

11261
14
28



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

"CARACTERIZACION DE ANTIGENOS RELEVANTES
EN EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD
DE CHAGAS".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS:
INMUNOLOGIA

P R E S E N T A :
JOSE ANTONIO RAMIREZ BARCENAS

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.

Pero yo digo:
solo por breve tiempo,
solo como la flor de elote,
asi hemos venido a abrimos,
así hemos venido a conocernos
sobre la tierra.

Solo nos venimos a marchitar,
¡oh amigos!
que ahora desaparezca el desamparo
que salga la amargura,
que haya alegría.....

En paz y placer pasamos la vida
venid y gozemos.
¡Que no lo hagan los que viven alrados,
la tierra es muy ancha.....!

Ms. cantares mexicanos, fol. 13v. y 26 r.

Este trabajo de tesis está dedicado a:

**-) La honorable memoria de mi padre.
Raymundo.**

-) La entereza y fortaleza de mi madre. Julia.

**-) Al amor tan grande que siento por mi esposa.
Nancy.**

**-) Al cariño inmenso por mis hijos. Alberto y
Esteban.**

**-)A mis amigos de toda la vida: Lourdes y
Hector; Alejandra y Bulmaro; Erendra y Jaime;
Araceli y Ramón y Judith y José Luis.**

Reconocimientos.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección del Dr. Librado Ortiz y cotutoría de los Doctores Lino Díaz de León y Raúl Mancilla.

A la M en IBB Nancy Mora por su colaboración en la obtención de resultados

A mis amigos del laboratorio: Gloria; María y Julio; Charly; Carmelo y Angel.

A Ruben Del Muro, Juan Díaz Rivadeneyra y Julio Cesar Carrero por sus acertados comentarios sobre el trabajo.

A Mariana Ramos por sus consejos en el establecimiento de cultivos.

A Marie Merchant por la realización de las microfotografías.

A Magdalena Corona y David Muñoz por su ayuda en la edición de resultados.

A la secretarías Isabel, Amada, Polita, Blanca y especialmente a Violeta por su ayuda en la fase final del trabajo.

Al jurado por la atención prestada y sus consejos invaluable.

INDICE	
Resumen	1
Aspectos generales	2
Ciclo de vida del parásito	3
Sintomatología	3
Figura 1: Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> en la naturaleza	4
Diagnóstico: pruebas de campo y laboratorio	4
Respuesta inmune celular	6
Respuesta inmune humoral	7
Diagnóstico actualidad	8
Hipótesis	11
Objetivos	12
Metodología	13
Cultiva en células	13
Parásitos y antígenos	13
Modelo de infección en ratón	15
Determinación de la parasitemia	15
Determinación de anticuerpos	15
Obtención de anticuerpos monoclonales	16
Ensayos de inmunofluorescencia	17
Análisis inmunoelectroforético	17
Determinación de antígeno en suero de ratones BALB/c	18
Resultados	19

Tabla 1. Liberación de tripomastigotes por células Vero	20
Figura 2. Curvas de infección de células Vero	20
Figura 3. Microfotografía de células Vero infectadas	21
Figura 4. Métodos de extracción de antígenos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	22
Figura 5. Comparación de los patrones electroforéticos de los estadios de <i>T. cruzi</i>	23
Tabla 2. Infección de ratones por Tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	24
Figura 6. Curvas de anticuerpos durante la infección de ratones BALB/c con <i>T. cruzi</i>	25
Tabla 3. Infección de ratones BALB/c con tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> provenientes de células Vero	25
Figura 7. Curva de parasitemia de ratones infectados con tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> provenientes de células Vero	26
Figura 8. Reactividad de sueros de ratones infectados con <i>T. cruzi</i>	27
Tabla 4. Reconocimiento de antígenos de <i>T. cruzi</i>	29
Tabla 5. Híbridos productores de anticuerpos anti-epimastigotes	30
Tabla 6. Híbridos productores de anticuerpos anti-estadios de <i>T. cruzi</i>	31
Tabla 7. Obtención de anticuerpos monoclonales anti- <i>T. cruzi</i>	31
Figura 9. Ensayo de inmunofluorescencia	32
Tabla 8. Reconocimiento de antígenos de <i>T. cruzi</i> por anticuerpos monoclonales	33
Tabla 9. Determinación de antígeno circulante de <i>T. cruzi</i>	33
Discusión	34

Conclusiones

46

Bibliografía

48

Resumen.

La caracterización de antígenos durante la infección con *Trypanosoma cruzi*, es un aspecto relevante para el entendimiento de la relación huésped-parásito. Sin embargo la presencia de más de un estadio de desarrollo tanto en el huésped vertebrado como invertebrado, así como las diversas formas del parásito detectadas en cultivos *in vitro* y la metacicloogénesis demuestran la gran plasticidad que a nivel estructural posee *T. cruzi*. En este trabajo se planteó identificar los antígenos involucrados en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, para lo cual se utilizó el modelo murino de infección. Mediante la inoculación a ratones de la cepa BALB/c con tripomastigotes de la cepa Querétaro, se midieron los títulos de anticuerpos generados durante la infección. Con el cultivo *in vitro* de las tres formas de *T. cruzi* (amastigotes, tripomastigotes y epimastigotes), se realizaron diversos ensayos encaminados a identificar los principales antígenos con los cuales reaccionaban los anticuerpos provenientes de ratones infectados. Los patrones de reactividad por inmunoelctrotransferencia, fueron heterogéneos entre los tres estadios, mostrando una correlación directa entre el grado reconocimiento con el aumento en los títulos de anticuerpo en el curso de la infección. Estos aumentaron de manera rápida (día 10), cinco días antes que se observara una disminución en el número de parásitos circulantes. De igual manera se obtuvieron anticuerpos monoclonales específicos contra componentes del parásito en dos protocolos diferentes para su obtención. Estos mostraron reactividad con componentes de los diferentes estadios de *T. cruzi* igualmente reconocidos por los sueros de ratones infectados, siendo el monoclonal 2B10.1 el que reconoce específicamente a antígenos de tripomastigotes.

Aspectos generales.

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, padecimiento que en los últimos años ha incrementado su importancia en salud pública debido a que más de 20 millones de personas en Latinoamérica, pueden estar infectadas por este organismo y al menos 90 millones se encuentran en riesgo de contraer la infección (Moncayo, 1992). Las regiones tropicales y subtropicales favorecen las condiciones ecológicas del establecimiento de la enfermedad, sin embargo su presencia se extiende desde los 42° Latitud Norte en E.U. a los 43° Latitud Sur en Argentina (Teixeira, 1987). La enfermedad de Chagas es considerada un problema prioritario de salud en el sur de Latinoamérica y el centro y sur-sureste de México, debido a la alta morbilidad y mortalidad asociada a las diferentes fases de la enfermedad. En estudios de distribución de transmisores en la República Mexicana Salazar y colaboradores (1988), reportan la presencia de 23 especies de Triatomíneos, mientras en otros estudios se han encontrado 25 especies, distribuidas en todo el territorio (Rojas y col, 1989 y Velasco, 1989). La morbilidad asociada a la tripanosomiasis americana muestra diferencias geográficas, por lo que son diversos los factores socioeconómicos que facilitan la infección humana determinada por la existencia de transmisores eficaces.

La infección puede adquirirse con mayor frecuencia a través de las heces de un artrópodo, de la familia Reduviidae, denominado "chinche hocicona" o "besucona" en México, "cuchipo" en Bolivia, "vinchuca" en Argentina y "barbeiro" en Brasil. Otros modos de transmisión son; por conducto de la leche materna (Miles, 1972), por el transplante de órganos (Figuereido y col, 1990; Aulet y col, 1991; De Faria y Alves, 1993), la transmisión transplacentaria (Bittencourt y Barbosa, 1972; Freilij y Altchen, 1995) y por falta de cuidado en el trabajo de laboratorio (Israelski y col, 1988). Actualmente la transfusión sanguínea ha incrementado su importancia como otro mecanismo de dispersión de la enfermedad (Kerndt y col, 1991).

Ciclo de vida del parásito.

Cuando la "chinche" ingiere sangre, tiende a defecar y al encontrarse infectada libera en las heces los tripomastigotes metacíclicos (transmisión posterior o estercoraria), que penetran a través de la piel del individuo, principalmente cuando ésta pierde su continuidad por el rascado. Una vez en la sangre los parásitos infectan células del huésped, sobre todo macrófagos, dentro de los cuales, se transforman en amastigotes, que se dividen por fisión binaria lisando la célula y liberando una gran cantidad de parásitos (tripomastigotes sanguíneos), quienes son capaces de infectar nuevas células o bien permanecer en la sangre. Los parásitos circulantes son absorbidos por Triatominos, transformándose en epimastigotes a nivel del intestino anterior y en tripomastigotes metacíclicos (considerada como la forma infectante), en el intestino posterior que al salir por las heces del insecto tiene la capacidad de infectar un nuevo huésped vertebrado (Figura 1).

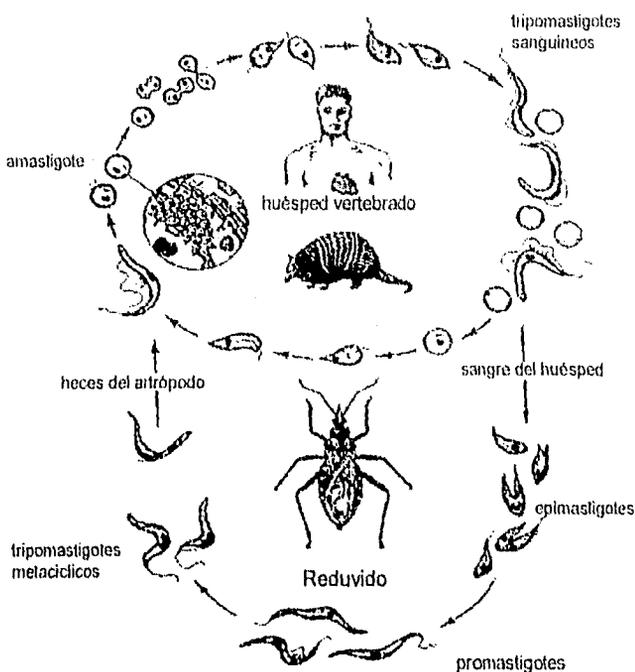
Sintomatología.

Los aspectos clínicos de la enfermedad aguda pueden estar ausentes o bien ser muy variados, por lo que se pueden confundir con los presentados en pacientes con otras parasitosis como paludismo y kala-azar (Chiller y col, 1990).

La enfermedad puede manifestarse en tres etapas; una fase aguda, una indeterminada y una crónica. La sintomatología ligada a la patogenicidad de la infección por *T. cruzi* es variable y en general la enfermedad se presenta de una manera asintomática. En etapas superagudas es posible distinguir algunos características como son, la fiebre elevada intermitente, con frecuencia se presenta miocarditis y una reacción de tipo inflamatorio dependiendo de la zona de penetración denominada signo de Chagas-Romana en la región periorbital o chagoma de inoculación en cualquier otra parte del cuerpo, o bien hepatoesplenomegalia y el crecimiento de ganglios linfáticos. En la fase indeterminada que suele durar de 10 a 20 años, la enfermedad de Chagas parece

haber desaparecido espontáneamente, para manifestarse posteriormente en el 30-40% de los casos (Macedo, 1980). La fase crónica se caracteriza por miocarditis, insuficiencia cardíaca progresiva, megas digestivos (en colon y esófago), y muerte, considerándose que todos aquellos individuos infectados con *T. cruzi* son portadores de por vida de este parásito.

Figura 1. Ciclo de vida de *T. cruzi* en la naturaleza.



T. cruzi es un protozoo parásito que infecta tanto a animales silvestres como domésticos la figura nos muestra los diferentes estadios de desarrollo del parásito y los huéspedes portadores de cada uno de ellos.

Diagnóstico: pruebas de campo y laboratorio.

La demostración de parásitos en sangre de individuos infectados con *T. cruzi*, mediante la observación directa al microscopio es un método muy usado en el diagnóstico de la fase aguda de esta enfermedad. La necesidad de analizar varias

muestras de sangre diariamente hace que esta prueba requiera de personal especializado y con experiencia, siendo prácticamente imposible detectarlos cuando se presenta la fase crónica de la enfermedad. En este caso se recurre entonces al xenodiagnóstico, que consiste en hacer que los triatomas absorban los tripomastigotes de la sangre de individuos infectados. Sin embargo, los inconvenientes de este método es que a veces es necesario usar hasta diez insectos para hacer confiable el diagnóstico por este ensayo (Hoft y col, 1979), y además solo en el 40% de los casos positivos es certero (Coura y col, 1991; Schenone 1991).

Actualmente se ha podido evaluar más ampliamente el problema de salud que representa esta enfermedad, principalmente por el surgimiento y la utilización de nuevos métodos serológicos y electrocardiográficos, que hacen relativamente sencillo el diagnóstico, en los casos crónicos. Esto ha permitido realizar un mayor número de estudios seroepidemiológicos en diversas regiones de América Latina.

Las pruebas serológicas más utilizadas en el diagnóstico de la tripanosomiasis americana crónica son: hemaglutinación indirecta (HAI), reacción de fijación de complemento (RFC), inmunofluorescencia indirecta (IFI), aglutinación directa (AD) y ELISA.

El principal antígeno utilizado en HAI, RFC y algunas variantes de ELISA es el lisado de epimastigotes de *T. cruzi* provenientes de cultivo (García y col, 1995). mientras la IFI, AD y ELISA usan tripomastigotes de cultivo libres de sangre. Con el uso de estas técnicas se han llevado a cabo diversas encuestas seroepidemiológicas en áreas endémicas de México, como los estudios realizados por Goldsmith y colaboradores en 1983 en todo el Estado de Chiapas, y aquellos de Salazar y colaboradores en 1984, en cuatro municipios del Estado de Oaxaca, en los cuales se utilizó HAI.

El establecimiento de la fase crónica en individuos con este padecimiento sugiere una inmunidad estéril. Sin embargo, la respuesta inmune-específica contra diferentes antígenos del parásito indican que los eventos tanto celulares como humorales juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Por ello, durante esta etapa se consideran buenas alternativas el uso de pruebas serológicas asociadas al electrocardiograma (Tay y col, 1987), el ecocardiograma (Aparicio y Antezana, 1983), etc. Desde luego en el diagnóstico es importante la correlación de los aspectos clínicos y epidemiológicos junto con pruebas de laboratorio. Por otro lado, la sensibilidad y la especificidad de técnicas serológicas se ven limitadas al uso de sueros convencionales, por lo que hace necesario un mejor control de antígenos y reactivos, además del establecimiento de controles de sueros negativos y positivos que sirvan de referencia.

Respuesta inmune celular.

El aspecto inmunológico de la enfermedad suele ser muy complejo, como lo demuestran los estudios llevados a cabo en los modelos animales de la enfermedad de Chagas.

Se sabe que durante la patogénesis de este padecimiento están involucrados varios tipos celulares como eosinófilos y neutrófilos, localizados en la zona de infiltración del tejido invadido por el parásito. Sin embargo, se sugiere que estas células pueden contribuir a las lesiones, ya que son observadas en grandes cantidades, en aquellos casos en que se presenta necrosis o degeneración del tejido (Molina y Kierszenbaum, 1987). Por otro lado, los mecanismos efectores de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Kierszenbaum y Ghar, 1983), fagocitosis de formas sanguíneas o de amastigotes por eosinófilos, monocitos y neutrófilos (Sanderson y Souza, 1979), están involucrados en la defensa del huésped.

Respuesta inmune humoral.

Durante la etapa aguda, el hospedero puede presentar niveles altos en anticuerpos del tipo IgM, posteriormente se incrementan en forma significativa los de la clase IgG e IgA, considerándose más importantes (Tarleton y Kuhn, 1983). Después de varias semanas o meses que dura la fase aguda, le sigue una de tipo indeterminada, denominada así debido a la ausencia de signos específicos de infección (Macedo, 1980). El individuo puede permanecer en este lapso indeterminado por años, para finalmente encontrarse en el estado crónico de la enfermedad, donde los problemas de tipo cardíaco y megaviseral son comúnmente encontrados. La predominancia de anticuerpos de la clase IgG2a en ratones durante este periodo, han sido asociados a su participación en la protección contra la infección (Araujo y col, 1984; Rowland y col, 1992).

La enfermedad de Chagas se acompaña de eventos de inmunosupresión tanto celular como humoral durante la fase aguda de la enfermedad. Observándose un fenómeno de supresión durante la etapa aguda, señalando algunos estudios que esto ocurre a nivel de la expresión del receptor de alta afinidad para interleucina-2 (Cerrone y col, 1991). Al parecer debido a una determinada subpoblación de macrófagos, que son menos activos, pero capaces de suprimir la respuesta de células activadas o sensibilizadas mediante la inhibición del mecanismo de producción de IL-2.

Otro aspecto interesante y un problema para el diagnóstico de la enfermedad es la similitud que guardan algunos antígenos del parásito con proteínas del huésped (Van Voorhis y col, 1991), induciendo procesos de autoinmunidad, así como de tolerancia (Engman y col, 1990).

Algunos antígenos específicos del parásito en las fases aguda y crónica son reconocidos por sueros de ratones infectados y por los de pacientes chagásicos. Por otro lado, en observaciones realizadas por Mikhail y Rowland en 1990, se

Respuesta inmune humoral.

Durante la etapa aguda, el hospedero puede presentar niveles altos en anticuerpos del tipo IgM, posteriormente se incrementan en forma significativa los de la clase IgG e IgA, considerándose más importantes (Tarleton y Kuhn, 1983). Después de varias semanas o meses que dura la fase aguda, le sigue una de tipo indeterminada, denominada así debido a la ausencia de signos específicos de infección (Macedo, 1980). El individuo puede permanecer en este lapso indeterminado por años, para finalmente encontrarse en el estado crónico de la enfermedad, donde los problemas de tipo cardíaco y megaviseral son comúnmente encontrados. La predominancia de anticuerpos de la clase IgG2a en ratones durante este periodo, han sido asociados a su participación en la protección contra la infección (Araujo y col, 1984; Rowland y col, 1992).

La enfermedad de Chagas se acompaña de eventos de inmunosupresión tanto celular como humoral durante la fase aguda de la enfermedad. Observándose un fenómeno de supresión durante la etapa aguda, señalando algunos estudios que esto ocurre a nivel de la expresión del receptor de alta afinidad para interleucina-2 (Cerrone y col, 1991). Al parecer debido a una determinada subpoblación de macrófagos, que son menos activos, pero capaces de suprimir la respuesta de células activadas o sensibilizadas mediante la inhibición del mecanismo de producción de IL-2.

Otro aspecto interesante y un problema para el diagnóstico de la enfermedad es la similitud que guardan algunos antígenos del parásito con proteínas del huésped (Van Voorhis y col, 1991), induciendo procesos de autoinmunidad, así como de tolerancia (Engman y col, 1990).

Algunos antígenos específicos del parásito en las fases aguda y crónica son reconocidos por sueros de ratones infectados y por los de pacientes chagásicos. Por otro lado, en observaciones realizadas por Mikhail y Rowland en 1990, se

reporta que el patrón de reconocimiento por sueros de ratones infectados, inmunizados o inmunizados-infectados varía con el curso de la infección.

Diagnóstico: actualidad.

La acción de la respuesta humoral específica durante la infección con *T. cruzi*, ha sido caracterizada parcialmente *in vitro* y dirigida contra diferentes componentes del parásito. De esta manera se ha podido evaluar el papel de estas proteínas en algunos de los eventos llevados a cabo por éste y por el huésped durante la enfermedad.

Por otro lado, ya que el ciclo de vida de *T. cruzi* consta de tres fases de desarrollo del parásito, cabe suponer que puedan existir antígenos compartidos entre ellos, así como estadio-específicos. También es conocida la diversidad antigénica que existe en este parásito (Miles y col, 1978), por lo que la caracterización de antígenos conservados favorecería un mejor entendimiento de la historia natural de esta enfermedad.

La posibilidad de un diagnóstico certero se hace factible mediante la caracterización de antígenos reconocidos durante la infección. En este sentido la identificación de componentes de *T. cruzi* se ha llevado a cabo mediante el uso de técnicas inmunolectroforéticas, usando sueros de pacientes y anticuerpos monoclonales.

En relación a la utilización de antígenos para diagnóstico, De Hubsch y colaboradores en 1988 comparó dos tipos de antígenos de *T. cruzi* por el ensayo de la ELISA de punto (DOT-ELISA). La reactividad de estas proteínas con sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas y con otras enfermedades relacionadas (como leishmaniosis) sugieren que el uso del antígeno total fijado con formalina en este ensayo es una buena alternativa para el diagnóstico.

Primavera y colaboradores en 1988, utilizando extractos de formas digestivas del parásito y comparándolos con los de epinastigotes de cultivo, lograron detectar

anticuerpos de la clase IgA en un 90% de pacientes, demostrando, que en su estudio el antígeno de amastigotes, es el más adecuado debido a los altos índices de especificidad, sensibilidad y eficiencia.

Por su parte Corral y colaboradores (1989) en ensayos de tripanosomiosis experimental en perros han identificado y purificado por métodos cromatográficos un antígeno que se encuentra en la orina de los animales infectados. Dicho antígeno se ha localizado en diferentes cepas de *T. cruzi* y es reconocido por una gran variedad de sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas en fase aguda.

El desarrollo de técnicas avanzadas en inmunología y biología molecular como son la producción de hibridomas y el avance en ingeniería genética, han sido de gran utilidad en la caracterización y purificación de proteínas de organismos parásitos. En relación a esto, la mayoría de los antígenos de *T. cruzi* aislados se han caracterizado usando anticuerpos monoclonales.

En 1991 Ouaisi y colaboradores, obtuvieron un anticuerpo monoclonal de la clase IgM contra una porción glicosilada, presente en antígenos de excreción y secreción de tripomastigotes de *T. cruzi*. Dicha porción antigénica puede ser expresada por diferentes estadios de desarrollo del parásito y la mayor reactividad con anticuerpos de la clase IgM proveniente de sueros de pacientes, sugiere que el epítopo puede ser considerado como un marcador durante la infección activa. Estos resultados son congruentes con lo reportado por Ávila y colaboradores en 1988 en sus ensayos de inhibición por azúcares a los anticuerpos dirigidos contra galactosil-alfa (1-3) galactosa, lo cual no ocurre con aquellos que llevan la conformación beta-galactosil. Del mismo modo Jazin y colaboradores en 1991, mostraron que en ratones con la enfermedad, existen antígenos de mediano (45-55 kDa) y alto peso molecular (160-170 kDa), secretados durante las diferentes fases de la infección y además son reconocidos por sueros de pacientes en fase aguda y crónica respectivamente.

Por otro lado en estudios de competencia usando anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra el componente 5 de *T. cruzi* cuya inmunogenicidad y antigenicidad se ha observado durante infecciones naturales y experimentales, demuestran la sensibilidad y especificidad de este ensayo (Cuna y col, 1989). En un estudio similar realizado por Tachibana y colaboradores en 1988, donde los resultados obtenidos en los ensayos de competencia y la inhibición positiva mostrada por los sueros de pacientes chagásicos contra el anticuerpo monoclonal TCF87, así como el registro negativo de los sueros de pacientes con leishmaniosis, sugieren que el antígeno de 25 kDa es un buen candidato a buscar en este tipo de experimentos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

En un estudio llevado a cabo por Reyes y colaboradores en 1990, se determinó la especificidad de anticuerpos de la clase IgG en recién nacidos mediante el uso de una serie de antígenos recombinantes de *T. cruzi*. La especificidad mostrada en los niños con respecto a la madre, con enfermedad crónica, fue diferente debido principalmente a un antígeno ya caracterizado y presente en la fase aguda (SAPA), lo que corrobora que los anticuerpos dirigidos contra éste se generan en los primeros días de la infección (fase aguda).

Para el diagnóstico de esta enfermedad, además del uso de anticuerpos monoclonales contra antígenos del parásito (Tachibana y col, 1991) se han utilizado la PCR para la amplificación de secuencias de DNA del parásito y su identificación mediante sondas de cDNA (Avila y col, 1991), esto ha derivado en el desarrollo de métodos más sensibles. En este sentido, los estudios llevados a cabo por Engman y colaboradores (1990), utilizando genotecas de cDNA, indican que la autotolerancia a la proteína de choque térmico de 70 kDa (hsp70) se mantiene durante la fase crónica de la infección por *T. cruzi*. Por lo que los anticuerpos contra este componente del parásito no reaccionan contra su similar de humanos.

En otros estudios, la purificación de un componente de alto peso molecular por columna de afinidad a partir de extractos de *T. cruzi*, fue expresado en una clona genómica de *Escherichia coli*. Este antígeno es expresado por todos los estadios, así como por varias cepas de *T. cruzi* y se encuentra asociado al citoesqueleto a nivel de la unión del flagelo con el cuerpo celular de este organismo y es reconocido por sueros de humanos chagásicos sin tener reacción cruzada con sueros de pacientes con infecciones por *Leishmania*, *T. rangeli* y otras parasitosis (Cotrim y col, 1990).

En años recientes se ha incrementado el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de DNAs de cinetoplastos de *T. cruzi* (kDNA). Aislados de lisados de sangre conteniendo guanidina-EDTA (método que permite su incubación a 37°C sin ser degradado), pueden ser detectados usando sondas específicas para minicírculos de kDNA (Avila y col., 1991).

En una revisión realizada por Frasch y colaboradores en 1991, se muestra una relación de antígenos relevantes de *T. cruzi*, en la que se encuentra resumido el papel de dichos componentes en la enfermedad y cuales de ellos han sido obtenidos por clonación genómica.

De acuerdo a lo anterior, la caracterización de antígenos involucrados en el desarrollo de los padecimientos producidos por parásitos tiene como objetivos fundamentales en inmunología: 1) establecer la función que desempeñan en la relación huésped-parásito, 2) medir su reactividad con sueros de pacientes (inmunodiagnóstico) y 3) determinar su importancia en ensayos de profilaxis.

Hipótesis:

Aquellos antígenos que son expresados en el transcurso de la infección por *T. cruzi*, y que sean compartidos entre los estadios del parásito, podrían ser usados en pruebas de diagnóstico de la enfermedad con mayores ventajas que los extractos totales de este organismo.

Objetivo general.

Caracterizar la respuesta inmune de tipo humoral en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos particulares.

1. Realizar cultivos de *T. cruzi* conducentes a la obtención y mantenimiento de las tres diferentes formas del parásito.
2. Obtener extractos totales de proteínas de *T. cruzi* de cada una de las formas de cultivo.
3. Comparar los patrones electroforéticos de los diferentes extractos proteicos de *T. cruzi*.
4. Caracterizar por inmunoelectrotransferencia las proteínas de los diferentes estadios del parásito que son reconocidas por sueros de ratones infectados con *T. cruzi*.
5. Obtener anticuerpos monoclonales contra componentes del parásito, y determinar su reactividad con antígenos de los tres estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*, mediante ensayos de inmunoelectrotransferencia.

METODOLOGIA.

Cultivos celulares.

T. cruzi se cultivó en células Vero, las cuales fueron mantenidas en medio DMEM (GIBCO) pH 7.2, suplementado con 10% de suero fetal bovino (HYCLONE), piruvato de sodio (GIBCO), aminoácidos no esenciales (GIBCO) y antibiótico-antimicótico (GIBCO). Los frascos de cultivo conteniendo estas células se incubaron a 37° C en una atmósfera de 5.2% CO₂, y 85% de humedad (FORMA SCIENTIFIC).

Las células de mieloma SP2/0 para la obtención de anticuerpos monoclonales se mantuvieron en medio DMEM suplementado en las mismas condiciones de cultivo ya mencionadas. Después de la fusión celular se adicionó al medio completo; hipoxantina (SIGMA), aminopterina (SIGMA) y timidina (SIGMA), como suplementos para el medio HAT; el medio HT consistió de todos los componentes excepto aminopterina, las células se incubaron bajo las mismas condiciones que las células Vero.

Para ambas líneas celulares se establecieron subcultivos cuando estos alcanzaron la fase de confluencia.

Parásitos y antígenos.

Se utilizó un aislado *T. cruzi* de *Triatoma sp* en el estado de Querétaro donado por el Dr. Jorge Tay del Departamento de Parasitología y Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Tres de sus diferentes formas se cultivaron *in vitro*, tanto en ausencia como en presencia de células, los epimastigotes se cultivaron en medio LIT como lo reporta Camargo (1964) y se subcultivaron semanalmente en botellas de 25 cm², utilizando cultivos con concentraciones de 10⁶ parásitos/ml. A partir de estos se tomó 1 ml y se colocó en una botella con 4 ml de medio fresco, los parásitos producidos semanalmente fueron recuperados por decantación y lavados mediante centrifugaciones en amortiguador fosfato salino con pH 7.2 (AFS). El botón final

se resuspendió en un amortiguador de glicina-HCl pH 2 (GH-2) y se almacenó a -20° C para usarlo en la electroforésis de proteínas.

En otros protocolos de obtención de extractos totales, la pastilla final se disolvió en AFS, Tris-HCl 10 mM con pH de 8.3, con y sin inhibidores de proteasas como: fluoruro de fenil-metil sulfonilo (PMSF); p-hidroximercuribenzoato de sodio (PHMB); leupeptina, o bien choque ácido y posterior neutralización con incubación a 37° C. Todos los extractos se almacenaron a -70° C hasta utilizarlo en el análisis electroforético de proteínas.

Por otro lado, tanto los tripomastigotes como los amastigotes se obtuvieron a partir de células Vero irradiadas e infectadas. Primeramente las células Vero se colocaron en concentraciones de 3×10^5 células en placas de cultivo de 24 pozos, de 1 cm de diámetro. Una vez que las células Vero llegaron a la confluencia, se irradiaron con una lámpara de luz ultravioleta de 30 watts a una distancia de 60 cm, durante 15 minutos. A continuación se infectaron en una relación parásitos/célula de 2:1. Los tripomastigotes se colectaron directamente del sobrenadante de estos cultivos y se separaron mediante un gradiente discontinuo de Percoll (30:60%). Se colectaron de la interfase y se lavaron tres veces con AFS por centrifugación, el sedimento final se resuspendió en GH-2. Por su parte los amastigotes se recobraron de células tripsinizadas y homogeneizadas (homogenizador de vidrio con émbolo de teflón), después de 20 golpes se separaron en un gradiente discontinuo de metrizamida 10:15 % y la interfase se lavó tres veces con AFS y se hizo pasar por un gradiente de Percoll 30:60 % (Abrahamshon y col, 1983). Los amastigotes contenidos en la interfase se lavaron tres veces con AFS mediante centrifugaciones y al final se resuspendió en una solución de GH-2. Ambos antígenos se almacenaron a -70° C hasta ser utilizados.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y colaboradores (1951).

Modelo de infección en ratón.

El mantenimiento *in vivo* del parásito se realizó mediante la infección de ratones de la cepa BALB/c de 4-6 semanas, por la inoculación intraperitoneal de 1×10^4 tripomastigotes provenientes de ratones previamente infectados. La colección de parásitos sanguíneos se realizó a los 15-18 días post-infección, mediante la extracción de 100 μ l de sangre del plexo retroorbital del ratón que se colectaron en tubos Eppendorf que contenían solución de Alsever.

Determinación de la parasitemia.

El grado de parasitemia de los animales inoculados con *T. cruzi* se determinó a lo largo de la infección, mediante enumeración directa al microscopio, en una cámara hemocitométrica. El promedio de parásitos encontrados en 5 ratones se graficó con respecto al tiempo, para establecer curvas de parasitemia.

Determinación de anticuerpos.

Se realizó en el suero de los ratones en experimentación por un ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Voller y col, 1979). Para ello se usaron pozos de microtitulación (immunolon-2 DYNATECH), los cuales se sensibilizaron con 10 μ g de antígeno de epimastigotes, tripomastigotes o amastigotes. Después de 20 horas de incubación se bloquearon con una solución de leche descremada (SVELTES) al 5% en AFS durante 1.5 h a temperatura ambiente. A continuación se lavaron tres veces durante 3 min cada una con una solución de Tween 20 (SIGMA) al 0.05% y leche descremada al 0.5 % en AFS. La incubación de sueros diluidos 1:100 en AFS se realizó durante 1 h a 37° C. Después de lavar tres veces se adicionó a los pozos un anticuerpo anti-IgG, anti-IgM, o anti-Ig totales de ratón acoplado a la enzima peroxidasa (ZYMED), diluido 1:1000 en AFS y se incubó a 37° C durante 1 hora. Finalmente se adicionó el sustrato de o-fenilendiamina diluido en amortiguador citrato-fosfato de pH 5 y la reacción se detuvo con una solución de ácido sulfúrico 2.5 N.

Este mismo procedimiento se usó cuando fue necesario probar la producción de anticuerpos anti-*T. cruzi* por los híbridos obtenidos en las diferentes fusiones celulares para la obtención de anticuerpos monoclonales. Los ensayos de especificidad de los anticuerpos, se realizaron utilizando la misma cantidad de antígeno de extractos de *E. histolytica*, *Taenia crassiceps*, *Leishmania mexicana*, *Plasmodium falciparum* y *Giardia lamblia*.

Obtención de anticuerpos monoclonales.

Ratones de 4-6 semanas de edad fueron inoculados semanalmente por vía intraperitoneal con 100 mg de extracto de epimastigotes. A la cuarta semana se inocularon por vía intravenosa y 3 días después se sacrificaron y se obtuvieron las células de bazo, que se usaron para la fusión con células de mieloma SP2/0, de acuerdo al método de Fazekas de St Groth y Scheidegger (1979). Brevemente, para la fusión celular se utilizó una relación células de bazo:células de mieloma de 10:1, las células se centrifugaron juntas en un tubo de 15 ml y se les adicionó gota a gota una solución de polietilenglicol al 50 %. Las células se lavaron en medio DMEM libre de suero y la pastilla final se colocó en medio de HAT. Después de 12 días el medio se cambió a HT y 5 días después a medio completo. Cuando las células alcanzaron la fase de confluencia se tomó el sobrenadante del pozo y se comprobó la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* por la técnica de ELISA (Voller y col, 1979). Los híbridos positivos fueron entonces clonados en agar suave como lo reporta Coffino y colaboradores (1972) y en las clonas obtenidas se determinó nuevamente la producción de anticuerpos anti-*T. cruzi*, pero utilizando anticuerpos anti-isotipo.

En otro experimento aparte se realizó una fusión con células de bazo de un ratón infectado. El órgano se extrajo al día 15 post-infección y las células linfoides se fusionaron con células de mieloma como se mencionó anteriormente. La detección de anticuerpos se realizó por el ensayo de ELISA.

Las clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-*T. cruzi* se inocularon en ratones previamente pristeinizados, para la obtención de anticuerpo por la producción de ascitis en el peritoneo de estos animales. Una vez colectado el líquido ascítico se procedió a la purificación parcial de los anticuerpos mediante la precipitación con sulfato de amonio.

Ensayos de inmunofluorescencia.

Tanto los anticuerpos monoclonales como los sueros inmunes anti-*T. cruzi* se utilizaron en ensayos de inmunofluorescencia usando parásitos en los tres estadios, siguiendo las indicaciones de Johnson y Araujo (1981). A los parásitos recuperados del cultivo y lavados como se mencionó anteriormente, se le adicionó una solución fijadora de formaldehído al 2.5% y glutaraldehído al 0.25% en AFS. Se lavaron mediante centrifugaciones a 3000 g y se incubaron con los anticuerpos diluidos en AFS durante 1 hora a 37° C. En seguida se lavaron nuevamente y se adicionó una dilución del anticuerpo de cabra anti-Ig-FITC de ratón diluido 1:100 en AFS y se incubaron por una hora más a 37° C. Finalmente, se lavaron, se colocaron en un portaobjetos y se cubrieron para ser observadas al microscopio de epifluorescencia (ZEISS).

Análisis inmunoelectroforético.

Los extractos de las diferentes formas de cultivo de *T. cruzi* se analizaron en geles de poliacrílammida al 10%, en presencia de 2% de dodecil sulfato de sodio (EGPA-DSS), de acuerdo al método de Laemli (1970). La muestra se diluyó 1:2 en amortiguador de tris (1.512 g de Trizma-base (SIGMA), 25 ml de glicerol (BAKER); 2 g de DSS (BIO-RAD), 0.002 g de pironina Y (BIO-RAD) y 5% de β -mercaptoetanol (SIGMA) con pH de 6.8) y se hirvió durante 3 min. Una vez preparada la muestra se colocó en un minigel preparativo y se aplicó una corriente de 150 volts durante 1 hora aproximadamente en una minicámara de electroforésis (BIO-RAD), después de lo cual se transfirió a papel de nitrocelulosa (BIO-RAD) en una cámara para electrotransferencia (IDEA SCIENTIFIC), durante una hora con una fuente de poder (IDEA SCIENTIFIC) a 24 volts, basándose en el

método de Towbin y colaboradores (1979). Después de bloquear el papel de nitrocelulosa con una solución de Tween 20 al 0.3% y albúmina sérica de bovino al 1% en AFS, se cortó en tiras delgadas de 3 mm aproximadamente. Las tiras de papel fueron incubadas en suero de ratones infectados a una dilución de 1:100 en AFS durante toda la noche a 4° C, se lavaron tres veces durante 10 min cada una en AFS-Tween 20 al 0.3%, se incubaron 4 hr a temperatura ambiente en una dilución de anticuerpo anti-Ig totales de ratón obtenido de cabra y acoplado a la enzima peroxidasa (ZYMED), las tiras se lavaron 3 veces como se mencionó anteriormente y se les adicionó el sustrato de o-cloro-naftol (SIGMA) (3 mg/ml en metanol), diluido en 5 ml de AFS y 2 µl de peróxido de hidrógeno al 30% (MERCK).

Por este mismo ensayo se determinó la reactividad de los anticuerpos monoclonales obtenidos en este estudio, con las diferentes formas del parásito.

Determinación de antígeno en suero de ratones BALB/c.

El monoclonal 4B10H10, se usó en un ensayo de ELISA para la determinación de antígeno de epimastigotes diluido en suero de ratones normales, así como en la determinación de antígeno en suero de ratones infectados con este parásito. Los pozos para ELISA fueron sensibilizados con gammaglobulina de conejo anti-*T. cruzi* en las mismas condiciones que se mencionaron anteriormente. Después de los lavados con AFS-Tween 20, se adicionó, con periodos de incubación de una hora, el suero de ratones infectados con *T. cruzi* o normales no infectados, a los que se les añadió antígeno de epimastigotes a diferentes concentraciones. En seguida se lavaron y se agregó el anticuerpo monoclonal, acoplado a biotina. Después de la incubación se lavaron los pozos y se colocó la streptoavidina-peroxidasa; se adicionó el sustrato de o-fenilendiamina después de los lavados correspondientes con AFS-T. La reacción coloreada se detuvo con ácido sulfúrico 2.5 N como antes y se leyó en un lector de ELISA (DYNATECH) a 490 nm.

RESULTADOS.

Los cultivos para la obtención de las diferentes formas de *T. cruzi*, permitieron producir suficientes cantidades de parásitos, para realizar los distintos ensayos llevados a cabo en este estudio. De los epimastigotes colectados semanalmente, se obtuvieron aproximadamente 2×10^7 , determinándose una concentración aproximada de proteína de 300 μg . En el caso de tripomastigotes por cada 3×10^7 , se obtuvo un rendimiento cercano a 250 μg . Por su parte de amastigotes por un número aproximado de 2×10^5 organismos se extrajeron 160 μg de proteína.

La irradiación de células Vero para apoyar el crecimiento de *T. cruzi*, representó un hecho relevante, ya que la liberación de tripomastigotes a partir de estas fue constantes en comparación con células Vero no irradiadas (Tabla 1, Fig. 2). La presencia de tripomastigotes en el medio, libre de células, permitió que la eficiencia de recuperación alcanzara niveles cercanos al 95%, ya que los parásitos pudieron ser colectados por decantación del medio de cultivo con un mínimo de contaminantes. Por el contrario, la infección en células Vero no tratadas, se caracterizó por un aumento en las células presentes en el sobrenadante de cultivo, efecto causado por el desprendimiento de éstas desde el fondo de la botella. Además el número de parásitos intracelulares en las células irradiadas fue mayor que en las no irradiadas (Fig. 3A y 3B).

El uso de gradientes para la obtención de tripomastigotes y amastigotes a partir de los cultivos de células Vero irradiadas fue eficiente, en cuanto al número de estos, en todos los casos la pureza se estableció en un 95%. Variando la eficiencia de obtención entre 75 y 95%, debido a la gran cantidad de centrifugaciones que se llevan a cabo durante este método, para cada una de las diferentes formas de cultivo.

tiempo (H)	No. de tripomastigotes de células irradiadas ($\times 10^5$)	No. de células irradiadas ($\times 10^5$)	No. de tripomastigotes de células no irradiadas ($\times 10^5$)	No. de células no irradiadas ($\times 10^5$)
0	6	3	6	3
1	4.5	2.7	6.06	1.82
2	4.3	2.14	5.4	1.52
15	4.68	2	3.34	1.0
16	4	2.74	3.4	2
60	2.68	0.9	0.82	2.6
90	0.12	0.2	0.08	6.2
120	7.26	2	7.6	4
148	8	1.46	0.88	1.76
172	4	1.74		
188	5.2	2.1		
208	7.6	3.4		

Tabla 1. Liberación de tripomastigotes por células Vero. Monocapas de células Vero se infectaron con tripomastigotes sanguíneos provenientes de un ratón BALB/c previamente infectado con *T. cruzi*. Los parásitos se extrajeron a los 15 días post-infección y se colocaron en una proporción tripomastigotes:células de 2:1.

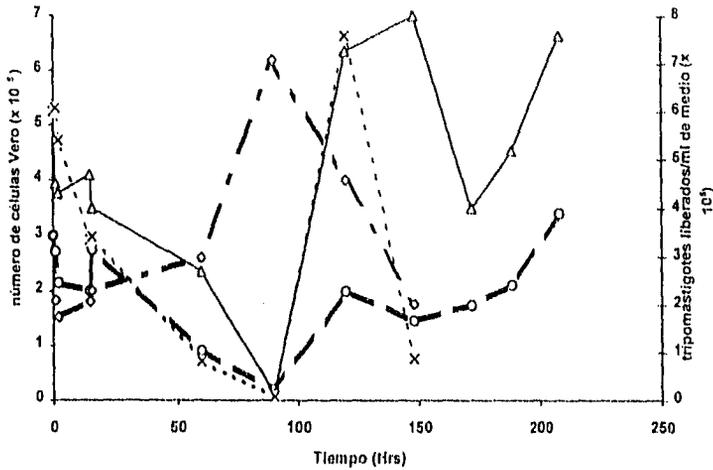


Figura 2. Curvas de crecimiento de células Vero irradiadas (-O-) y no irradiadas (O), infectadas con tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* de la cepa Querétaro. La producción de tripomastigotes en las células irradiadas (Δ), fue mayor que en las no irradiadas (\times).



Figura 3. Microfotografía electrónica de células Vero infectadas con los tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Querétaro. Los cultivos se mantuvieron como se menciona en material y métodos. A) células Vero irradiadas; B) células Vero control, no irradiadas.

Con los parásitos provenientes de los diferentes cultivos se realizó la extracción de antígeno total de las diferentes formas, los cuales al someterse a EGPA-DSS, mostraron la eficacia del "choque ácido". Al comparar el uso de GH-2 con otros protocolos para la preparación de extractos totales, se observó que éste y el tratamiento con inhibidores de proteasas, son los mejores métodos para la obtención de antígenos estables. Esto se comprobó por la evidente desnaturalización principalmente de los componentes de alto peso molecular en el patrón electroforético de los otros tratamientos (figura 4). En consecuencia, en este reporte se usaron extractos preparados por tratamiento con choque ácido.

Por otro lado, el análisis por EGPA-DSS de proteínas totales de los tres estadios de *T. cruzi* mostró una gran complejidad en su contenido (Fig. 5). Al comparar el perfil electroforético de los tres extractos se observaron diferencias, tanto cuantitativas como cualitativas. No obstante, un componente con un peso molecular de aproximadamente 56 kDa teñido de manera mayoritaria por azul de Coomassie, fue detectado en las tres formas. Se determinaron aproximadamente 59 proteínas en amastigotes (Qa) y 49 en tripomastigotes provenientes de células

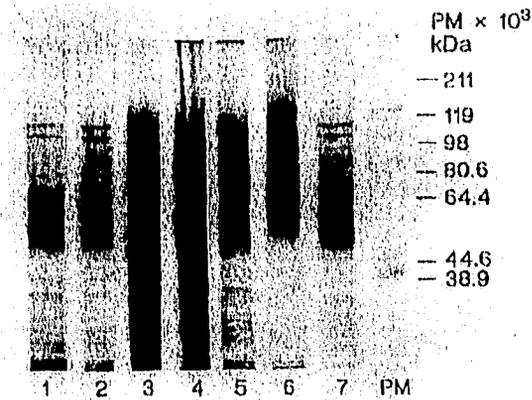


Figura 4. Métodos de extracción de antígenos totales de epimastigotes de *T. cruzi* mantenidos en cultivo. Para su obtención se utilizaron diferentes protocolos. 1) Solo AFS; 2) Solo Tris-HCl 0.1 M pH 8.3; 3) Igual que 2 pero con leupeptina como inhibidor de proteasas; 4) Igual que 3 pero además de leupeptina, PMSF y PHMB como inhibidores de proteasas; 5) Choque ácido con GH-2, neutralización a 37° y adición de inhibidores de proteasas; 6) Igual que el anterior, pero sin inhibidores de proteasas; 7) Choque ácido y neutralización solo inmediatamente antes de procesar la muestra, para colocarla en el gel de poliacrilamida al 10%. En los carriles del 1 al 7 colocó 10 µg de proteína en cada uno; PM) marcadores de peso molecular (los pesos moleculares aparecen en la parte derecha de la figura).

Vero infectadas (Qt), mientras en epimastigotes mantenidos en medio de cultivo LIT se contaron 59 componentes aproximadamente (Qe'). Los antígenos de las tres formas se encontraron comprendidos en un rango de peso molecular de 15 a 260 kDa, siendo más evidente la tinción de proteínas de mediano peso molecular (35-80 kDa).

En el mismo gel se analizaron extractos de epimastigotes del mismo aislado, además de un extracto de la cepa Ninoa, ambos obtenidos por sonicación y mediante el uso de Tritón X100. Las diferencias mostradas entre estos extractos y los obtenidos por GH-2 son notorias, principalmente en las proteínas de alto y mediano peso molecular (Fig. 5). Entre las más evidentes se encuentran la ausencia del componente mayoritario en los sonicados de los extractos y la

presencia de dobletes y tripletes en el patrón electroforético de la extracción con GH-2.

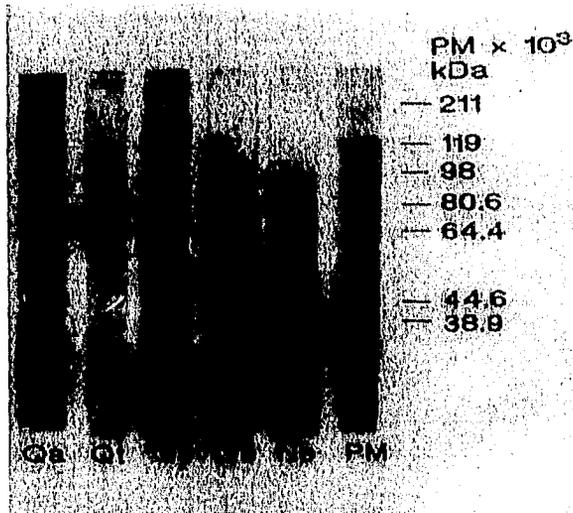


Figura 5. Comparación de los patrones electroforéticos de extractos de diferentes formas y cepas de *T. cruzi*. La migración en geles de poliacrilamida al 10 % de extractos de: Qa) amastigotes; Qt) tripomastigotes y Qe') epimastigotes de *T. cruzi* del aislado Querétaro obtenidos por ciclos de congelación-descongelación. Qe) epimastigotes del aislado Querétaro y Ne) epimastigotes de la cepa Ninoa obtenidos por sonicación. La cantidad de proteína por carril fue de 10 μ g. Los controles de peso molecular aparecen a la derecha de la figura (PM).

Los tripomastigotes de *T. cruzi*, recuperados a partir de la sangre de ratones infectados como se mencionó anteriormente, alcanzaron cantidades de aproximadamente 2×10^6 /ml de sangre. Con estos tripomastigotes, se infectaron ratones de la cepa BALB/c y se midieron los títulos de inmunoglobulinas (totales, IgM e IgG), usando el extracto de epimastigotes de cultivo como antígeno en el ensayo de ELISA, los resultados se resumen en la **Tabla 2**.

Durante la infección, los títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi*, siguen una tendencia similar, donde se mantienen estacionados los niveles hasta los primeros 10 días

post-infección. Después de este tiempo, se presenta una elevación ligera en el caso de la IgM y rápida en la IgG. A partir de este momento el aumento de anticuerpos en el suero de ratones infectados continua hasta la muerte de los mismos, lo cual ocurre entre los días 34 a 37 (Fig. 6).

Día de Infección	Número de tripomastigotes (x10 ⁴)	IgM	IgG
3	21875	0.2256	0.015
6	500000	0.2774	0.029
10	1280000	0.2528	0.018
14	2420000	0.313	0.031
20	1709601	0.5842	0.118
24	538462	0.8238	0.147
27	391421	0.8014	0.136
34	321878	1.2628	0.212

Tabla 2. Infección por tripomastigotes de *T. cruzi*, aislado Querétaro. 5 ratones de la cepa BALB/c fueron inoculados con 10⁴ tripomastigotes sanguíneos. Los animales se sangraron a diferentes tiempos y cada suero fue analizado para conocer los títulos de anticuerpos por el ensayo de ELISA. Los datos resumen el promedio de los 5 sueros ensayados.

Al relacionar la respuesta humoral con el grado de parasitemia en los ratones infectados, se observó que los primeros días de la infección, se caracterizaron por un aumento rápido en el número de formas circulantes en la sangre de estos animales. Después de aproximadamente 15 días se presenta una disminución en el número de parásitos, lo cual coincide con un aumento de anticuerpos anti-*T. cruzi*, esta disminución en la cantidad de parásitos en la sangre de ratones infectados se mantiene hasta el final de la infección sin llegar a desaparecer del todo (Fig. 6).

A diferencia de lo anterior, cuando se utilizan tripomastigotes provenientes de células Vero irradiadas, se presenta un aumento manifestado en el número de formas circulantes, por lo que el grado de parasitemia provoca la muerte del ratón

entre los días 18 a 25 (Tabla 3 y Fig. 7). Asimismo no se observa una disminución en el número de parásitos mientras, los ratones se mantienen vivos. Aunque los títulos de anticuerpos no se midieron durante este experimento.

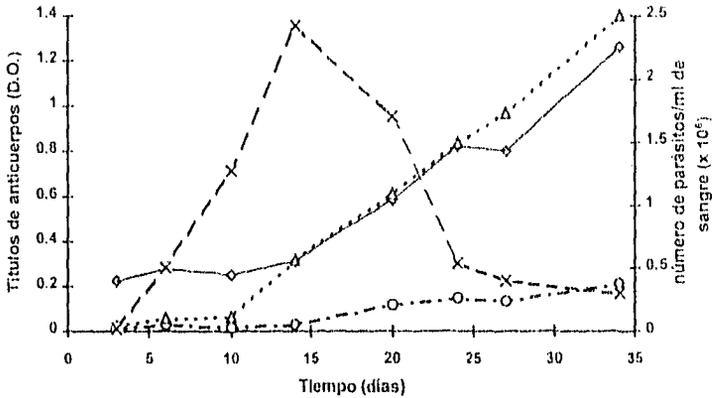


Figura 6. Curvas de títulos de Inmunoglobulinas totales (○); IgM (◇) e IgG (△), medidas por ELISA a diferentes tiempos de la infección con *T. cruzi*. Curva de parasitemia establecida, a partir de los valores promedio de tripomastigotes en sangre de 5 ratones infectados (×).

0	0
4	0.012
8	0.097
12	1.051
17	2.922

Tabla 3. Infección de ratones BALB/c con tripomastigotes de *T. cruzi* provenientes de células Vero.

La reactividad de los sueros de 5 ratones infectados con los antígenos de *T. cruzi* ensayados por inmunoelectrotransferencia fue similar a lo largo de la infección, por lo que en las figuras BA-C, se observa la cinética de reconocimiento del mismo ratón durante todo el experimento. Los patrones de reactividad,

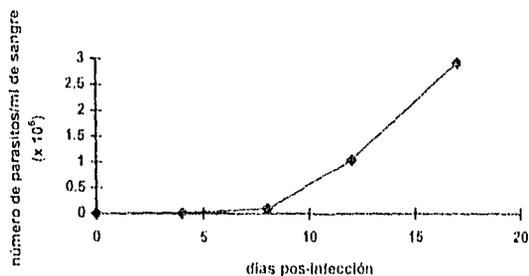


Figura 7. 5 ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 10^4 tripomastigotes, provenientes de células Vero irradiadas e infectadas. Cada punto representa el promedio del número de parásitos observados en la sangre, los ratones empezaron a morir a partir del día 12.

patrón de reconocimiento de componentes entre los diferentes estadios del parásito es heterogéneo. No obstante, el aumento en el número de constituyentes reconocidos en los tres extractos ocurrió al día 18, ocho días después del incremento en los títulos de anticuerpos. Un hecho relevante es que el reconocimiento de proteínas en el extracto de epimastigotes es sumamente complejo desde los primeros días de la infección (**Fig. 8A**). También se observan que en los últimos días los anticuerpos en el suero tienen una gran reactividad con componentes presentes en la región de alto peso molecular tanto en el extracto de tripomastigotes (**Fig. 8B**), como en el de amastigotes (**Fig. 8C**).

De acuerdo a los patrones de reconocimiento obtenidos a lo largo de la infección, los antígenos detectados por anticuerpos de ratones infectados se agruparon en nueve clases (**Tabla 4**).

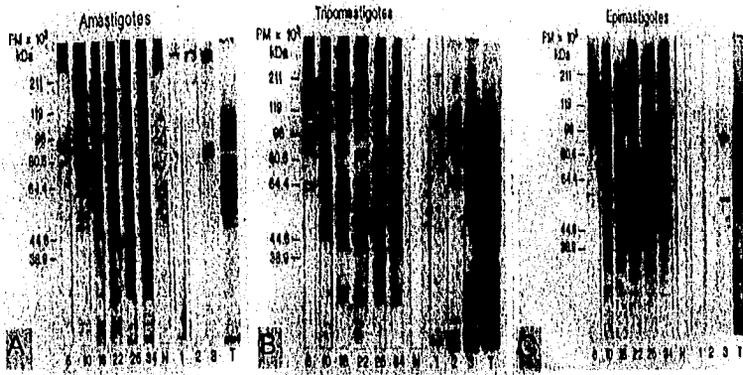


Figura 8. Reactividad de sueros de ratones infectados con la copa Querétaro de *T. cruzi*. Las proteínas de tres estadios de *T. cruzi* fueron transferidas a papel de nitrocelulosa después de su electroforésis. Cada tira de papel de nitrocelulosa se incubó con el suero del mismo ratón obtenido a diferentes tiempos diluido 1:100. La reactividad del suero con antígenos de amastigotes (A), tripomastigotes (B) y epimastigotes (C), se acentuó con la adición de un anti-Ig total de ratón producido en cabra y marcado con la enzima peroxidasa. La reacción enzimática se reveló con O-cloro-naftol como se menciona en material y métodos. Los números muestran la reacción de 3 diferentes anticuerpos monoclonales contra los extractos de *T. cruzi* (1) 2B10; (2) 4B10H7 y (3) 4B10H10. T es el extracto total transferido a papel de nitrocelulosa. A la izquierda de la figura se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

De esta manera podemos observar que el antígeno de 226.2 kDa fue el único reconocido en los tres estadios de *T. cruzi* durante toda la infección, exceptuando al día 18 en el extracto de epimastigotes, donde no aparece (Grupo I).

En este estudio los sueros de ratones infectados con *T. cruzi*, reconocieron a lo largo de la infección catorce proteínas estadio-específicas (Grupo II), cuatro de ellas de 233.6, 191.3, 182.5 y 63.3 kDa aproximadamente se detectaron en el extracto de amastigotes. En el de tripomastigotes se observaron cinco antígenos de 173.6, 162.3, 81.1, 58.4 y 30.1 kDa de peso molecular aproximadamente. En el extracto de epimastigotes se encontraron cinco de 131, 122.7, 37.4, 30.6 y 23.9 kDa aproximadamente.

De las 109, treinta y ocho proteínas fueron reconocidas un solo día, de las cuales trece correspondieron al extracto de amastigotes, ocho al de tripomastigotes y

diecisiete al de epimastigotes con pesos moleculares y días variables (**Grupo III**). de igual modo se encontraron 9 antígenos compartidos, reconocidos un solo día en dos o tres extractos (**Grupo VII**). Además otras proteínas fueron reconocidas al día 6, cuatro de epimastigotes con pesos de 165.2, 152, 124.7 y 38.6 kDa; una de amastigotes de 19.3 kDa y una de tripomastigotes de 133.3 kDa (**Grupo V**).

Otras diez solo fueron detectadas al día 34 post-infección: cinco de epimastigotes con pesos de 176.4, 144.7, 36.7, 35 y 26.9 kDa y seis de amastigotes 59.4, 51.1, 42, 39.2 y 28.2 kDa (**Grupo VI**).

El **Grupo IV**, se caracterizó por proteínas de diferentes pesos moleculares reconocidas intermitentemente, es decir, aparecieron en el patrón de reconocimiento para luego desaparecer y en días posteriores reaparecer nuevamente. Tal es el caso de las de 204.6, 48.8 y 18.6 kDa en el extracto de amastigotes; 147.3 y 107.5 en el de tripomastigotes y las de 188.4, 159.7, 140, 111.1, 52, 40.6, y 32.7 kDa en el caso del extracto de epimastigotes. También con intermitencia en cuanto al reconocimiento se encontraron diez y ocho componentes, que se compartieron entre dos o los tres extractos; de estos, seis se compartieron entre los tres estadios con pesos de 97.3, 91.2, 88.1, 85.2, 41.3 y 22.1 kDa; tres entre amastigotes y epimastigotes con pesos de 94.2, 70 y 28.6 kDa; cuatro entre amastigotes y tripomastigotes de 92.6, 50.2, 47.1 y 17.5 kDa y cuatro entre tripomastigotes y epimastigotes de 194.7, 126.7, 118.8 y 73.6 kDa (**Grupo VIII**).

Finalmente 14 antígenos, se reconocieron de uno a más días, sin intermitencia y se compartieron entre estadios del parásito: cuatro de estos de peso molecular intermedio (77.4, 57.3, 46.3 y 40 kDa), fueron reconocidos en los tres extractos; tres entre amastigotes y epimastigotes de 114.8, 42.6 y 33.9 kDa, una sola entre amastigotes y tripomastigotes de 24.3 kDa y seis entre tripomastigotes y epimastigotes con pesos de 135.6, 100.6, 72.3, 67.8, 53.7 y 23.5 kDa (**Grupo IX**).

P. M.	A	T	E	días	G	P. M.	A	T	E	Días*	G	P. M.	A	T	E	Días*	G
233.6	+			6-34	II	94.2	+	+		6,18,34	VIII	46.3	+	+		10,22,34	IX
226.2	+	+	+	6-34	I	92.6	+	+		25,10,22	VIII	45.6			+	25	III
208.3				d 10	III	91.2	+	+	+	6,10,18,25,34	VIII	44	+		+	34	VII
204.6			+	6,10,22,34	IV	89.6	+			22	III	42.6	+			18,22	IX
194.7		+	+	6,10,22,34	VIII	88.1	+	+	+	6,10,34	VIII	42	+			34	VI
191.3	+			6-34	II	85.2	+	+	+	6,10,18,34	VIII	41.9			+	10	III
188.4			+	10,22,34	IV	84	+			22	III	41.3	+	+		6,10,25,34	VIII
182.5	+			6-34	II	82.5	+			18	III	40.6			+	10,22,34	IV
176.4			+	34	VI	81.1			+	6,25	II	40	+	+	+	6,10,18	IX
173.6		+		6-34	II	80	+		+	10,34	VII	39.2	+			34	VI
165.2			+	6	V	78.5				10	III	38.6			+	6	V
162.3	+			10,34	II	77.4	+	+	+	6,10,25	IX	38			+	10	III
159.7			+	10,22,34	IV	74.7	+			10	III	37.4			+	25,34	II
154.6				10	III	73.6	+	+		6,10,34	VIII	36.7	+		+	34	VI
152			+	6	V	72.3	+	+		22,25	IX	36.1			+	10	III
149.5	+	+		18,6	VII	70	+	+	+	6,10,18,22,34	VIII	35			+	34	VI
147.3	+			6,10,22,25	IV	68.8	+			10	III	33.9	+			6,10,22,34	IX
144.7			+	34	VI	67.8	+		+	6,18,34	IX	32.7			+	18,34	IV
142.3			+	22	III	65.5			+	25	III	30.6			+	10,34	II
140			+	18,25,34	IV	64.6	+			18	III	30.1	+		+	25,34	II
137.6	+			10	III	63.3	+			22,34	II	29.7	+		+	25,6	VII
135.6	+	+		6,10,22	IX	62.3			+	25	III	28.6	+		+	10,22,25,34	VIII
133.3	+			6	V	61.3	+	+	+	6,10,18,34	VIII	28.2	+			34	VI
131			+	6-34	II	60.3	+	+		18,22	VII	27.7	+			10	III
126.7	+	+		18,22,34	VIII	59.4	+			34	VI	26.9			+	34	VI
124.7			+	6	V	58.4	+			6,10	II	26	+			10	III
122.7			+	10-34	II	57.3	+	+	+	10,18,22,34	IX	25	+			18	III
120.6	+			10	III	55.5	+	+	+	18,6	VII	24.3	+	+		22,34	IX
118.8		+	+	6,18	VIII	53.7			+	10,22,25	IX	23.9			+	10,18	II
114.8	+		+	10,34	IX	52.8			+	10	III	23.5	+		+	10,22,25	IX
111.1			+	10,22,34	IV	52			+	6,10,22,25	IV	22.8	+		+	18,6	VII
109.1		+	+	22,6	VII	51.1	+			34	VI	22.1	+	+	+	10,22,18,25,34	VIII
107.5	+			18,25,34	IV	50.2	+	+		6,18,25,34	VIII	19.3	+			6	V
104.1	+	+	+	10	VII	49.5	+			18	III	18.6	+			6,34	IV
100.6	+	+		6,34	IX	48.6	+			10,22	IV	17.5	+	+		6,10,18,25,34	VIII
99			+	18	III	47.1	+	+		6,10,18,25,34	VIII	17.2	+			22	III
97.3	+	+	+	6,10,34	VIII												

Tabla 4. Reconocimiento de antígenos de *T. cruzi* por sueros de ratones infectados.
G. Grupo

- I. Compartido por los tres estadios a lo largo de la infección.
- II. Proteínas estadio específicas.
- III. Proteínas reconocidas un solo día en el curso de la infección.
- IV. Proteínas reconocidas de manera intermitente en el curso de la infección.
- V. Proteínas reconocidas solamente al inicio de la infección (primer día).
- VI. Proteínas reconocidas al final del curso de la infección (último día).
- VII. Proteínas compartidas entre estadios pero reconocidas en un solo día.
- VIII. Proteínas compartidas entre estadios pero de reconocimiento intermitente.
- IX. Proteínas compartidas entre estadios pero de reconocimiento de 1 a más días sin intermitencia.

A. Amastigotes E. Epmastigotes T. Tripomastigotes

*. Días a los cuales se reconocen

Sorprendentemente se observó reactividad en un número importante de antígenos en el extracto de epimastigotes, desde el día 6 y aumentó a lo largo de la infección.

Por otra parte, para la obtención de anticuerpos monoclonales se realizaron una serie de fusiones celulares, en las cuales se usaron diferentes protocolos. En una de ellas, se usaron células linfoides de ratones inmunizados con el extracto de epimastigotes del aislado Querétaro, obteniéndose 8 híbridos (Tabla 5). En otra, se usaron células de bazo de ratones infectados durante 15 días. Los híbridos productores de anticuerpo anti-*T. cruzi*, reconocieron de manera diferencial a antígenos de las 3 formas de cultivo del parásito por el ensayo de ELISA (Tabla 6). De la misma manera que en el ensayo de inmunoelectrotransferencia, algunos híbridos reaccionaron con el extracto de epimastigotes con lecturas altas. En ambos protocolos la especificidad de los anticuerpos fue determinada mediante el uso de extractos de diferentes organismos (material y métodos), dando lecturas máximas de 0.1 de densidad óptica (D.O.).

1G11	1.111
4F10	1.608
4G6	1.128
6F11	0.475
6B10	0.533
6E6	0.579
6E9	0.550
6F3	1.628
6F9	0.402

TABLA 5. Híbridos productores de anticuerpos contra epimastigotes de *T. cruzi*. Los pozos para el ensayo de ELISA se recubrieron con 10 µg de antígeno total de epimastigotes.

El resto de las células se utilizaron en la técnica de clonación, para obtener líneas celulares puras. Los resultados de la clonación de híbridos se resumen en la Tabla 7, donde se observa la obtención de 5 anticuerpos monoclonales, los cuales reaccionaron con el extracto total de epimastigotes por los ensayos de

ELISA y solo algunos por inmunofluorescencia con epimastigotes de *T. cruzi* provenientes de medio de cultivo LIT. Cuando se determinó el tipo de anticuerpo producido 2 resultaron ser IgM, 2 IgG1 y un IgG2a (TABLA 7).

RAI	0.876	1.560	0.638
RAI-2	0.628	0.890	0.621
RAI-3	0.654	0.965	0.578
RAI-4	0.543	0.134	0.348
RAI-5	0.879	0.102	0.789
RAI-6	0.846	0.980	0.765
RAI-7	0.245	0.546	0.467
RAI-8	0.407	0.376	0.867

TABLA 6. Híbridos productores de anticuerpos anti-*T. cruzi*. La Fusión celular se realizó utilizando un bazo de un ratón de la cepa BALB/c infectado durante 15 días.

CLONA	CLASE	ELISA	FLUORESCENCIA
	IgG1	0.750	++
	IgG2a	1.381	-
	IgG1	0.650	-
	IgM	2.1	+++
	IgM	2.5	+++

TABLA 7. Obtención de anticuerpos monoclonales contra *T. cruzi*.
 (1) Clonas obtenidas con células de bazo obtenidas de ratón BALB/c 15 días después de ser infectado con tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*.
 (2) Clonas obtenidas con células de bazo de ratón inmunizado con antígeno de epimastigotes de *T. cruzi* durante 4 semanas.

Los resultados del ensayo de inmunofluorescencia usando formas tanto sanguíneas como de cultivo muestran que el anticuerpo monoclonal 4B10H7 reaccionó con tripomastigotes sanguíneos y epimastigotes de cultivo, pero no con tripomastigotes liberados por células Vero. La clona 4B10H10 por su parte reconoció componentes de las tres formas utilizadas. Por su parte el monoclonal 2B10.1, reaccionó únicamente con tripomastigotes, tanto sanguíneos como de cultivo (figura 9 b-d). Mientras tanto el anticuerpo 3F5 y el 4B2.4 no reaccionan con los parásitos usados en este ensayo.

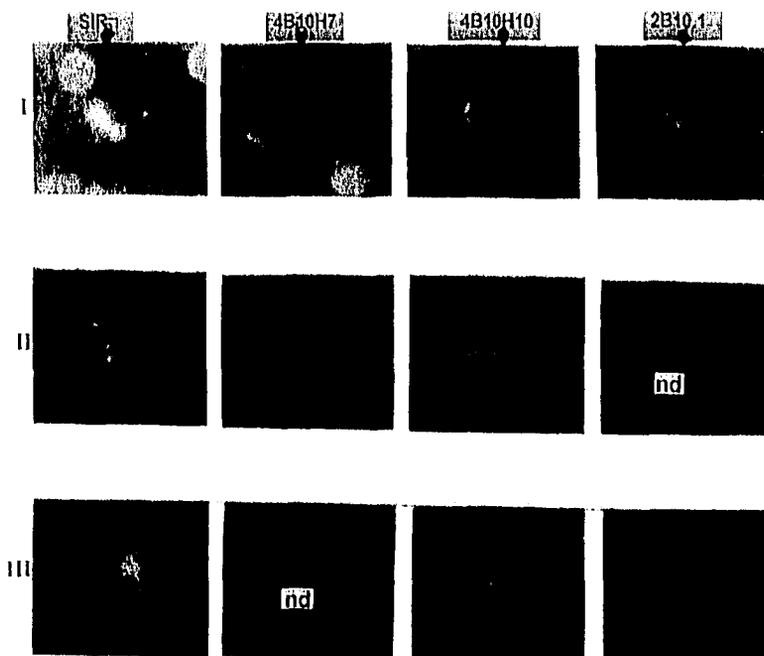


Figura 9. Ensayo de inmunofluorescencia usando suero inmune de ratón (SIR) y anticuerpos monoclonales anti-*T. cruzi* obtenidos en este estudio. La reactividad mostrada en I) tripomastigotes sanguíneos; II) epimastigotes cultivados en medio LIT y III) tripomastigotes liberados por células Vero irradiadas e infectadas. nd significa que no se detectó reacción por parte de los anticuerpos con las formas mencionadas.

Los anticuerpos de la serie 4B10 y 2B10.1 fueron producidos *in vivo* y los anticuerpos precipitados con sulfato de amonio, que se utilizaron en los diferentes ensayos. Estos tres anticuerpos también reaccionaron con antígenos del parásito por el ensayo de inmunoelectrotransferencia. El anticuerpo 2B10.1 reaccionó débilmente con componentes de amastigotes y epimastigotes, mientras que en el de tripomastigotes lo hizo con mayor intensidad con un doblete de 176.4-191.3 kDa. El anticuerpo 4B10H7 reaccionó con una proteína de 25 kDa y ligeramente con otra de 60 kDa aproximadamente. Mientras el anticuerpo monoclonal 4B10H10 reaccionó con un posible doblete de aproximadamente 50 kDa, que se

encuentra presente en los tres extractos (Tabla 8; Figura 8). Los anticuerpos 3F5 y 4B2.4 fueron utilizados en este ensayo, pero no se detectaron algún componentes en los estadios utilizados en esta técnica.

Anticuerpo	Isotipo	Amatillo (K99)	Albomiellos (K99)	Galnaldro (K99)
2B10.1	IgG1	196.8, 135.6, 126.7, 104.1, 59.4	191.3, 176.4	208.3, 204.6, 136.6
4B10H7	IgM	191.3, 135.6, 124.7	126.8, 118.7	135.6, 124.7
4B10H10	IgM	135.6, 104.1	126.8, 118.7, 104.1	165.1, 159.7, 135.6, 104.1, 100.6, 97.3, 94.2

Tabla 8. Reconocimiento de antígenos de *T. cruzi* por anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se hicieron reaccionar con antígenos de los diferentes extractos transferidos a papel de nitrocelulosa. Como segundo anticuerpo se usó un anti-isotipo de ratón producido en cabra y acoplado a la enzima Peroxidasa. La reacción se reveló con orto-cloro-naftol.

El anticuerpo 4B10H10 fue utilizado en un experimento de detección de antígeno en suero de ratón tanto normal como infectado, en una prueba de ELISA de doble anticuerpo. En este se obtuvo una sensibilidad de hasta 0.1 µg de antígeno disuelto en suero normal como de antígeno circulante en el suero de ratón infectado (tabla 9).

µg de antígeno	Lectura (D.O.)*
50	> 2.5
10	2.1
1	1.9
0.1	0.85
0	0.4

Tabla 9. Determinación de antígeno de *Trypanosoma cruzi* en suero de ratón de la cepa BALB/c.

* Promedio de 4 ensayos leído a 490 nm.

DISCUSION.

La caracterización de antígenos que juegan un papel importante en el establecimiento, el curso y la resolución de las enfermedades infecciosas, trae como consecuencia un gran avance en el conocimiento de la relación huésped-parásito y un mejor entendimiento de los padecimientos producidos por los diversos organismos. Un primer paso para lograr esto, es contar con el agente patógeno en cantidades adecuadas, para lo cual la mayoría de las veces es necesario acceder a su cultivo en el laboratorio.

El mantenimiento de las diferentes formas de *T. cruzi*, ya sea libre de células (Camargo, 1964; Pan, 1978) o en ellas (Sanderson y col, 1980; Hudson y col, 1984), ha sido de gran utilidad en la obtención de mayores cantidades de antígeno. Los cultivos de células Vero infectadas por *T. cruzi*, han sido utilizados en numerosos reportes, sin embargo, son diversos los problemas para la conservación de las características iniciales de los cultivos (Ashraf y Kuhn, 1992). En este estudio se logró establecer el mantenimiento de una infección cíclica de células Vero por *T. cruzi*, obteniéndose tanto tripomastigotes infectivos como amastigotes intracelulares. Además de poder mantener las células infectadas durante largos periodos, cuando los cultivos alcanzaron una fase de confluencia fue posible criopreservarlos, permaneciendo infectados después de su recuperación al medio de cultivo. No obstante, que la obtención de formas intracelulares de *T. cruzi*, a partir de células, sometidas a radiación gamma ha sido reportada (Schmalz y Murray en 1982), estos autores no hacen mención a la posibilidad de criopreservación, o bien, que los tripomastigotes mantuviesen su capacidad de infección después de ser recobrados del nitrógeno líquido. Tampoco se hablaba de la liberación continua de tripomastigotes y el cultivo continuo que se logra al someter a las células huésped a radiación por luz ultravioleta. Por otra parte al igual que los tripomastigotes obtenidos por estos autores, también los producidos en este estudio, fueron capaces de mantener su infectividad *in vivo*, así como la multiplicación de amastigotes dentro de las células huésped.

Contrariamente a lo observado por Piras y colaboradores en 1982 y Urdaneta-Morales en 1983, donde el co-cultivo de tripomastigotes con células Vero mengua la virulencia en el desafío a ratones, nuestros datos muestran que los parásitos liberados por células Vero no disminuyen su capacidad infectiva. Sin embargo en este tipo de estudios, todavía queda por determinar en detalle las características fisiológicas de estas formas parasitarias. En este sentido Contreras y colaboradores en 1994, señalan que el mejor método para el mantenimiento de cepas de *T. cruzi* es el pase a través del insecto vector (*Triatoma-Triatoma*).

La relativa facilidad para la obtención de parásitos a partir de cultivos de células de mamífero *in vitro*, se ha visto favorecida por los diferentes métodos de separación. La utilización de gradientes de Percoll para el aislamiento de los diferentes estadios de desarrollo de *T. cruzi* (Caviedes y col, 1994), es hasta el momento un método sencillo y seguro de obtener formas del parásito a diferencia de la columna de DEAE celulosa, donde no queda claro como decrece la infectividad de los tripomastigotes separados por este medio (Sanderson y col, 1980).

Una vez que se cuenta con los parásitos aislados, otro aspecto importante en la caracterización de antígenos, es la obtención de patrones electroforéticos reproducibles de los extractos antigénicos, por lo que es necesario cuidar la degradación proteica que ocurre al romper al organismo, para la posterior extracción de los antígenos. En un estudio de antígenos de *Trypanosoma cruzi* realizado por Shechter y Nogueira en 1988, se menciona que los métodos utilizados en la extracción de proteínas, influye de manera directa en la migración electroforética. Esto fue observado también por nosotros cuando se compararon los patrones electroforéticos obtenidos por ciclos de congelación-descongelación contra aquellos que fueron sonicados.

Resultados obtenidos con anterioridad, por nuestro grupo (Portnoy y col, 1990), proponen que el uso de lo que hemos denominado choque ácido, evita la

degradación temprana del antígeno de *Entamoeba histolytica*. Estos extractos pueden ser mantenidos hasta 6 meses a -70° sin que existan efectos drásticos sobre las proteínas, sin embargo este método pierde su eficiencia conforme pasa el tiempo al neutralizar el antígeno de epimastigotes de *T. cruzi*. El presente trabajo demuestra, que manteniendo el antígeno con el choque ácido almacenado aun a -20° C y neutralizándolo solo al momento de realizar la electroforesis, se puede evitar la degradación proteica durante más de 6 meses. Comparando este procedimiento con otros para la extracción de antígenos totales, se observó que las proteínas mantienen un patrón de migración constante a través del tiempo.

Contando con la producción de parásitos y la metodología para la extracción de antígenos se hace necesario inducir la infección en el modelo murino con la finalidad de caracterizar la respuesta del huésped al padecimiento. Durante la infección de ratones se observó que el número máximo de parásitos en sangre ocurre al día 15, para después disminuir hasta que ocurre la muerte de los animales, correlacionándose con el aumento en los títulos de inmunoglobulinas. Este patrón de aumento en el número de parásitos varía de acuerdo a la cepa de *T. cruzi* usada, ya que en otros resultados hemos evaluado la infección con la cepa Ninoa, y la mortalidad en los es muy baja (datos no mostrados). Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos por Hoft y colaboradores en 1993, quienes usando la misma cepa de ratón, demuestran que el grado y la evolución de la infección dependen de la cepa usada de *T. cruzi*. La tendencia de la curva de parasitemia está en concordancia con lo observado por Grögl y Kuhn en 1985, para ratones resistentes, variando únicamente en el tiempo de duración de la infección y la mortalidad. Estos autores muestran resultados de la correlación directa de la producción de anticuerpos, que aumentan conforme aumenta el número de parásitos en sangre, para posteriormente disminuir ambos factores en forma paralela. A diferencia de lo anterior en nuestro estudio, los anticuerpos se mantienen en cantidades basales y los parásitos pueden multiplicarse hasta que

ocurre un aumento en los niveles de anticuerpo lo que parece inducir a un cambio en la localización del parásito, más bien que su eliminación, reflejado en una mortalidad del 100%, por lo que es un punto interesante en la infección con *T. cruzi*. Esto sugiere, que después de pasar por una etapa aguda, la infección parece evolucionar hacia la cronicidad, pero la muerte de los ratones sobreviene como consecuencia de la parasitemia establecida en los primeros días. No obstante, es necesario tener en cuenta que otros factores podrían afectar el curso de la infección, como puede ser el momento al cual los tripomastigotes sanguíneos son colectados y utilizados para la infección, que puede estar relacionado con la detección en etapas avanzadas de formas gruesas ("stumpy"), las cuales se pueden encontrar en mayor número que las formas alargadas o "slender" (Bertelli y Brener, 1980).

En éste estudio, se utilizaron tripomastigotes provenientes de ratones de 10-14 días post-infección para mantener la infección *in vivo* del aislado Querétaro, es decir antes que aparezca el máximo en el número de tripomastigotes circulantes, aún cuando no determinamos la proporción de formas stumpy/slender. Además algunos resultados obtenidos en otros experimentos, llevados a cabo recientemente en nuestro laboratorio, comprueban que la inoculación de tripomastigotes provenientes de ratones después de 20 días de ser infectados, puede generar una infección de tipo crónico (datos no mostrados). En contraste con lo anterior cuando se utilizaron parásitos de cultivo provenientes de células Vero irradiadas e infectadas para la inoculación de ratones, se establecía una etapa aguda. Esto sugiere que las condiciones de infección *in vitro* son diferentes a las que existen *in vivo*, lo que podría estar relacionado a la capacidad infectiva de los tripomastigotes, por lo que es necesario tener en mente que las presiones selectivas a las cuales se encuentran sujetos los parásitos también varían, lo que podría promover la variación en las formas encontradas *in vitro* (Mc Daniel y Dvorak, 1993). Esto último, sin embargo, no es compartido por otros autores ya que sus datos, demuestran que la disminución de la virulencia de los

tripomastigotes cultivados durante largos periodos, se deba posiblemente a la producción de formas gruesas, como se observan en cultivos de tres semanas sin adicionar o retirar las formas delgadas (Ashraf y Kuhn, 1992). Aunque de este modo se podría explicar la virulencia de los tripomastigotes, esto necesita ser definido en cada experimento para tener un mejor control de la infección *in vivo* y la determinación de las condiciones *in vitro*.

Si bien es cierto que el establecimiento de la enfermedad de Chagas esta influenciada por la virulencia del parásito, la respuesta inmune del huésped también desempeña un papel determinante en el curso que sigue la infección con *T. cruzi*. En este sentido Tarleton y Kuhn (1983), en su estudio con el modelo murino de cepa susceptible, observaron que los niveles en los títulos de los anticuerpos producidos durante la infección se mantienen en aumento hasta que los ratones mueren. Discrepando con la observación acerca de los títulos tanto de IgM e IgG, que conservan valores similares, nuestros datos muestran que los niveles de IgG superan a los de IgM hasta 6 veces, lo que podría ser debido tanto a la cepa de ratón, como a la de *T. cruzi* usados. De la misma manera, el número de parásitos inoculados podría influir en el grado de desequilibrio generado, lo que podría ocasionar una tendencia similar en los anticuerpos totales pero diferente en cuanto a los títulos de cada isotipo. Sin embargo este último punto está siendo evaluando actualmente por nuestro grupo.

Existe controversia acerca del papel que cumplen los anticuerpos generados durante la infección con *T. cruzi*, mientras para algunos autores son importantes en la protección contra su establecimiento (Zweerink y col, 1984), para otros el tipo de anticuerpos y su reactividad con componentes específicos es lo que determina su importancia (Rowland y col, 1990). Sin embargo, resulta fundamental el hecho de caracterizar aquellos antígenos que pudieran tener relevancia, ya sea en la transformación estadio-estadio o bien en la regulación de la respuesta inmune, participando en la dirección de la fase de infección (Minoprio y col, 1989).

La identificación de los antígenos reconocidos por los anticuerpos generados durante el padecimiento de una enfermedad infecciosa, se ha logrado mediante ensayos de reactividad de estos anticuerpos con antígenos del agente patógeno. Estos ensayos son conducentes al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico para la enfermedad aumentando su especificidad y sensibilidad.

Nogueira y col en 1981, reportaron que el principal antígeno de tripomastigotes sanguíneos, reconocido por sueros de humanos y ratones infectados, es un componente de 90 kDa. Estos datos coinciden en parte con los obtenidos en este estudio, ya que en esta zona, se encontraron antígenos (91.2 y 92.6 kDa) compartidos por los tres estadios, principalmente entre epimastigotes y tripomastigotes como lo reporta Snary en 1985. Al igual que Grögl y Kuhn en 1985, Mikhail y Rowland en 1990, muestran que el antígeno de 90 kDa es reconocido intermitentemente a lo largo de la infección, por lo que sería interesante, su estudio a nivel de regulación de la respuesta inmune. Estos estudios, sin embargo no demuestran la posibilidad de la presencia de esta proteína en el interior de otras formas del parásito, ya que se sugiere que la protección inducida usando extracto de epimastigotes puede ser debido a antígenos comunes (Araujo y Morein, 1991).

En cuanto a la ausencia de reacción en un día y la aparición de ésta en contra de antígenos en los diferentes extractos, hace difícil el diagnóstico debido a que este fenómeno podría estar asociado con el curso que ha tomado la infección. tal es el caso de los antígenos del grupo III. Sin embargo, este criterio debe de ser tomado en cuenta con sumo cuidado, ya que la variación entre cepas de *T. cruzi*, el inoculo de parásitos infectivos y los estudios en modelos experimentales, pueden ser un obstáculo para emitir alguna hipótesis. Esta intermitencia en el reconocimiento de algunos antígenos (grupo III y IV) por los anticuerpos generados en una infección ha sido reportada por Rowland y Mikhail en 1992, quienes sugieren la desaparición y aparición de nuevos anticuerpos contra estos

componentes, sin embargo, su papel en la regulación de la respuesta inmune debe ser evaluada. En este sentido, es necesario determinar el factor que puede estar asociado a esta conducta de intermitencia, ya que podrían ser antígenos que tengan secuencias repetitivas (Hoft y col, 1989) y que las diversas variantes aparezcan durante la infección con *T. cruzi* y por lo tanto no pueden ser reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero, por lo que cualquier conclusión sería inoportuna.

Mientras que los mismos sueros usados por Nogueira y colaboradores (1981), para analizar la respuesta contra tripomastigotes provenientes de cultivos libres de células mostraron reactividad con un componente de 70 kDa, se sugiere que este último puede ser un producto de la proteólisis de uno de mayor peso molecular, en contraste con lo reportado por Snary (1985), quien resume en un reporte sus hallazgos acerca de la caracterización de glicoproteínas de varios estadios de *T. cruzi*, que el componente de 72 kDa es específico de los estadios presentes en el insecto vector. De la misma manera, con los datos presentados en este estudio no se descarta la presencia de formas parecidas a estos estadios en la diferenciación de amastigotes a tripomastigotes sanguíneos durante la infección *in vivo* (Teixeira, 1987), ya que los sueros de ratones infectados en este estudio reconocen componentes dentro de ese peso molecular en los tres estadios.

Por otro lado el reconocimiento de constituyentes del parásito en un solo día (grupos III, V, VI, VII y algunas del grupo IX), sugiere la aparición de antígenos nuevos durante la infección, lo que es un aspecto importante en la determinación de la parasitemia y de la fase en la cual se encuentra la enfermedad. Asimismo, esto demuestra la gran plasticidad que a nivel antigénico presenta *T. cruzi*, lo que podría desempeñar un papel fundamental en la evasión del parásito al generar anticuerpos contra estos antígenos.

En otro estudio realizado por Rosfjord y colaboradores (1990), mostraron que los sueros de ratones reaccionan con una proteína de 69-71 kDa de epimastigotes y

que esto correlaciona con la enfermedad de tipo crónico. Estos resultados coinciden con el tiempo en que este antígeno (72.3 kDa), que es reconocido al día 22 y 25 post-infección, cuando la parasitemia ha disminuido grandemente, indicando una tendencia hacia la cronicidad.

Comparando los resultados de este estudio con los obtenidos por Mikhail y Rowland (1990), donde los sueros de ratones inmunizados e infectados con la cepa Brasil, reaccionan con antígenos entre 25 y 160 kDa en extractos de epimastigotes de *T. cruzi*, se pueden encontrar algunas diferencias. La detección del doblete 75-77 en cepa susceptible (C3H), al día 21 y en la resistente C57BL/6 al día 42, contrasta con lo observado por nosotros, ya que la reactividad con componentes cercanos a ese peso molecular ocurrió desde el día 6, además, aún cuando existe reactividad con estos antígenos supuestamente protectores, los animales mueren. Por lo tanto es posible que este tipo de antígenos tengan una regulación diferencial de acuerdo a la cepa infectiva de *T. cruzi* y/o una regulación en la respuesta inmune diferente dependiendo de la cepa de ratones, pues la reactividad de los anticuerpos con estos antígenos fue intermitente. Otra posibilidad es que las proteínas reconocidas en este estudio correspondan a otras diferentes, debido al método de extracción de antígenos, como se discutió anteriormente.

Por su parte Rangel-Aldao y colaboradores, en 1987, utilizando antígenos de epimastigotes traducidos *in vitro* observaron, que la reactividad con sueros de pacientes chagásicos estuvo localizada principalmente en componentes de 110, 84, 51, 47, 30, 20 y 16 kDa. Estos mismos antígenos fueron reconocidos por sueros de pacientes tanto en tripomastigotes como epimastigotes en un estudio anterior (Rangel-Aldao y col, 1986). Coincidentemente algunos antígenos con pesos moleculares similares a los anteriores, fueron reconocidos en este estudio en los mismos estadios, excepto que el antígeno de 47 también se reconoce en amastigotes. Un hecho interesante es que estos antígenos son de reconocimiento

intermitente por lo que sería interesante analizar su papel en la respuesta inmune del huésped.

Ya que el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas tiene como base la generación de anticuerpos durante la infección del individuo, los antígenos utilizados (que son extractos de epimastigotes), hacen que las pruebas pierdan especificidad, debido a la respuesta policlonal de anticuerpos que provocan estos. En adición solo aquellos anticuerpos antígeno-específicos podrían ser utilizados en la fase crónica de la enfermedad, puesto que los títulos de estos disminuyen un año después de la infección en humanos (Israelski y col, 1988), de ahí que la identificación de los antígenos que fueran reconocidos a lo largo de la infección, podrían ser de utilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

En este sentido el antígeno de 226 kDa, que es reconocido por el suero de ratones infectados durante toda la infección, parece ser un buen candidato para el diagnóstico de este padecimiento, sin embargo es necesario su utilización con sueros de pacientes chagásicos. Un antígeno obtenido de una librería de cDNA de tripomastigotes metacíclicos de peso similar se ha utilizado con sueros de pacientes con la enfermedad aguda y crónica (Paranhos y col. 1990). Sin embargo, estos autores no lo detectan en extractos de epimastigotes de cultivo, por lo que la respuesta generada por los ratones infectados en nuestro estudio podría estar dirigida contra otra proteína que migra cerca de este peso molecular. Esto hace necesario determinar la presencia de este componente en otras cepas de *T. cruzi*, así como la frecuencia de reconocimiento que presenten los sueros de pacientes y de esta manera evaluar su uso en el diagnóstico de la fase aguda y crónica de la enfermedad.

La especificidad de los anticuerpos por componentes reconocidos en la fase aguda y crónica de la enfermedad, parece ser un factor determinante en el diagnóstico, ya que Rosfjord y colaboradores (1990), reportan que más de un anticuerpo reacciona con componentes de diferentes regiones en el patrón

electroforético. Además de esto, el tipo de extracto usado, así como el tiempo en que son colectados los sueros debe de ser controlado por los investigadores. En este sentido, al parecer los estudios de tipo longitudinal (Hudson y col, 1988), serían una opción ideal en la búsqueda de un método para la detección de este padecimiento, sin embargo, la falta de centros de referencia así como la migración de individuos infectados y la incertidumbre siempre existente en la historia clínica de los pacientes, haría laborioso y difícil este tipo de experimentos.

Los datos aportados en este trabajo acerca de los antígenos reconocidos por el suero de ratones infectados a lo largo de la infección demuestran que existe reactividad contra antígenos en los tres extractos. Este tipo de componentes junto con otros constituyentes estadio-específicos (grupo II), que fueron reconocidos a lo largo de la infección, podrían ser buenos candidatos a usarse en las pruebas de diagnóstico que utilicen como técnica la inmunoelectrotransferencia de proteínas. En el extracto de tripomastigotes se encuentran los antígenos de 173 y 163 kDa, un doblete que parece ser el antígeno de fase aguda denominado SAPA (del inglés Shed of Acute Phase Antigen), que permite el diagnóstico de manera temprana en la infección y que fue reportado por Affranchino y colaboradores (1989). A este componente se le localiza en la membrana de tripomastigotes únicamente y es liberado al medio en un cultivo de tejidos infectados con *T. cruzi*. Como un hecho interesante este doblete es reconocido por el anticuerpo monoclonal 2B10, obtenido en nuestro estudio, por lo que este anticuerpo podría ser utilizado en la determinación de la enfermedad de tipo agudo.

La posibilidad de contar con un diagnóstico para *T. cruzi*, como para la infección con *T. rangeli*, aumenta cuando en la metodología se usan anticuerpos policlonales, por lo que la identificación de antígenos específicos es necesaria para descartar la reactividad cruzada. En este sentido Saldaña y colaboradores, en 1993, identificaron en el patrón electroforético componentes específicos de *T. rangeli* de 93, 77-73, 53 y 54-52 kDa, aquellos que son reconocidos por sueros de chagásicos en inmunoelectrotransferencia y que corresponden a los pesos

142, 63, 54, 51, 49, 43, 39 y 24 kDa y por Southern descartaron la presencia de SAPA.

De igual manera la determinación de antígenos que pudieran interferir con el diagnóstico de la enfermedad como ocurre con la proteína de choque térmico de 70 kDa, la cual es detectada en la infección mixta por *T. cruzi/Leishmania braziliensis braziliensis* (Levy y col, 1992). En el mismo caso se encuentra la proteína de 43-45, que es reconocida por autoanticuerpos durante la infección en ratones (McCormick y Rowland 1993), por lo que su utilización en métodos de diagnóstico de Chagas quedaría descartado.

De acuerdo a lo anterior, la necesidad de utilizar un grupo de anticuerpos monoclonales antígeno específicos, que detecten componentes del parásito en diferentes momentos de la infección, tendría ventajas sobre el uso de un solo anticuerpo. La validez de una prueba requerirla determinar su reactividad con otras cepas con diferente zimodemo. Este punto es importante a fin de determinar la presencia de estos componentes en estas otras variantes ya que el patrón de reconocimiento parece cambiar en este contexto (Saborio y col, 1990).

Una vez caracterizado este perfil, los anticuerpos monoclonales producidos en este trabajo podrían ser evaluados en una prueba diagnóstica, usando sueros de pacientes en diferentes fases de la enfermedad, para determinar la presencia de los componentes reconocidos. Los problemas, sin embargo, que pudieran presentarse para la obtención de pruebas de diagnóstico seguras son múltiples, como la autoreactividad de los anticuerpos generados durante la infección con *T. cruzi* (Levin y col, 1989).

Por último los antígenos reconocidos en este estudio por sueros de ratones infectados necesitan ser evaluados en un ensayo con sueros de pacientes chagásicos en diferentes etapas de la enfermedad. Sin embargo, la contribución

de este trabajo al estudio de la enfermedad de Chagas queda manifiesta en el hecho de la obtención de anticuerpos monoclonales específicos contra *T. cruzi*.

CONCLUSIONES.

-) Se desarrollaron cultivos de *T. cruzi*, mediante un procedimiento nuevo, que permitió contar con suficientes cantidades del parásito, en condiciones de pureza del 90-95%.
-) La irradiación de células Vero con una fuente de luz ultravioleta hace más eficiente la obtención de tripomastigotes infectivos. Asimismo los amastigotes que se obtienen de estas células son de origen intracelular. Por lo que el estudio de antígenos de los parásitos obtenidos mediante este sistema podrían ser extrapolada a la infección *in vivo*.
-) Los extractos de los diferentes estadios de *T. cruzi*, presentaron pocas diferencias cualitativas, variando en el número de componentes observados en el patrón electroforético.
-) La complejidad de los extractos proteicos de este parásito analizados por EGPA-IDS hace poco probable la identificación directa de componentes específicos de los tres estadios. Sin embargo es posible distinguir al menos 4 proteínas compartidas en el patrón electroforético de los tres extractos; siendo el más evidente un componente mayoritario de 56-63 kDa.
-) La presencia de antígenos de *T. cruzi* de reconocimiento intermitente, sugiere su participación en la regulación de la respuesta inmune. No obstante esto debe ser determinado por otros estudios que involucren la activación celular.
-) El patrón de reconocimiento de antígenos de *T. cruzi* por sueros de ratones infectados, hace posible la identificación de constituyentes antigénicos del parásito que pudieran ser usados en pruebas de diagnóstico de la fase aguda de la enfermedad. Tal es el caso del componente de 226.2 kDa.
-) Los antígenos estadio específico, que son reconocidos a lo largo de la infección podrían ser evaluados por su uso potencial en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.
-) Cabe la posibilidad, que los antígenos de *T. cruzi*, reconocidos un solo día durante la infección sean utilizados para estudiar la señal del cambio de una fase aguda a una

crónica de la enfermedad. Para lo cual es necesario utilizar metodologías más finas como la deleción de genes que codifican estas proteínas para determinar su papel en este fenómeno.

-) El uso de anticuerpos monoclonales anti-*T. cruzi*, puede favorecer el desarrollo de pruebas de diagnóstico más sensibles y certeras como lo demuestra la detección de antígeno circulante por el anticuerpo monoclonal 4B10H10. Sin embargo la eficiencia de la prueba pudiera ser aumentada mediante el uso en la misma de otros anticuerpos específicos contra otros componentes.

-) El reconocimiento de los antígenos de fase aguda como SAPA, parecen ser hasta el momento los más confiables en el diagnóstico temprano de la enfermedad. Por lo que el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra este tipo de componentes pudieran ser útiles en la búsqueda de antígeno en el suero de pacientes con la infección,

-) La relación que existe entre los constituyentes reconocidos por anticuerpos generados durante la infección con *T. cruzi*, abre la posibilidad de desarrollar pruebas de diagnóstico más precisas y oportunas usando estos antígenos específicos en cada momento de la infección.

BIBLIOGRAFIA.

- Abrahamsohn, I.A., M.A. Katzin, and R.V. Milder. 1983. A method for isolating *Trypanosoma cruzi* amastigotes from spleen and liver using two-step discontinuous gradient centrifugation. *J. Parasitol.* **69**: 437-439.
- Afranchino, J.L., Ibañez, C.F., Luquetti, A.O., Rassi, A., Reyes, M.B., Macina, R.A., Aslund, L., Pettersson, U. y Frash, A.C.. 1989. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **34**: 221-228.
- Aparicio, O.O. y Antezana, A.G.. 1983. Ecografía en la fase inicial de la cardiopatía chagásica. *Salud Boliv.* **1**: 23-31.
- Araujo, F.G., Heilman, B. y Tighe, L.. 1984. Antigens of *Trypanosoma cruzi* detected by different classes and subclasses of antibodies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**: 672-677.
- Araujo, F.G. y Morein, B.. 1991. Immunization with *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigens incorporated into iscoms protects against lethal challenge in mice. *Infect. Immun.* **59**: 2909-2914.
- Ashraf, M. y Kuhn, R.E. 1992. Changes in fibroblast-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* during long-term culture. *J. Parasitol.* **78**: 526-528.
- Aulet, F., Riarte, A., Pattin, M., Segura, E.L., Vázquez M.. 1991. Chagas disease and kidney transplantation. *Transplant. Proc.* **23**: 2653.
- Avila, J.L., Rojas, M. and Towbin, H..1988. Serological activity against galactosyl-alpha(1-3)galactose in sera from patients with several kinetoplastida infections. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 126-132.
- Avila, H.A., Sigman, D.S., Cohen, L.M., Millikan, R.C. and Simpson, L.. 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **48**: 211-221.
- Bertelli, M.S.M. y Brener, Z.. 1980. Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* **66**: 992-997
- Bittencourt, A.L. y Barbosa, H.S. 1972. A importancia do estudo do feto macerado para o diagnóstico da forma congênita da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **14**: 260-265.

Camargo, E.P.. 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid medium. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 6: 220-224.

Caviedes, F., Ovseiovich, R y Rubio, J.. 1994. A simple method to separate metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* from axenic cultures. Acta Tropica. 58: 175-177.

Cerrone, M.C. y Kuhn, R.E.. 1991. Macrophage regulation of immune responses of spleen cells from mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Cell. Immunol. 138: 423-436.

Chiller, T.M., Samudio, M.A. y Zoulek, G.. 1990. The IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 43: 650-656.

Coffino, P., Boumal, R, Laskov, R. y Boyse, E.A.. 1972. Cloning of mouse mieloma cells and detection of rare variants. J. Cell. Physiol. 79: 429-440.

Contreras, V.T., Aranque, W. y Delgado, V.S.. 1994. *Trypanosoma cruzi*: metacyclogenesis in vitro-I. Changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 89: 253-259.

Corral, R.S., Orn, A., Freilij, H.L., Bergman, T. y Grinstein, S.. 1989. Purification and characterization of an 80-kilodalton *Trypanosoma cruzi* urinary antigen. J. Clin. Microbiol. 27:145-151.

Cotrim, P.C., Paranhos, G.S., Mortara, R.A., Wanderley, J., Camargo, M.E. y da Silveira, J.F.. 1990. Expression in *Escherichia coli* of a dominant immunogen of *Trypanosoma cruzi* recognized by human chagasic sera. J. Clin. Microbiol. 28: 519-524.

Coura, J.R., de Abreu, L.L., Willcox, HP. y Petana, W..1991. Evaluation of the xenodiagnosis of chronic Chagas patients infected ten years or over in an area where transmission has been interrupted--Iguatama and Pains, west Minas Gerais State, Brazil. Mem Inst. Oswaldo Cruz. 86: 395-8.

Cuna, W.R., Rodríguez, C., Torrico, F., Affchain, D., Loyens, M. y Desjeux, P.. 1989. Evaluation of a competitive antibody enzyme immunoassay for specific diagnosis of Chagas' disease. J. Parasitol. 75:357-359.

De Faria, J.B. y Alves, G.. 1993. Transmission of Chagas' disease through cadaveric renal transplantation. Transplantation 56: 746-7.

- De Hubsch, R.M., Chiechie, N., Comach, G., Rangef, A.R. y Gusmao, R.D.. 1988. Immunoenzyme assay using micro Dot on nitrocellulose (Dot-ELISA) in the diagnosis of Chagas' disease. I. Comparative study of 2 antigenic preparation of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **83**: 277-285.
- Engman, D.M., Dragon, E.A. y Donelson, J.E.. 1990. Human humoral immunity to hsp70 during *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol. **144** : 3987-3991.
- Fazekas de St. Groth y Scheidegger, D.. 1979. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. Immunol. Methods. **35**:1-21.
- Figueiredo, J.F., Martinez, R., da Costa, J.C., Moyses N.M., Suaid, H.J. y Ferraz AS. 1990 Transmission of Chagas disease through renal transplantation: report of a case. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **84**: 61-2.
- Frasch, A.C., Cazzulo, J.J., Aslund, L. y Petterson, U.. 1991. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. Parasitol. Today. **7**:148-151.
- Freilij, H., Altecheh, J..1995. Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects. Clin. Infect. Dis. **21**: 551-5.
- García, E. Ramírez, L.E., Monteón, V. y Sotelo, J.. 1995. Diagnosis of American trypanosomiasis (Chagas' disease) by the new complement fixation test. J. Clin. Microbiol. **33**: 1034-1035.
- Goldsmith, R.S., Ortega, M., Zárate, R.J. y Beltrán F.. 1983. Encuesta seroepidemiológica de la enfermedad de Chagas en Chiapas, México. Arch. Invest. Med. **14**: 43-50.
- Grögl, M. y Kuhn, R.E.. 1985. Identification of antigens of *Trypanosoma cruzi* which induce antibodies during experimental Chagas' disease. J. Parasitol. **71**: 183-191.
- Hoft, R., Mott, K.E., Silva, J.E., Menezes, V., Hoft, J.N., Barret, T.V. y Sherlock, Y.. 1979. Prevalence of parasitemia and seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural population of Northeast Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. **28**: 461-466.
- Hoft, D.F., Kjm, K.S., Otsu, K., Moser, D.R. Yost, W.J., Blumin, J.H., Donelson, J.E. y Kirchhoff, L.V.. 1989. *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. Infect. Immun. **57**: 1959-1967.
- Hoft, D.F. Lynch, R.G. y Kirchhoff, L.V.. 1993. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. **151**: 7038-7047.

Hudson, L., Snary, D. y Morgan, S-J.. 1984. *Trypanosoma cruzi*: continuous cultivation with murine cell lines. *Parasitology*. **88**: 283-294.

Hudson, L., Guhl, F, de Sánchez, N., Bridge, D., Jaramillo, C.A. e Young, A.. 1988. Longitudinal studies of the immune response of Colombian patients infected with *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Parasitology*. **96**: 449-460.

Israelski, D.M., Sadler, R. y Araujo, F.G. 1988. Antibody response and antigen recognition in human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **39**: 445-455.

Jazin, E.E., Luquetti, A.O., Rassi, A. y Frasch, A.C.. 1991. Shift of excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* during human Chagas' disease. *Infect. Immun.* **59**: 2189-2191.

Johnson, G.D. y Araujo, G.M.. 1981. A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J. Immunol. Methods*. **43**: 349-350.

Kerndt, P.R., Waskin, H.A., Kirchoff, L.V., Steurer, F., Waterman, S.H., Nelson, J.M., Gellert, G.A. y Schulman, I.A.. 1991. Prevalence of antibody to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in Los Angeles, California. *Transfusion* **31**: 814-818.

Kierszenbaum, F. y Ghar, H.M.. 1983. Killing of circulating forms of *Trypanosoma cruzi* by lymphoid cells from acutely and chronically infected mice. *J. Parasitol.* **13**: 377-381.

Laemmli, U. K.. 1970. Clearance of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.

Levin M. J., Mesri, E., Benarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Chiale, P.A., Ruiz, A.M., Kahn, A. y Rosenbaum, M.B.. 1989. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **41**: 530-538.

Levy, Y.P., Bonnefoy, S., Mirkin, G., Debrabant, A., Lafon, S., Panebra, A., González-Cappa, E., Dedet, J.P., Hontebeyre-Joskowiz, M. y Levin, M.J.. 1992. The 70-KDa heat-shock protein is a major antigenic determinant in human *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania brazillensis brazillensis* mixed infection. *Immunol. Lett.* **31**: 27-33.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Macedo, V. 1980. Forma indeterminada da doença de Chagas. J. Bras. Med. **38**: 34-40.

McDaniel, J. P., and J. A. Dvorak. 1993. Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. Molecular and Biochem. Parasitol. **57**: 213-222.

McCormick, T.S. y Rowland, E.C.. 1993. *Trypanosoma cruzi*: recognition of a 43-kDa muscle glycoprotein by autoantibodies present during murine infection. Exp. Parasitol. **77**: 273-281.

Mikhail, K.S. y 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.. 1972. *Trypanosoma cruzi*: milk transmission of infection and immunity from mother to young. Parasitology. **65**: 1-9.

Miles, M.A., Souza, A., Povoas, M., Shaw, J.J., Lainson, R. y Toyé, P.J.. 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. Nature. **272**: 819-822.

Minoprio, P., Itohara, S., Heusser, C., Tonegawa, S. y Cotinho, A.. 1989. Immunobiology of murine *Trypanosoma cruzi* infection: the predominance of parasite nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. Immunol. Rev. **112**: 183-207.

Molina, H.A. y Kiernsbaum, F.. 1987. A study of human myocardial tissue in Chagas' disease: distribution and frequency of inflammatory cell types. Int. J. Parasitol. **17**: 297-305.

Moncayo A.. 1992. Chagas disease: epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. World Health Stat Q. **45**: 276-9

Nogueira, N., Chaplan, S., Tydings, J.D., Unkeless, J. y Cohn, Z.. 1981. *Trypanosoma cruzi* surface antigens of blood and culture forms. J. Exp. Med. **153**: 629-639.

Ouaisi, M.A., Taibi, A., Loyens, M., Martin, U., Afchain, D., Maidana, C., Caudioti, C., Cornette, J., Martelleur, A., Velge, P., Marty, B., Esteva, M., Rizvi, F.S. y Capron, A.. 1991. *Trypanosoma cruzi*: a carbohydrate epitope defined by a monoclonal antibody as a possible marker of the acute phase of human Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. **45**: 214-225.

- Pan, S. C. 1978. *Trypanosoma cruzi*. Intracellular stages grown in a cell-free medium at 37 C. *Exp Parasitol.* 45: 215-224.
- Paranhos, G.S., Cotrim, P.C., Mortara, R.A., Rassi, A., Corral, R., Freilij, H.L., Grinstein, S., Wanderley, J., Camargo, M.E. y Da Silveira, J.F.. 1990. *Trypanosoma cruzi*: cloning and expression of an antigen recognized by acute and chronic human chagasic sera. *Exp. Parasitol.* 71: 284-293.
- Piras, M. M., R. Piras, and D. Henríquez. 1982. Changes in morphology and infectivity of cell culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6: 67-81.
- Portnoy, G.L., Oliva, A., Ramírez, J.A., Castellanos, C., Del Muro, R. y Ortiz-Ortiz, L.. 1990. An *Entamoeba histolytica* antigen devoid of enzymatic activity but endowed with immunogenic and protective properties. *Arch. Invest. Med.* 21: 27-33.
- Primavera, K.S., Hoshino-Shimizu, S., Umezawa, E.S., Peres, B.A., Manigot, D.A. y Camargo, M.E.. 1988. Immunoglobulin A antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in digestive forms of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 26:2101-2104.
- Rangel-Aldao, R., Comach, G., Allende, O., Cayama, E., Delgado, V., Piras, R., Piras, M., Henríquez, D. y Negri, S.. 1986. *Trypanosoma cruzi*: polypeptide markers of epimastigotes and trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20: 25-32.
- Rangel-Aldao, R., Comach, G. y Mendoza, A. 1987. *In vitro* translation of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by human chagasic sera. *J. Parasitol.* 73: 855-857.
- Reyes, M.B., Lorca, M., Muñoz, P. y Frasch, A.C.. 1990. Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2846-2850.
- Rojas, J.C.; Malo, E.A.; Espinoza-Medinilla, E. y Ondarza, R.N.. 1989. Sylvatic focus of Chagas disease in Oaxaca, México. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 83: 115-20.
- Rosfjord, E.C., Mikhail, K.S., Rowland, E.C. y Powell, M.R. 1990. Analysis of antibody cross-reactivity in experimental American trypanosomiasis. *J. Parasitol.* 76: 698-702.
- Rowland, E.C., Mikhail, K.S. y McCormick, T.S.. 1992. Isotype determination of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody in murine Chagas' disease. *J. Parasitol.* 78: 557-561.

Saborio, J.L., Wrightsman, R.A., Kasuko, S.G., Granger, B.S. y Manning, J. E.. 1990. *Trypanosoma cruzi*: identification of a surface antigen restricted to the flagellar region of the infective form of the parasite. Exp. Parasitol. **70**: 411-418.

Salazar-Schettino, P.M., De haro, A.I. y Beructa, U.T.. 1988. Chagas' disease in Mexico. Parasitol. Today. **4**: 348-352.

Salazar-Schettino, P.M., Tay, J., Ruiz, H.A., de Haro, I., Bucio, M.I., Jiménez, J., García, Y.Y. y Gutiérrez, Q.M.. 1984 seropositividad a *Trypanosoma cruzi* en cuatro grupos de población del estado de Oaxaca. Salud Pública Méx. **26**: 589-595.

Saldaña, A., Orn, A., Henriksson, J. y Sousa O.E.. 1993. Evaluación de cuatro métodos inmunobioquímico/moleculares en la identificación de cepas de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*. Rev. Med. Panamá. **18**: 41-52.

Sanderson, C.J. y Souza, W.. 1979. A morphological study of the interaction between *Trypanosoma cruzi* and rat eosinophils, neutrophils and macrophages *in vitro*. J. Cell Sci. **37**: 275-286.

Sanderson, C.J., Thomas, J.A. y Towmey, C.E.. 1980. The growth of *Trypanosoma cruzi* in human diploid cells for the production of trypomastigotes. Parasitology. **80**: 153-162.

Schmatz, D. M., y P. K. Murray. 1982. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in irradiated muscle cells: improved synchronization and enhanced trypomastigote production. Parasitology. **85**: 115-125.

Shechter, M. y Nogueira, N.. 1988. Variations induced by different methodologies in *Trypanosoma cruzi* surface antigens. Mol. Biochem. Parasitol. **29**: 37-46.

Schenone H; Contreras MC; Rojas A 1991. Yielding of xenodiagnosis, according to the number of boxes used in 1,181 persons with chronic chagasic infection diagnosed with indirect hemagglutination reaction. Bol. Chil. Parasitol. **46**: 58-61.

Snary, D. 1985. Biochemistry of surface antigens of *Trypanosoma cruzi*. British Med. Bull. **41**: 144-148.

Tachibana, H, Nagakura, K. y Kaneda, Y.. 1988. Serodiagnosis of Chagas' disease using monoclonal antibody against *Trypanosoma cruzi* Mr 25,000 antigen. Parasitol. Res. **74**: 409-414.

Tachibana, H., Kawabata, M., Mimori, T., Hashiguchi, Y., Nagakura, K. y Kaneda Y..1991. The validity of serodiagnosis using a monoclonal antibody against *Trypanosoma cruzi*-specific Mr 25,000 antigen for chagasic patients without cardiomyopathy. Ann. Trop. Med. Parasitol. **85**: 275-276.

- Tarleton, R.L. y Kuhn, R.E. 1983. Changes in cell populations and immunoglobulin-producing cells in the spleens of Mice infected with *Trypanosoma cruzi*: correlation with parasite-specific antibody response. *Cell. Immunol.* **80**: 392-404.
- Tay, J., Salazar-Schettino, P.M., Ontiveros, A., Jiménez, J., Haro, I., García, Y.Y. y Gutiérrez, Q.M.. 1987. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en una población de Oaxaca, México. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* **102**: 325-332.
- Teixeira, de A.R.L.. 1987. The stercorian trypanosomiasis In: *Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis*. Soulsby, E.J. (De). vol III. CRC Press Inc. pp 25-118.
- Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, J.. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4350-4354.
- Urdaneta-Morales, S.. 1983. *Trypanosoma cruzi*: Attenuation of virulence by culture in tissues. *Ann. Parasitol, Hum. Comp.* **58**: 317-324.
- Van Voorhis, W.C., Schlekewy, L. y Trong, H.L.. 1991. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F1-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12 aminoacid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 5993-5997.
- Velasco, C.O.. 1989. Situación de las enfermedades tropicales mayores en México en: *Medicina y Cultura.* **4**: 6-30.
- Voller, A., Bidwell, D.E. y Bartlett, A.. 1979. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Dynatech Laboratories, Inc.. pp 25-41.
- Zweerink, H.J., Weston, H.D., Andersen, F.O., Garber, S.S. y Hayes, E.C.. 1984. Immunity against infection with *Trypanosoma cruzi* in mice correlates with presence of antibodies against three trypomastigote polypeptides. *Infect. Immun.* **46**: 826-830.