A. and Mota, I. 1988. Role of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol. Letters.* 17: 85-89.

Velasco-Castrejón, O. 1992. La Enfermedad de Chagas en México. *Infectol.* 12: 783-790.

Velge, P., Kusnierz, J. P., Ouassi, A., Marty, B., Pham, B.N. and Capron, A. 1991. *Trypanosoma cruzi*: infection of lymphocytes and their destruction by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 27: 2145-2152.

Villalta, F. and Kierszbaum, F. 1983. Role of Polymorphonuclear cells in Chagas' disease. II Uptake and mechanisms of Destruction of intracellular (amastigote) forms of *Trypanosoma cruzi* by human neutrophils. *J. Immunol.* 131: 1504-1510.

Villalta, F. and Kierszbaum, F. 1984 a. Role of inflammatory cell in Chagas' disease. II. Interactions of Mouse Macrophages and Human monocytes with intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*: Uptake and Mechanism of Destruction. *J. Immunol.* 133: 3338- 3343.

Villalta, F. and Kierszbaum, F. 1984 b. Role of inflammatory cells in Chagas' disease I. Uptake and mechanism of destruction of intracellular (amastigote) forms of *Trypanosoma cruzi* by humans eosinophils. *J. Immunol.* 134: 2053- 2058.

Voller, A., Bidwell, D. E. and Bartlett, A. 1979. The Enzymatic Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A Guide with Abstracts of Microplate Applications, Dinotech Laboratories, Inc. pp 7-118.

Wallace, A., Sánchez, G., Venegas, J. and Solari, A. 1995. Lack of cross-reactivity of lytic antibodies with bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* zymodemes generated in a mouse experimental model. *Exp. Parasitol.* 80: 176-185.

Wirth, J.J., Kierszbaum, F., Sonnenfeld, G. and Zlotnik, A. 1985. Enhancing effects of gamma interferon and phagocytic cell association with killing of intracellular *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 49: 61-66.

Younes-Chennoufi, B. A., Said, G., Eisen, H., Durand, and Hontebeyrie-Joskowicz, M. 1988. Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells (CD4⁺). *Trans. Soc. R. Trop. Med. Hyg.* 82: 84-89.

Zárate, G. and Zárate, J. R. 1985. A checklist of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of México. *Int. J. Entomol.* 27: 102-127.

Zavala-Castro, J. E., Velasco-Castrejón, O. y Hernández, R. 1992. Molecular characterization of Mexican stock of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47: 201-209.

APENDICE I
Medio de cultivo LIT (Liver Infusion Typtose)
para *Trypanosoma cruzi*

Composición:

* Cloruro de Potasio (KCl)	0.4 g
* Cloruro de Sodio (NaCl)	4.0 g
* Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ HPO ₄)	8.0 g
* Glucosa (o dextrosa)	2.0 g
* Triptosa (DIFCO, núm de cat. 0124-01-0)	5.0 g
* Infusión de Caldo de Hígado (DIFCO, núm. cat. 0269-17-7)	5.0 g
* Hemina (SIGMA, núm. cat. H-2250)	25.0 mg
* Suero Fetal de Bovino (GIBCO, núm. cat. 200-614AJ)	100 ml
* Se pesan 0.25 g de Hemina y se disuelven en 5ml de trietanol amina (SIGMA, núm. cat. T- 1377)	

Preparación:

Con excepción de la hemina y el SFB, todos los componentes se disolvieron en agua bidestilada, ajustándose a un pH de 7.2, esterilizando en autoclave a 120° C con una presión de 1 atmósfera durante 20 minutos. Posteriormente la solución se sometió a una prueba de esterilidad, dejándose a temperatura ambiente durante tres días y en completa oscuridad, finalizado ese periodo el medio se complementa con hemina, tomando 50µl por cada 100 ml de medio (quedando a una concentración de 25 µg de hemina/ml) y con el SFB al 10% inactivado. Antes de usarse, se realizó la prueba de esterilidad anteriormente señalada.

APENDICE II
Preparación de anticoagulante (Alsever)

Composición:

* Cloruro de Sodio (NaCl)	0.42 g
* Citrato de Sodio dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	0.8 g
* Glucosa (o dextrosa)	2.05 g
* Acido cítrico monohidratado ($H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$)	0.055 g

Preparación:

Los componentes se disolvieron en 100 ml de agua bidestilada ajustando a un pH de 6.1. La solución una vez preparada se filtró con filtros Milipore de 45 μ M (núm. cat. HAMG 04700)

APENDICE III
Protocolo de electroforesis en condiciones reductoras

Los análisis electroforéticos de los antígenos correspondientes a los cuatro aislados de *T. cruzi*, se realizaron en una cámara Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad).

Preparación de los geles.

I. Gel separador al 12%

Acrilamida al 30%-bisacrilamida al 0.8%	1.66 ml
4X Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml
Agua bidestilada	2.08 ml

Degasificar al vacío con agitación continua la solución durante 15 minutos antes de agregar los siguientes reactivos:

Persulfato de Amonio al 10%	0.016 ml
TEMED	0.003 ml

Agregar la solución entre los cristales de la cámara y esperar a que polimerice.

II. Gel concentrador al 5%

Acrilamida al 30%- Bisacrilamida al 0.8%	0.27 ml
4X Tris-HCl pH 6.8	0.417 ml
Agua bidestilada	1.017 ml

Degasificar al vacío en agitación continua durante 15 minutos y posteriormente agregar los siguientes reactivos:

Persulfato de amonio al 10%	0.008 ml
TEMED	0.002 ml

Agregar la solución sobre el gel separador colocando inmediatamente y con el cuidado de no hacer burbujas un peine con las separaciones necesarias del número de muestras que se desea analizar.

Muestra de análisis:

La muestra que se desea analizar debe prepararse en una dilución 1: con un amortiguador preparado en las siguientes condiciones:

Tris Hcl pH 6.8	0.5 M
SDS	2 %
Azul de bromofenol	1%
Glicerol	20%
2-β- mercaptoetanol	2 %

La muestra diluida se hierve durante 5 minutos para desnaturalizar el contenido de proteínas y después de hervirse se agrega en el gel concentrador

Condiciones de corrida:

La separación de proteínas por electroforesis se realiza a 200 Volts durante 45 minutos aproximadamente usando un amortiguador de corrida preparado en las siguientes condiciones:

Tris HCl	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.1%

Concluida la corrida por electroforesis, el gel se incuba durante una hora en una solución fijadora compuesta por: Isopropanol al 50% y ácido acético al 7%, para posteriormente teñirlo en colorante de azul de Coomasie durante una hora* lavando posteriormente el gel con una solución desteñidora**

para quitar el exceso de colorante.

*Colorante de azul de Coomasie:

Metanol	50%
Acido acético	10%
Azul coomasie	0.05%
Agua desionizada	40%

**Solución desteñidora

Metanol	20%
Acido acético	7%

APENDICE IV

Protocolo de Técnica de Inmunotransferencia

Para realizar la técnica de Western blot se usó la cámara Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad. Para realizar el inmunoblot previamente se realiza un gel de electroforesis como previamente se explicó en el apéndice III. Y en lugar de fijar el gel, este se remoja junto con un par de esponjas, un par de papel filtro y papel de nitrocelulosa (Schleier and Schuell No. cat. 401396) durante 10 minutos en un amortiguador para transferencia*

* Amortiguador de transferencia

Trizma base 25 mM

Glicina 192 mM

Metanol 20% a pH 8.3

Pasado este tiempo se procede a colocar dentro de un cassette en forma de emparedado un papel filtro una esponja, el gel, el papel de nitrocelulosa y nuevamente un papel filtro y una esponja colocándolos con mucho cuidado evitando que se formen burbujas que impidan el paso de las proteínas hacia el papel de nitrocelulosa. El cassette se coloca dentro de la cámara junto con una unidad de enfriamiento congelada dejándola transferir durante una hora a 100 volts. Transcurrido ese tiempo se corta una tira de papel transferido y se tiñe con colorante negro* amido para comprobar que la transferencia fue bien realizada lavándolo con una solución desteñidora**

* Colorante de negro amido

Colorante Negro Amido 0.1 %

Isopropanol 25%

Acido acético 10%

** Solución desteñidora

Isopropanol 25%

Acido acético 10%