

24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

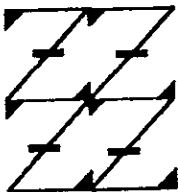
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

DETERMINACION DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y SUSCEPTIBILIDAD A *Trypanosoma cruzi* DE LOS RATONES et/et COMPARADOS CON LOS et/+ Y CD1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
RIVERA HERNANDEZ MARIA MARTINA
VALERIANO OCAMPO ISABEL

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

ASESORES: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA
DR. OSCAR VELASCO CASTREJON
M. EN C. CARMEN GUZMAN BRACHO

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

264475



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.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN L-313 DE INMUNOLOGIA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA DE LA UNAM Y EN EL INDRE (INSTITUTO DE DIAGNOSTICO DE REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS). BAJO LA ASESORIA DE LOS DOCTORES RUBEN MARROQUIN SEGURA, OSCAR VELASCO CASTREJON Y DE LA M EN C. CARMEN GUZMAN BRACHO.

AGRADECIMIENTOS

A NUESTROS ASESORES:

Dr. Rubén Marroquín Segura.

Por su paciencia, tiempo y apoyo incondicional para la realización de este trabajo. Además por ser una maravillosa persona y un magnífico profesor.

Dr. Oscar Velasco Castrejón y a la M. en C Carmen Guzmán Bracho

Por su asesoría, orientación y disponibilidad para la realización de este trabajo

A LOS PROFESORES:

Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera

M.C. Maurilio Flores Pimentel

Q.B.P. Dora Alicia Pérez González

Q.F.B. Luis Mora Guevara

Por su asesoría, orientación y amistad que siempre nos brindaron.

ADEMAS:

Al personal de la P.G.R de Servicios Aéreos Hangar 14.

Por su enorme ayuda para la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Fidel Rivera Cordero y Clara Hernández de Rivera
por sus consejos y apoyo durante toda mi carrera.

A MIS HERMANOS:

Vicente, Patricia, Alejandra Margarita y muy especialmente a Francisco Javier
por sus palabras de aliento y su ayuda en todo momento.

A MIS SOBRINOS:

Saúl, Víctor Hugo, Alejandra y Rubén
por todos los momentos de alegría a su lado.

A MIS AMIGOS:

Elia, Gabriela, Ana, Silvia, Jorge y a la Familia González Flores
por su amistad incondicional.

Ma. Marjina

DEDICATORIAS

A MI MADRE

Clotilde Ocampo Mejía

Por su apoyo incondicional

A MI PADRE †

José Valeriano Alvarado

Por su ejemplo de superación que me inculco.

A MIS HERMANOS

Juan, Lilia, José y Pedro

Por sus consejos y apoyo en todo momento

A TODOS MIS SOBRINOS

Por el cariño y la amistad que siempre me han brindado

A MI ESPOSO

Cuahtémoc

Por su amor, confianza y su apoyo que siempre me ha dado

A MI HIJA

Andrea

Por la alegría de tenerla a mi lado

ISABEL

RESUMEN

En este trabajo se determinó la respuesta inmune humoral y la susceptibilidad a Trypanosoma cruzi en ratones hipotímicos denominados et/et comparandolos con sus hermanos de camada portadores del gen de hipotimia (et/+) y con ratones albinos normales llamados CD1, para ello se realizó cuantificación de parasitemia a los días 30 y 54 posteriores a la inoculación mediante frotis sanguíneo y Q.B.C. (técnica de microhematocrito para detección de hematoparásitos). Se encontró más adecuado el Q.B.C. para cuantificar parasitemia debido a que por ser una técnica de concentración es más sensible, rápida y de fácil manejo, asimismo los machos fueron más susceptibles a la infección, por lo que se propuso al ratón et/et macho como un medio de mantenimiento y aislamiento de cepas, ya que esos animales sobrevivieron a parasitemias altas, se realizó también la determinación de anticuerpos anti- T. cruzi de respuesta primaria y secundaria mediante ELISA, no encontrando diferencia significativa en los 3 grupos de ratones mediante el análisis estadístico de Kruskal-Wallis, no se encontró supresión inespecífica en el ratón et/et frente a un antígeno timo- dependiente como la BSA. Se determinó también los índices esplénico y cardíaco al día 63 posterior a la infección, además del diámetro de los órganos de los ratones inmunizados con la cepa "MIGUZ" y "NINOA", se concluyó que en general el daño en órganos fue variable, sin embargo los ratones más afectados fueron los CD1 y en menor grado los et/+ y los et/et, estos últimos se cree que presentaron menos reacciones de hipersensibilidad debido a su deficiencia en células T.

INDICE GENERAL

	PAG.
<i>I.-INTRODUCCION</i>	1
<i>II. MARCO TEORICO</i>	
2.1 <i>Morfología de Trypanosoma cruzi</i>	4
2.2 <i>Ciclo biológico de Trypanosoma cruzi</i>	4-6
2.3 <i>Antígenos de superficie de T. cruzi</i>	6-7
2.4 <i>Patología de la enfermedad de Chagas</i>	7-9
2.5 <i>Diagnóstico de la enfermedad de Chagas</i>	9-11
2.6 <i>Tratamiento de la enfermedad de Chagas</i>	12
<i>III. LA RESPUESTA INMUNE</i>	
<i>A). La respuesta inmune celular</i>	13-14
<i>B). La respuesta inmune humoral</i>	14-15
3.1 <i>Las células T y B</i>	15-17
3.2 <i>El timo</i>	18-20
3.3 <i>Las inmunoglobulinas</i>	21
<i>A). Inmunoglobulina IgG</i>	21-23
<i>B). Inmunoglobulina IgM</i>	23-24
3.4 <i>Inmunoglobulinas en la enfermedad de Chagas</i>	23
3.5 <i>El ratón desnudo</i>	25-26
3.6 <i>Estudio inmuno enzimático de ELISA</i>	26-29
3.7 <i>Q.B.C. (Quantitative Buffy Coat)</i>	30-32
<i>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i>	33-34
<i>V. FUNDAMENTACION DEL TEMA</i>	35-37
<i>VI. HIPOTESIS</i>	38
<i>VII. OBJETIVOS</i>	39
<i>VIII. DISEÑO DE INVESTIGACION</i>	40
8.1 <i>Tipo de estudio</i>	40
8.2 <i>Material y reactivos</i>	40-42
8.3 <i>Métodos</i>	42-45
8.4 <i>Diseño estadístico</i>	46-47

IX. RESULTADOS

<i>Tabla No.1 Cuantificación de tripanosomas mediante frotis sanguíneo</i>	48
<i>Tabla No.2 Cuanficación de parasitemia mediante Q.B.C.</i>	48
<i>Tabla No.3 Determinación de IgM por ELISA 30 días post-inoculación</i>	49
<i>Tabla No. 4 Determinación de IgM por ELISA 54 días post-inoculación</i>	50
<i>Tabla No. 5 Determinación de anti-T.cruzi tipo IgG por ELISA</i>	51
<i>Tabla No. 6 Determinación de anti-BSA tipo IgG por ELISA</i>	52
<i>Tabla No.7 Índice cardiaco en ratones al día 54 post-inoculación</i>	53
<i>Tabla No.8 Diámetro del tamaño del corazón en ratones al día 54 p.i</i>	54
<i>Tabla No.9 Diámetro de los ciegos en ratones al día 63 p.i.</i>	55
<i>Tabla No. 10 Diámetro de los esófagos en ratones al día 63 p.i.</i>	56
<i>Tabla No.11 Diámetro del colon descendente en ratones al día 63 p.i.</i>	57
<i>Tabla No.12 Diámetro del colon transverso en ratones al día 63 p.i.</i>	58
<i>Tabla No. 13 Diámetro del colon ascendente en ratones al día 63 p.i.</i>	59
<i>Tabla No. 14 Índice esplénico en ratones al día 54 post-infección</i>	60-61

<i>X. ANALISIS DE RESULTADOS</i>	62-63
----------------------------------	-------

<i>XI. CONCLUSIONES</i>	64
-------------------------	----

<i>XII. ANEXOS</i>	65-67
--------------------	-------

<i>XIII. REFERENCIAS</i>	68-74.
--------------------------	--------

INDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
<i>Casos agudos de la enfermedad de Chagas</i>	2
<i>Encuesta seroepidemiológica Nacional</i>	3
<i>Ciclo biológico de Trypanosoma cruzi</i>	5
<i>Eventos llevados a cabo en la respuesta inmune</i>	17
<i>La función inmunológica del timo</i>	20
<i>Inmunoglobulina IgG</i>	22
<i>Inmunoglobulina IgM</i>	24
<i>Variantes del método de ELISA</i>	29
<i>Método para detección de hematoparásitos (Q.B.C.)</i>	32

INTRODUCCION.

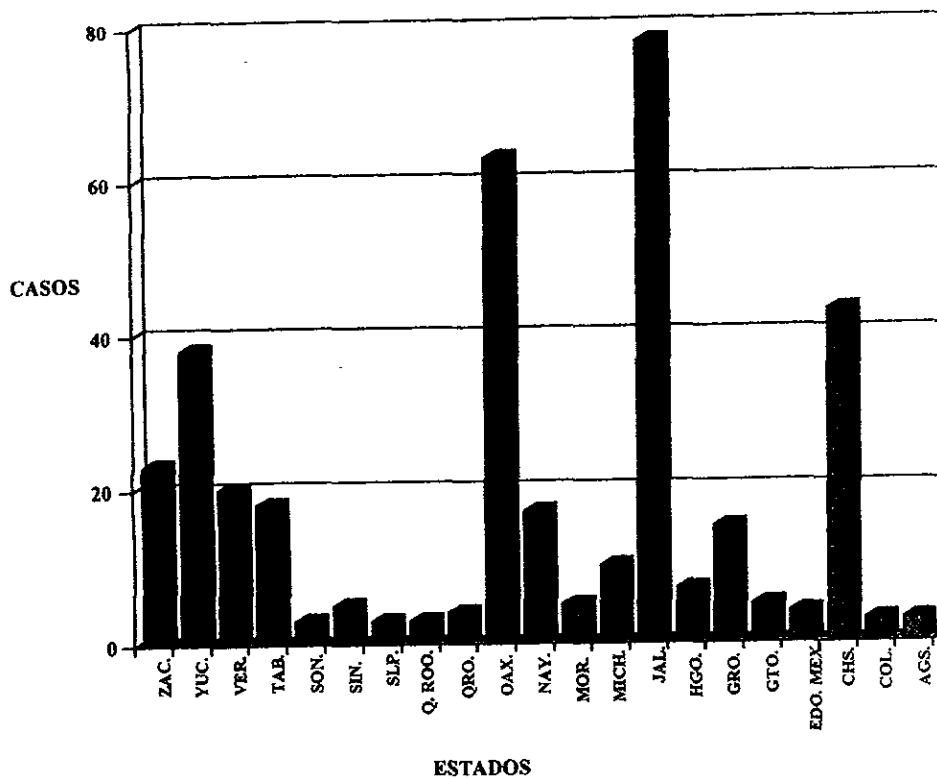
La enfermedad de chagas o tripanosomiasis americana se debe a la infección por *Trypanosoma cruzi* un protozoario que vive en la sangre y los tejidos del hombre y los animales. Este parásito fue descubierto por el investigador Carlos Chagas en Brasil en el año de 1909, en el intestino de un hemíptero *Panstrongylus megistus* chinche hocicona.¹ La tripanosomiasis americana es una enfermedad propia y exclusiva de este continente, su distribución geográfica comprende desde el sur de los Estados Unidos de América; hasta el norte de Argentina y Chile. En México de acuerdo a estudios serológicos y epidemiológicos la tripanosomiasis se presenta en todo el territorio comprendido entre los 1,800 y 2000 m sobre el nivel del mar (fig. 1y 2). Este padecimiento es propio de las áreas rurales y suburbanas y principalmente afecta a campesinos y a marginados.^{1,2}

Debido a que la enfermedad de Chagas representa un grave problema de salud tanto en México como en Latinoamérica, el *Trypanosoma cruzi* es uno de los parásitos más estudiados en la mayor parte de América. La búsqueda de modelos animales para el estudio de la enfermedad de Chagas ha sido uno de los problemas a los que se han enfrentado los investigadores, ya que existe gran variedad en las respuestas tanto celulares como humorales que se dan en cada especie, principalmente en el ratón que es uno de los modelos más estudiados, y se ha propuesto que estas respuestas son similares en humanos.^{3,4}

Los estudios sobre enfermedad de Chagas en ratones de diversas cepas han sido desde la determinación de su respuesta humoral y celular en las fases aguda y crónica de la tripanosomiasis, sensibilidad y resistencia a fármacos, histopatología, etc. Los estudios en ratones desnudos atímicos (*nu/nu*) han despertado el interés de los investigadores, esto debido a su deficiencia de células T que incrementa su susceptibilidad a la infección.³

Por su resistencia a condiciones estándares de bioterio el ratón desnudo llamado *et/et* (hipotímico) ha sido de gran utilidad para estudiar enfermedades autoinmunes como la uveitis y la respuesta inmune en general.^{5,6} Este modelo no había sido utilizado con anterioridad para analizar la enfermedad de Chagas, por ello en este trabajo se determinó la respuesta inmune humoral y la susceptibilidad a *Trypanosoma cruzi* en ratones *et/et* comparándolos con sus compañeros de camada portadores del gen de hipotimia (*et/+*) y con la cepa CD1 (ratones albinos normales), determinando la concentración de anticuerpos tipo IgG e IgM mediante la técnica de ELISA (ensayo enzimático ligado a inmunoabsorbentes) y la parasitemia mediante frotis sanguíneo y QBC (Quantitative Buffy Coat) en ratones inmunizados con la cepa "Miguz" de *Trypanosoma cruzi*, además de la determinación de los índices esplénico y cardiaco en los órganos de los ratones inmunizados previamente con la cepa "Ninoa" de *Trypanosoma cruzi*.

CASOS AGUDOS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS 1990.

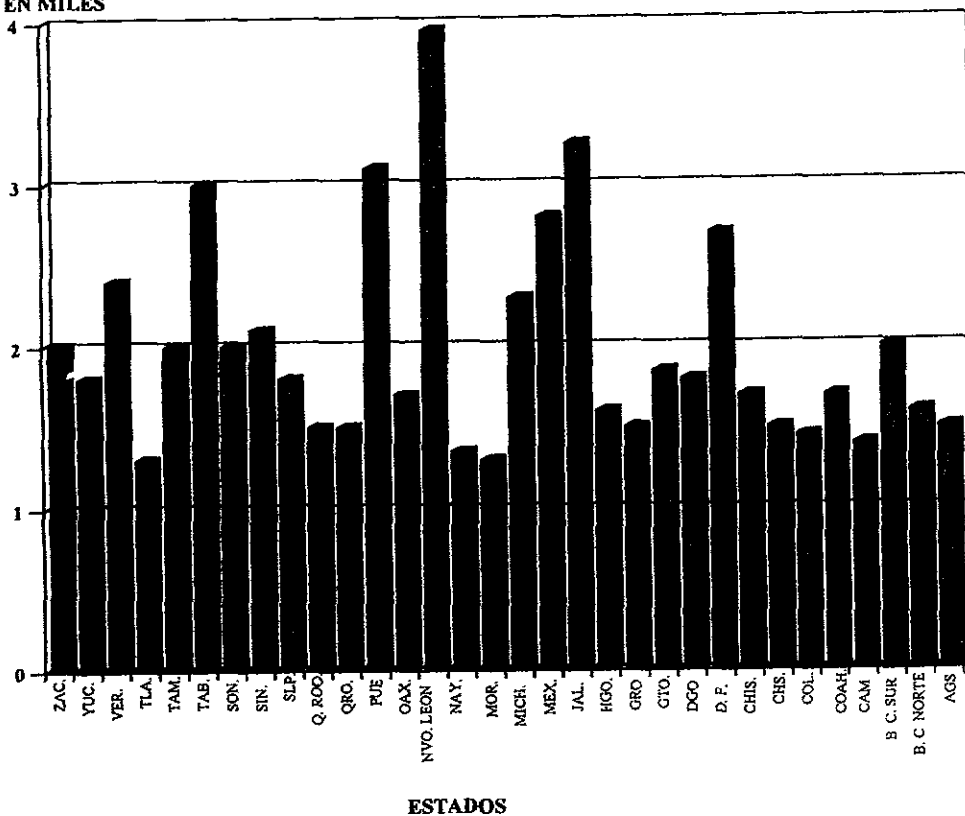


FUENTE: LABORATORIO DE PARASITOLOGIA INSTITUTO NACIONAL DE
DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICA
VELASCO C.O. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS INDRE.S.S. 1991 (2)

FIG. 1

ENCUESTA SEROEPIDEMIOLOGICA NACIONAL ESTADOS UNIDOS MEXICANOS 1990.

MUESTRAS
PROCESADAS
EN MILES



FUENTE: LABORATORIO DE PARASITOLOGIA INSTITUTO NACIONAL DE
DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICA
VELASCO C.O. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS INDRE S. S. 1991 (2)

FIG. 2

II- MARCO TEORICO

2.1 Morfología de *Trypanosoma cruzi*

El *Trypanosoma cruzi* es un organismo pleomórfico que presenta dos fases en su ciclo vital una en el hombre o en huéspedes reservorios y otra en insectos transmisores. Su morfología se puede estudiar mejor en preparaciones teñidas con Giemsa. En sangre se le encuentra como tripomastigote sanguíneo, que posee flagelo y membrana ondulante y mide aproximadamente veinte micras de largo. En las preparaciones fijas y teñidas tienen forma de "U" o de "S" citoplasma granuloso, núcleo central y un gran cinetoplasto. En los tejidos se encuentran dentro de las células del sistema fagocítico mononuclear en forma de amastigote la cual es redonda y mide de 1.5 a 4 micras de diámetro y carece de flagelo, esta forma se divide por fisión binaria en las células del huésped lo que conduce a la formación de pseudoquistes. Los Tripomastigotes presentan una forma infecciosa no multiplicativa, cuando se presentan en sangre se les denominan Tripomastigotes sanguíneos a diferencia de los que se encuentran en el intestino del transmisor que se conocen como Tripomastigotes metacíclicos o epimastigotes; solo el primero resulta infectante ya que los amastigotes son destruidos por eosinófilos y células K no obstante es posible establecer una infección experimental en animales de laboratorio con las formas de cultivo, en las que predominan los epimastigotes.⁷

2.2 Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozooario hemoflagelado cuyo ciclo vital comienza con la fase de tripomastigote metacíclico, forma contenida en la materia fecal del triatómino y que infecta al huésped vertebrado penetrando por la picadura del insecto, por las mucosas y, muy probablemente por la piel debido a las abrasiones ocasionadas por el rascado.⁷ Dentro del huésped penetra los macrófagos y si logra sobrevivir escapando al fagolisosoma, se redondea y se convierte en amastigote que se reproduce rápidamente por bipartición en el citoplasma, rompe las células y penetra a otras. Los amastigotes liberados son células redondeadas de 2 a 7 μm de diámetro con gran núcleo y cinetoplasto en forma de bastoncito incurvado que da origen al rizoplasto, el cual se convertirá en flagelo en las diversas formas evolutivas fig3. Enseguida, mediante progresión fusiforme, adquieren la forma de epimastigote, que poco después se transforma en tripomastigote sanguíneo al desplazarse el cinetoplasto al polo posterior, de donde emerge una membrana ondulante en el polo anterior se transforma en flagelo. El tripomastigote sanguíneo mide entre 15 a 20 μm . de diámetro, generalmente es incurvado en forma de "C", "U" o "S", su cinetoplasto está colocado en el polo posterior de la célula y es muy grande, de él nace una membrana

HUESPEDES RESERVORIOS

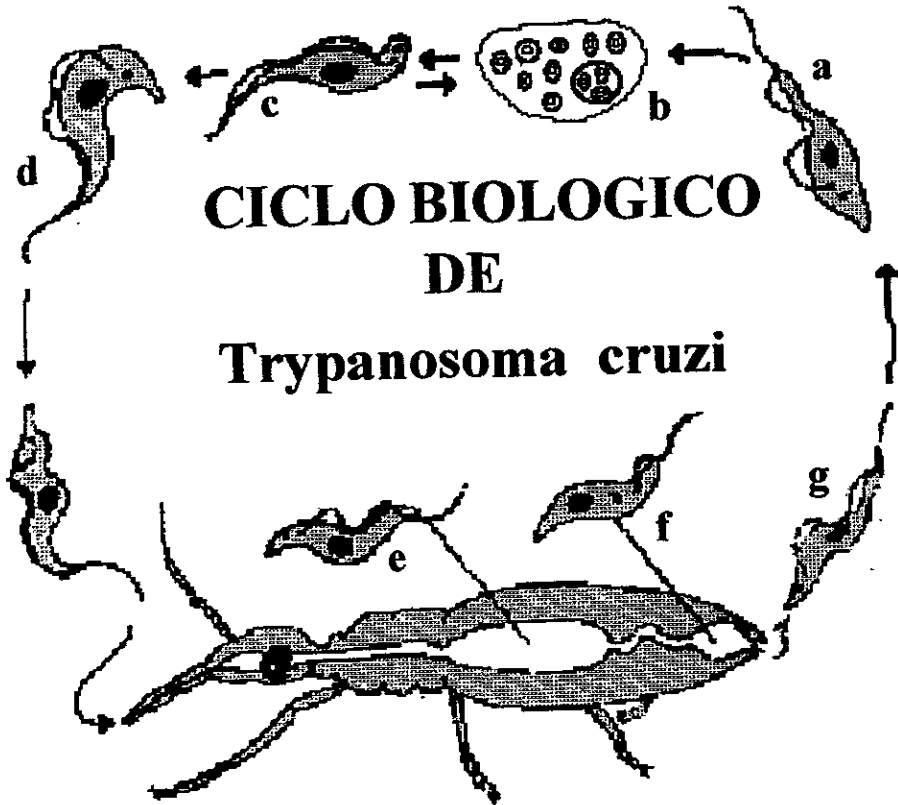


FIG 3- DIAGRAMA QUE ILUSTRAS EL CICLO VITAL DE *Trypanosoma cruzi* EN EL VECTOR (CHINCHE HOCICONA) EN ANIMALES Y EN EL HOMBRE: A) FORMA DE TRIPOMASTIGOTE SANGUÍNEO, B) AMASTIGOTE CONTENIDO EN LAS CELULAS, C) FORMA DE TRIPOMASTIGOTE METACÍCLICO, D) FORMA DE TRYPANOSOMA SUCCIONADO POR LA CHINCHE, E) FORMA DE TRIPOMASTIGOTE TRANSFORMÁNDOSE EN TRIPOMASTIGOTE METACÍCLICO F Y G) TRIPOMASTIGOTES METACÍCLICOS EXCRETADOS EN LAS HECES DE LA CHINCHE. FAUST (1984). (8)

ondulante que se convierte en flagelo. En el vertebrado parasitado ocurre de manera simultánea un ciclo vital de progresión fusiforme, que termina en tripomastigote delgado y otro de progresión orbicular que origina tripomastigotes anchos.²

Según Brener explica que ambas formas son simplemente el resultado del polimorfismo del género *Trypanosoma*, pero que difieren en su capacidad de penetrar a las células del vertebrado, en la resistencia a la inmunidad del huésped y especialmente en la eficiencia para infectar al insecto transmisor. Así, las formas delgadas penetran con rapidez en las células del huésped, son fácilmente destruidas por el sistema inmunitario del huésped y es difícil que parasiten a un invertebrado cuando éste las ingiere. Sucede todo lo contrario con los Tripomastigotes anchos que al parecer son los únicos capaces de infectar a los triatóminos.²

Aunque se conoce muy poco la dinámica de población de los triatóminos en la naturaleza, las observaciones realizadas en insectarios permiten inferir la existencia de variaciones estacionales en la transmisión de la enfermedad, como resultado del largo ciclo vital de los insectos como de las modificaciones que sobre este determina la temperatura ambiental en la fase en la que *T. cruzi* esta dentro del insecto, durante los periodos más cálidos del año (entre 28 y 34°C) es mucho mayor la concentración de *T. cruzi* en los reducidos al mismo tiempo a temperaturas más bajas (entre 22 y 23°C) se retarda la aparición de formas metacíclicas en las especies *T. protacta* y *T. infestans* estudiadas durante varios años, el efecto de la temperatura y otros factores climáticos como la humedad relativa explica al menos en parte el incremento del número de casos de tripanosomiasis americana durante la primavera y el verano en regiones con variaciones estacionales pronunciadas.²

2.3 Antígenos de superficie de *Trypanosoma cruzi*.

T. cruzi expresa un rango de diferentes glicoproteínas y glicolípidos como antígenos de superficie, esos antígenos son característicos de cada estado de su ciclo de vida. En la forma de tripomastigote predominan las proteínas de 160, 90 y 85 kD. y otras identificadas mediante varios métodos. El de 85 kD. es una banda muy pequeña que incluye a otras proteínas en el estado de epimastigote donde se encuentra específicamente proteínas de superficie de 72 kD. Los polipéptidos o antígenos de superficie de *T. cruzi* junto con la mayoría de las células son glicosilados particularmente la molécula de 72 kD. que es un antígeno que usualmente contiene carbohidratos que son fácilmente fosforilados. Primordialmente los antígenos de *T. cruzi* están compuestos por lípidos, carbohidratos y fosfatos.⁹

La función biológica de esas moléculas de superficie no se conoce exactamente. El tripomastigote expresa numerosas moléculas de superficie como receptores algunas semejantes a las fibronectinas, colágeno y otro receptor que es una lipoproteína de baja densidad. Se cree que todas esas moléculas además de otras están implicadas en la penetración del parásito al interior de las células huésped en su ciclo de vida intracelular.

La molécula de 85 kD del tripomastigote según estudios realizados es considerado como el responsable del estado de resistencia a la activación del componente C3 convertasa y por lo tanto al complemento. Los antígenos del epimastigote principalmente el de 72 kD es importante para la diferenciación de los tripomastigotes metacíclicos en el insecto vector. Posiblemente se lleve a cabo la activación de receptores para lectinas. A pesar que todas las moléculas son importantes se encuentran otras de igual interés como las proteasas.^{9,10}

La caracterización de los péptidos de superficie se lleva a cabo utilizando sueros de enfermos con tripanosomiasis encontrando semejanza con la malaria. Estos antígenos genéticamente presentan múltiples copias en el genoma que se repiten en forma continua, en un estudio también se determinó que esta forma de *T. cruzi* regula la expresión de las diversas moléculas de superficie.^{9,10}

En los últimos años la caracterización de las distintas cepas de *Trypanosoma cruzi* existentes en México y en América ha sido de gran importancia para la clasificación y utilización de estos parásitos en distintas investigaciones, los criterios utilizados son los siguientes: caracterización inmunológica basada en la obtención y conocimiento de los distintos antígenos presentes en cada cepa, una caracterización biológica y una clasificación en base a sus zimodemos (patrones electroforéticos enzimáticos). En relación a esto Zavala y Hernández en 1990 realizaron la caracterización molecular de cepas mexicanas de *T. cruzi* con dos criterios: heterogeneidad en sitios de restricción asociados a un espaciador no transcrito del RNA ribosomal y el análisis del DNA del cinetoplasto con enzimas de restricción y demostraron la posibilidad de formar grupos de *T. cruzi* de acuerdo a su procedencia estatal, lo que da la posibilidad de su utilización futura en estudios epidemiológicos.²

2.4. Patología de la enfermedad de Chagas.

En el hombre la enfermedad de Chagas se puede presentar en 4 etapas distintas. La primera corresponde al período de incubación, durante el cual existe una proliferación de amastigotes dentro de las células hísticas, la transferencia de célula a célula en forma de tripomastigotes y la introducción de estas a la sangre y vías linfáticas. Esta fase dura de 2 a 3 semanas. La segunda etapa de la enfermedad denominada fase aguda, ocurre principalmente en niños y se caracteriza por fiebre, hepatosplenomegalia y en ocasiones taquicardia, edemas periféricos, aumento discreto del tamaño ganglionar y presencia de tripanosomas en la sangre periférica.

En un 50% de los casos se observa signo de Romaña, en un 25% de los casos la puerta de entrada está presentada por un nódulo o úlcera cutánea (chagoma) acompañada de un discreto aumento de los ganglios linfáticos regionales. Los casos mortales fallecen por miocarditis meningoencefalitis o complicaciones como la neumonía. La duración de esta fase se correlaciona con la virulencia de la cepa, observándose que mientras más virulenta es la cepa, menor es el tiempo de incubación así como de la fase aguda.

En las regiones endémicas la infección se adquiere en los primeros años de la vida; por lo tanto, la tasa de infección aumenta con la edad, debido al mayor tiempo de exposición. Aunque la infección y la enfermedad son similares en uno y otro sexo, la mortalidad es mucho mayor en el sexo masculino. La mortalidad generada por la parasitosis varía con diversos factores, entre ellos el período clínico, la edad y el estado general e inmunitario del enfermo y seguramente, la virulencia de la cepa de *T. cruzi* involucrada en la infección.¹¹

En la etapa aguda el pronóstico es más grave para los niños menores de 2 años, entre quienes suele haber una elevada tasa de mortalidad en la tripanosomiasis aguda. En la niñez es de 10%, este índice es más elevado en caso de infección intrauterina, donde *T. cruzi* se disemina a prácticamente todos los órganos y muy pocos pequeños sobreviven, se considera que aproximadamente el 76% de los niños afectados por tripanosomiasis fallecen antes de alcanzar el cuarto mes de edad. La forma latente en la enfermedad de Chagas es la denominada asintomática o indeterminada, es decir que se presenta en individuos aparentemente sanos, existe parasitemia baja, según unos autores debida a la multiplicación intracelular constante de parásitos en varios órganos. La forma inaparente puede ser de período corto o prolongarse para finalmente desarrollarse en enfermedad crónica, en esta fase indeterminada desaparece la sintomatología y el individuo se considera curado. Sin embargo, la serología es positiva y si se estudia adecuadamente se pueden encontrar signos clínicos sugestivos de miocarditis, desde hace tiempo algunos autores indican que se trata de la forma más frecuente e importante desde el punto de vista epidemiológico, ya que aproximadamente el 25% de los pacientes con tripanosomiasis permanece indefinidamente en la fase "indeterminada".¹¹

En la forma crónica o cardíaca de la enfermedad de Chagas se manifiesta casi siempre en personas de 20 a 50 años, la miocardiopatía Chagásica crónica avanza de forma natural hacia la insuficiencia cardíaca, pero aunque en las áreas endémicas frecuentemente se ve interrumpida por la muerte súbita, según Pinto y Díaz alrededor del 40% de los casos muestran una evolución benigna permitiendo una sobrevida del enfermo hasta los 60 años o más. Los casos graves de cardiopatías Chagásica crónica ocurren más comúnmente en la tercera y cuarta décadas de la vida, lo que es un factor importante de mortalidad en esas edades.^{11,12}

En varios hospitales latinoamericanos se ha encontrado que durante la fase crónica se presenta también la forma digestiva que es el megaesófago y megacolon endémicos de algunas regiones de Brasil, los pacientes con megacolon presentan entre 90 y 95% de positividad a la reacción de Machado-Guerreiro. En las alteraciones histológicas de megaesófago y megacolon se observan desaparición de células nerviosas y la presencia de reacciones inflamatorias con desintegración de fibras musculares.^{13,14} Es posible que en el humano la autoinmunidad debida a *T. cruzi* juegue una parte importante en la enfermedad de Chagas, el primer anticuerpo descubierto en el suero chagásico presenta reactividad cruzada con endocardio normal, estructuras vasculares e intersticiales y tejido cardíaco. Se ha descubierto en estudios realizados una reactividad cruzada a neuronas, células de Schwann, mielina, músculo estriado, además en el suero de pacientes con enfermedad de

Chagas han sido demostrados varios polipéptidos, lípidos sulfatados y carbohidratos, además de epitopos de tejido normal que son reconocidos por ese suero.^{12,15}

Existe evidencia para explicar las diferentes rutas de autoinmunidad debida a *T. cruzi* ya que se han detectado antígenos compuestos para células del huésped; durante la división intracelular aquí el parásito altera las moléculas de superficie y absorbe las del huésped. Finalmente *T. cruzi* infecta tejidos celulares expresando los antígenos del parásito. Durante la infección por *T. cruzi* especialmente durante las fases latente y crónica es detectable una baja parasitemia perpetuándose una reactividad cruzada de autoestímulos. En adición con una producción de autoanticuerpos, además de una autoreactividad de células T citotóxicas a músculo cardíaco. La infección dada por *T. cruzi* no es igual a la ocasionada por otros parásitos, ya que esta causa inmunosupresión que ocurre en la fase aguda⁸ además existe evidencia de autoanticuerpos de la enfermedad de Chagas crónica que son reactivos a proteínas ribosómicas, y en estudios en conejos y en ratón estas proteínas inducen miocarditis. Asimismo existen anticuerpos antihistonas que son reactivas en sueros de pacientes con enfermedad crónica.¹⁶

Algunos autores han planteado la hipótesis que los antígenos de *T. cruzi* pueden estimular directamente a las células T, dando lugar a la liberación de factores supresores que a su vez interfieren con la respuesta a ciertos antígenos. A este respecto señalan una fracción proveniente de tripomastigotes metacíclicos y se denomina T-DAF, es una glicoproteína de 87 a 93 kD. esta confiere resistencia al parásito para la lisis e interfiere en el ensamblaje de la C3 convertasa en la superficie del parásito.¹⁷

La inmunosupresión frente a *T. cruzi* es considerada como un método de evasión para la inmunidad del huésped hacia la infección. Norris et al señalan una evasión de la actividad del complemento que esta representada por el decaimiento en el factor C3 convertasa (DAF); además de una actividad regulatoria a partir de una glicoproteína de tripomastigote denominada gp-160, se demostró que esta proteína restringe la actividad regulatoria por unión del complemento C3b y por lo tanto se produce una inhibición de la formación de la C3 convertasa. Bach et al señalan que la evasión del complemento dada por el decaimiento del factor C3 convertasa se lleva a cabo simultáneamente con un mecanismo de digestión por parte del tripomastigote^{18,19}

2. 5 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

En el período agudo de la enfermedad generalmente hay leucocitosis moderada con predominio de mononucleares. La linfocitosis puede ser muy elevada, particularmente en los niños. Los eritrocitos y la hemoglobina descienden a veces en forma importante, aunque por lo común sólo se aprecia anemia moderada. Ocurre además hipergammaglobulinemia. Por otra parte la visualización directa de *T. cruzi* se hace mediante la observación directa de frotis de sangre periférica teñidos con Giemsa metodología útil en la fase aguda. El

aislamiento se realiza mediante hemocultivo, xenodiagnóstico en el que según algunos autores son más adecuadas las ninfas hembras ya que succionan mayor cantidad de sangre.²⁰

Pero según Venegas et al el xenodiagnóstico presenta muy poca sensibilidad comparado con la inmunofluorescencia indirecta (IFI) que presenta un 100% de positividad en sueros de pacientes de las áreas endémicas de Bolivia²¹. Asimismo otros autores señalan que el IFI unido a ELISA, fijación del complemento (FC) y electroforesis (EP) proporcionan entre un 94.6 a 99.2% de positividad y ELISA unido a EP detecta un 96% de los sueros de pacientes con infección aguda.²²

Otros investigadores recomiendan el ensayo ELISA utilizando mezcla de antígenos obtenidos de membranas y citoplasmas de los parásitos y proporciona mejores resultados comparado con otros métodos²³ de igual forma otros proponen ELISA usando péptidos sintéticos²⁴, antígenos solubilizados que presentan un sensibilidad 8 veces mayor a los antígenos comúnmente utilizados.²⁵

Para diagnosticar la fase aguda de la enfermedad de Chagas otros autores indican que el Q.B.C. (Quantitative Buffy Coat) posee un alto grado de sensibilidad Wincker et al indican que el Q.B.C. presenta un especificidad y sensibilidad semejante a PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) que también es altamente específica para la infección aguda.²⁶

Los métodos serológicos más utilizados para el diagnóstico de la tripanosomiasis crónica son la hemaglutinación directa (H.A.I), inmunofluorescencia indirecta (I.F.I), aglutinación directa (A.D.) y ELISA con algunas variantes.²⁷ Además existen otras técnicas que proporcionan mayor sensibilidad como es el caso de ELISA unido a HAI que proporciona una sensibilidad del 94%, el IFI unido HAI proporciona un 95% de sensibilidad, probablemente el diagnóstico más riguroso y promisorio es aquel que involucra el uso de DNA obtenido a partir de cinetoplastos de tripanosomas (PCR).^{28,29}

Lorca et al demostraron que el uso de DNA recombinante es útil para diagnosticar la enfermedad de Chagas en su fase crónica a partir de la reactividad de IgG específico.³⁰ Así mismo diversos investigadores recomiendan el uso del hemocultivo en la rutina diagnóstica además del xenodiagnóstico y sobre todo IFI según ellos proporcionan un 100% de sensibilidad siendo menor las dos técnicas anteriormente mencionadas.³¹

En otros reportes se ha identificado dos clones recombinantes de *T. cruzi* llamadas A13 y H3 las cuales han sido utilizada como antígenos para el corrimiento de sueros provenientes de las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas.³² Se ha descrito además el antígeno H49 identificado en el suero de pacientes infectados con *T. cruzi*, este antígeno posee alta afinidad para proteasas, además ha sido detectado en orina y sangre de animales y de personas infectadas, esta proteína ha sido comparada con sueros provenientes de enfermos de *T. cruzi* por técnica de Westernblott indicando que este estudio puede ser útil para la evaluación de susceptibilidad al parásito y tratamientos farmacológicos^{33,34,35}

Además recientemente se ha utilizado un kit comercial denominado EIA (también denominado Kit-Bio-chagas; que representa 100% de especificidad para determinar reactividad cruzada frente a malaria y a leishmanias asimismo es útil y presenta la misma

sensibilidad para el diagnóstico de donadores de sangre, además para las fases aguda y crónica de la tripanosomiasis ^{36,37,38}. Comparado con xenodiagnóstico presenta un 100% de sensibilidad y es específico también para otras enfermedades infecciosas EIA presenta una especificidad mayor a la de otros kits comerciales utilizados en Latinoamérica ³⁹.

Otros investigadores señalan como más adecuada la técnica de ELISA utilizando antígenos crudos de *T. cruzi* y además los Mab son adecuados para determinar reactividad cruzada en los bancos de sangre ⁴⁰. En otras investigaciones se indica que HAI unido a aglutinación directa con 2 mercaptoetanol (ADE-2ME) dan sensibilidad superior al 90%. Han sido analizados recientemente sueros de pacientes portadores de megacolon chagásico por las técnicas HAI y AD2ME encontrando 89.2% de los pacientes portadores del parásito confirmando que la ausencia de anticuerpos circulantes la etiología no puede ser descartada.⁴¹ En otro trabajo experimental realizado en humanos con megacolon chagásico antes y después del tratamiento quirúrgico se determinaron anticuerpos tipo IgA por la técnica de ELISA teniendo como antígeno TDAF representando especificidad y sensibilidad entre 94.5 y 100%, así mismo señalan que los antígenos de extracto total de formas de epimastigotes y antígenos semi purificados por cromatografía son útiles para diferenciar infecciones entre *T. cruzi* y leishmaniasis visceral por lo que pueden ser utilizados para fines de diagnóstico en los bancos de sangre. Recientemente el antígeno TDAF ha sido purificado por ELISA y comparado con IFI y HAI, se ha encontrado que este antígeno es de gran utilidad para descartar reactividad cruzada en infecciones por leishmanias. ^{42,43}

Los anticuerpos monoclonales presentan sensibilidad superior al 90% para determinar reactividad cruzada entre *T. cruzi* y otras especies como *T. rangeli* y *Leishmania braziliensis* ellos son Mab específicos para el anticomponente 5 de *T. cruzi* que son de utilidad para tal fin ^{43,44}. A su vez otros autores indican la utilidad de la técnica de Dot-ELISA para diagnosticar reactividad cruzada de la enfermedad de Chagas y Kala azar. ⁴⁵ Se ha encontrado que Dot-ELISA posee sensibilidad mayor a FC y ELISA estándar. ^{46,47}

Para evaluar el estado silencioso de la enfermedad de chagas han sido estudiados pacientes seropositivos a *T. cruzi* utilizando tuberculinas como testigos, se encontró especificidad en las respuestas, además se resalta la reactividad a las tuberculinas y a la vacuna BCG. ⁴⁸

Las técnicas de diagnóstico disponibles en México Son: a) diagnóstico parasitológico: examen directo, gota gruesa, Strout y microStrout, inoculación de animales, hemocultivo y xenodiagnóstico b) diagnóstico serológico: aglutinación directa, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta, ELISA clásica y DOT-ELISA. ²

2.6 Tratamiento de la enfermedad de Chagas .

El tratamiento se considera adecuado durante la etapa aguda, cuando las formas sanguíneas y tisulares de *T. cruzi* son causantes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, y por el contrario en la fase crónica durante la que existen una serie de mecanismos autoinmunitarios en la que se produce destrucción de las fibras del miocardio y del sistema conductor y reemplazo por tejido fibroso. No obstante los pacientes crónicos con xenodiagnóstico positivo y títulos elevados de anticuerpos se negativisan con el uso de medicamentos como alopurinol e itraconazol.^{49,50} Aunque existen otros medicamentos tradicionalmente utilizados como el nifurtimox, derivado de los nitrofuranos y otros como nitrofurano 2-5 y imidazol, además benznidazol o imidazol que al parecer lleva a cabo un efecto benéfico en humanos. Por otra parte en animales de laboratorio se ha determinado un efecto terapéutico adecuado con el fluconazol e itraconazol durante las fases aguda y crónica de la tripanosomiasis.⁵¹

Las sustancias tripanosomáticas potentes, actúan tanto a nivel sanguíneo como tisular. Es por ello que en algunos lugares de Sudamérica se prefiere al nifurtimox para el tratamiento en la fase crónica de la enfermedad , ya que aducen que el efecto supresivo es aparentemente superior . Basándose en estudios realizados y por la experiencia del grupo de Velasco Castrejón en México el tratamiento específico en la etapa crónica mejora en forma importante la calidad de vida del enfermo y el cuadro clínico de la enfermedad ²⁷.

Ruiz et al en estudios referentes a evaluar la actividad de las plaquetas durante el curso de la infección por *T. cruzi* en ratones Balb/c previamente infectados, sugieren que la pérdida de las plaquetas puede ser causa de muerte durante la etapa aguda de la enfermedad.⁵² Fernández et al realizaron estudios basándose en las observaciones de Umekita y Mota en 1990 que sugieren la participación de las plaquetas en el mecanismo de eliminación de los tripomastigotes de la corriente sanguínea, estos autores indican que el dipiridamol asociado a la aspirina (AAS) son capaces de inducir la lisis de los parásitos y la agregación ^{53,54,55} Alvarez et al hicieron estudios sobre la eliminación de *T. cruzi* en ratones infectados inmunosuprimidos tratados con ciclofosfamida e inmunosuprimidos por radiación ellos concluyeron que existe una selección durante la fase aguda de la enfermedad que incrementa la resistencia del parásito aun con la existencia de anticuerpos ⁵⁶

Estudios realizados en ratas infectadas con *T. cruzi* se sugiere que existe una restauración blastogénica a CON-A (Concanavalina-A) de esplenocitos en respuesta a cimetidina, además se demostró una amplificación de la respuesta inmune CON-A de los animales infectados restaurándose la respuesta mitogénica ⁵⁷. En otro estudio se ha demostrado la citotoxicidad de células natural Killer (NK), existe un aumento de la actividad de dichas células al examinar infiltrados inflamatorios de ratones infectados con *T. cruzi*, se sugiere que dichas células pueden participar en defensa del hospedero y también a contribuir al no agravamiento de las lesiones⁵⁸

III. LA RESPUESTA INMUNE

La inmunidad generalmente supone una resistencia y un mecanismo de reconocimiento específico por el cual el organismo está capacitado para reconocer moléculas como propias o extrañas y a su vez destruirlas. Las células involucradas en la respuesta inmune se encuentran organizadas en tejidos y órganos para realizar sus funciones de la forma más efectiva. Dichas estructuras en conjunto son conocidas con el nombre de sistema linfóide y está integrado por los órganos primarios (timo y médula ósea) que son los sitios principales de linfopoyesis, en ellos los linfocitos se diferencian desde las células linfoides primarias hasta las células efectoras funcionales, a través de un proceso de proliferación y maduración, asimismo los linfocitos adquieren sus receptores de superficie específicos con el fin de hacer frente a los estímulos antigénicos que un organismo lleva a cabo durante toda su existencia. Los órganos linfoides secundarios incluyen el bazo, ganglios linfáticos y el tejido linfóide asociado a mucosas, en estos sitios es donde es generada la respuesta inmune llevada a cabo por la interacción entre los linfocitos y los antígenos presentados por las células accesorias, desencadenando así la respuesta inmune.

Respuesta inmune es iniciada por un estímulo (antígeno o inmunógeno) es seguida de una serie de eventos complejos que culminan con la eliminación de la partícula extraña. El sistema inmune como mecanismo de defensa puede dividirse en dos: el innato y el adaptativo. La inmunidad innata actúa como primer mecanismo de defensa frente a agentes infecciosos y la mayoría de los agentes patógenos pueden ser controlados mediante este mecanismo, si esta primera línea de defensa es superada se activa el sistema inmune adaptativo que se distingue por su alta especificidad para cada agente infeccioso, el cual normalmente basta para erradicarlo, además, este sistema adaptativo guarda memoria del agente y puede impedir que cause enfermedad más tarde.^{59,60}

A). La respuesta inmune celular

La reacción mediada por células se inicia al fijarse un antígeno a un receptor en la superficie de un linfocito T sensibilizado; esto puede producirse de manera directa o estar mediado por un antígeno unido a macrófago en asociación con determinantes propios, esta es una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, ya que sólo de esta forma podrá ser reconocido por el subgrupo de células T denominadas células T colaboradoras (TH). Estas células TH son las que inician la respuesta inmunitaria, ya que activan a las células principales efectoras de la respuesta denominadas células citotóxicas (TC) y las células B precursoras del anticuerpo.

La activación de las células colaboradoras TH requiere por lo menos de dos señales: La unión del receptor de la célula T para el antígeno con el complejo antígeno-molécula clase II del MHC, sobre las células presentadoras de antígeno APC, (que son las que capturan al antígeno o inmunógeno para ser procesado y reconocido posteriormente por las células colaboradoras) y la señal que proviene de la interleucina 1 (IL-1) que es una proteína producida por las APC. Estas dos señales unidas inducen la expresión para la

producción de otra linfocina, interleucina II (IL-2), así como la producción de factores de crecimiento y diferenciación celular, las citocinas, que son muy importantes para activar a las células B y los macrófagos.

Se ha comprobado que la IL-2 induce el crecimiento de las células TH que la producen y de las células TC que, de ordinario no la producen, la función principal de la IL-2 es amplificar la respuesta iniciada por el contacto de las células TH con las APCs. Las células TH activan a las células TC cuya función principal es matar células que expresen antígenos extraños. Las células TC al igual que las TH requieren de dos señales de activación. Una está dada por la interacción de los receptores de la célula T para el antígeno con un complejo de un epítopo extraño biosintetizado y molécula MHC clase I sobre la célula diana; estas células pueden ser tumorales o infectadas con virus. La segunda señal está dada por la IL-2 producida por la célula T activada, esta liberará entonces citocinas que matarán a la célula diana.⁶⁰

B). Respuesta inmune humoral

Las células diferenciadas multipotenciales, se diferencian en células capaces de poner en marcha una respuesta inmune humoral cuando encuentran un microambiente adecuado, en este proceso interviene la interleucina III (IL-3), que hace que un prelinfocito madure en linfocito. Cuando un precursor de linfocito B madura en linfocito B, que expresa receptor para antígeno (inmunoglobulina de superficie), pierde sus receptores para IL-3. Cuando las células indiferenciadas encuentran el microambiente para adquirir competencia inmunológica se transforman en linfocitos B, que se caracterizan por poseer insertadas en su superficie moléculas de inmunoglobulinas (Ig-sup). Después de una estimulación antigénica, los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas, que sintetizan y excretan anticuerpos, constituidos por moléculas de inmunoglobulinas con una estructura idéntica a la Ig-sup expresado por el linfocito B del que provienen.

La mayor parte de los antígenos al ser inoculados inducen la formación de anticuerpos, pero existe una diferencia notable entre una primera dosis de antígeno y en las reestimulaciones; los experimentos realizados demuestran que cuando un antígeno penetra por primera vez en el receptor, la concentración de anticuerpos aumenta en forma progresiva, hasta un nivel determinado, para descender luego más o menos rápidamente según los casos, por lo general la tasa de anticuerpos aumenta con las reestimulaciones, hasta llegar a un límite, pasado el cual ya no hay más aumento.⁵⁹

En la producción de anticuerpos primeramente las células TH se activan, mientras que las células B específicas se unen al antígeno a través de sus receptores dándose en seguida la endocitosis del complejo antígeno-receptor, que al parecer proporciona la señal de activación; sin embargo esta es suficiente para la activación total de las células B quienes requieren señales adicionales de las células TH. Dichas señales adicionales son citocinas. La primera se denomina factor de crecimiento para la célula B; que junto con el antígeno estimula la proliferación de las células B; y la segunda denominada factor de diferenciación de las células B, induce a estas células B activadas a diferenciarse hacia células plasmáticas

secretoras de anticuerpo. Una fracción de células B prolifera, pero no se diferencia hacia células plasmáticas, quizá se debe a que no reciben suficiente factor de diferenciación, tales células B forman un grupo de fondo común de células de memoria, que pueden responder a encuentros subsecuentes con el antígeno.⁶¹

Durante la proliferación de las células B actúan diferentes linfocinas como son: la IL-2 que puede inducir el incremento en la producción de anticuerpos y proliferación en los linfocitos B normales, asimismo la interleucina-4 (IL-4), que interacciona con la IL-2 para estimular el crecimiento de las células B, la IL-4 induce incrementos rápidos en la expresión membranal de antígenos MHC clase II y receptores para FC de IgE, además la IL-4 induce la producción de diferentes isotipos de IgG por las células B estimuladas por (lipopolisacárido) LPS. La interleucina -5 (IL-5) tiene una actividad promotora en el incremento de las células B. Se ha encontrado que la IL-5 murina promueve el crecimiento de las células B activadas y en combinación con la IL-2 estimula la proliferación celular, asimismo como promueve la producción de anticuerpos, en especial IgA. La interleucina-6 (IL-6) es un factor estimulador de la serie B, además de un agente de diferenciación o maduración que promueve la capacidad de células B activadas para secretar inmunoglobulinas.⁶¹

3.1 Las células T y B.

Los linfocitos T son necesarios para regular la producción de inmunoglobulinas, mediar la hipersensibilidad tardía y destruir células infectadas por virus. Las células T se desarrollan en el timo, las células pluripotenciales provenientes de la médula ósea entran a la corteza tímica y al dirigirse a la médula ósea sufren una serie de diferenciaciones inducidas por el estroma tímico que están relacionadas con la expresión diferencial de diversas moléculas T y la adquisición de ciertas funciones relacionadas con la expresión de moléculas de superficie específicas designadas con las letras CD seguida de un número, CD1, CD2, etc. y pueden detectarse mediante anticuerpos monoclonales específicos.

Antes de pasar por el timo las células madre tardan 3 días en pasar a la circulación periférica y de ahí a los tejidos linfoides secundarios, esta migración se encuentra regulada por las moléculas de superficie de las células T circulantes y por las células endoteliales superiores.

Uno de los primeros métodos para diferenciar entre las células B y T se basó en la capacidad de las primeras en unirse a eritrocitos de carnero mediante la molécula CD2. Sin embargo, el marcador definitivo de los linfocitos T es su receptor antigénico TCR. En la actualidad se conocen 2 tipos diferentes de TCR, TCR1 y TCR2. Ambos receptores se asocian al complejo de polipéptidos CD3, por lo cual la célula CD3 se define como TCR1 o TCR2, en asociación con CD3.

Aproximadamente el 95% de las células T sanguíneas expresan TCR2 y hasta 5% poseen TCR1. Las primeras pueden dividirse a su vez en 2 poblaciones diferentes que no se

superponen; la subpoblación TH, que es CD4, la TC que es CD8, las células TCD4 reconocen a los antígenos en asociación con moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) mientras que las células TCD8 reconocen a los antígenos en asociación con moléculas del MHC de clase I.

La serie CD4 se divide funcionalmente en: células que influyen positivamente sobre la respuesta inmunitaria de las células T y B, es decir, con una función cooperadora y las que inducen funciones supresoras/citotóxicas en las células CD8, esto es, con una función inductora de la supresión. Empleando otros criterios la serie CD4 se puede subdividir en las que expresan marcadores propios que expresan marcadores de células agresoras naturales (NK), producen la linfocina interleucina-2 (IL-2) y no proliferan en respuesta a los antígenos y a mitógenos. Recientemente se ha podido definir 2 poblaciones distintas TH1 y TH2 basándose en la producción de diferentes linfocinas en estudios de clones CD4 realizados en humanos y en ratones.

Por otra parte la población de células TCD8 puede subdividirse también tomando diversos criterios, principalmente utilizando anticuerpos monoclonales (Mab), específicos, que permiten agruparlas en subclases y funciones específicas. Así las células que reconocen al antígeno en asociación con moléculas MHC y que producen IL-2 y otras que no reconocen a dicho antígeno ni producen IL-2.

Las células B se desarrollan de una célula madre pluripotencial que puede generar todos los diferentes tipos de células hematopoyéticas. Las células precursoras de B que se forman en el hígado fetal y en la médula ósea carecen de productos de inmunoglobulina, pero muestran otros antígenos de superficie que pueden ser fácilmente identificadas con Mab específicos. Estas células se dividen y se convierten rápidamente en linfoblastos grandes con cadenas μ pesadas citoplásmicas, pero sin cadenas ligeras.

Los linfocitos B representan alrededor del 5 al 15 % del reservorio linfoide circulante, y se definen clásicamente por representar inmunoglobulinas como proteínas integrales en la superficie de la membrana en la que actúan como receptores específicos para el antígeno.

La mayoría de las células B llevan antígenos MHC de clase II, importantes para cooperar con las células T. Esos antígenos son IA-IE en el ratón y HLA-DP, DQ y DR en el hombre. En las células B se hallan comúnmente receptores del complemento para C3b y C3d, también están presentes los receptores Fc para IgG. Las moléculas CD19, CD20 y CD22 son los principales marcadores utilizados en la actualidad para identificar células B humanas.⁶⁰

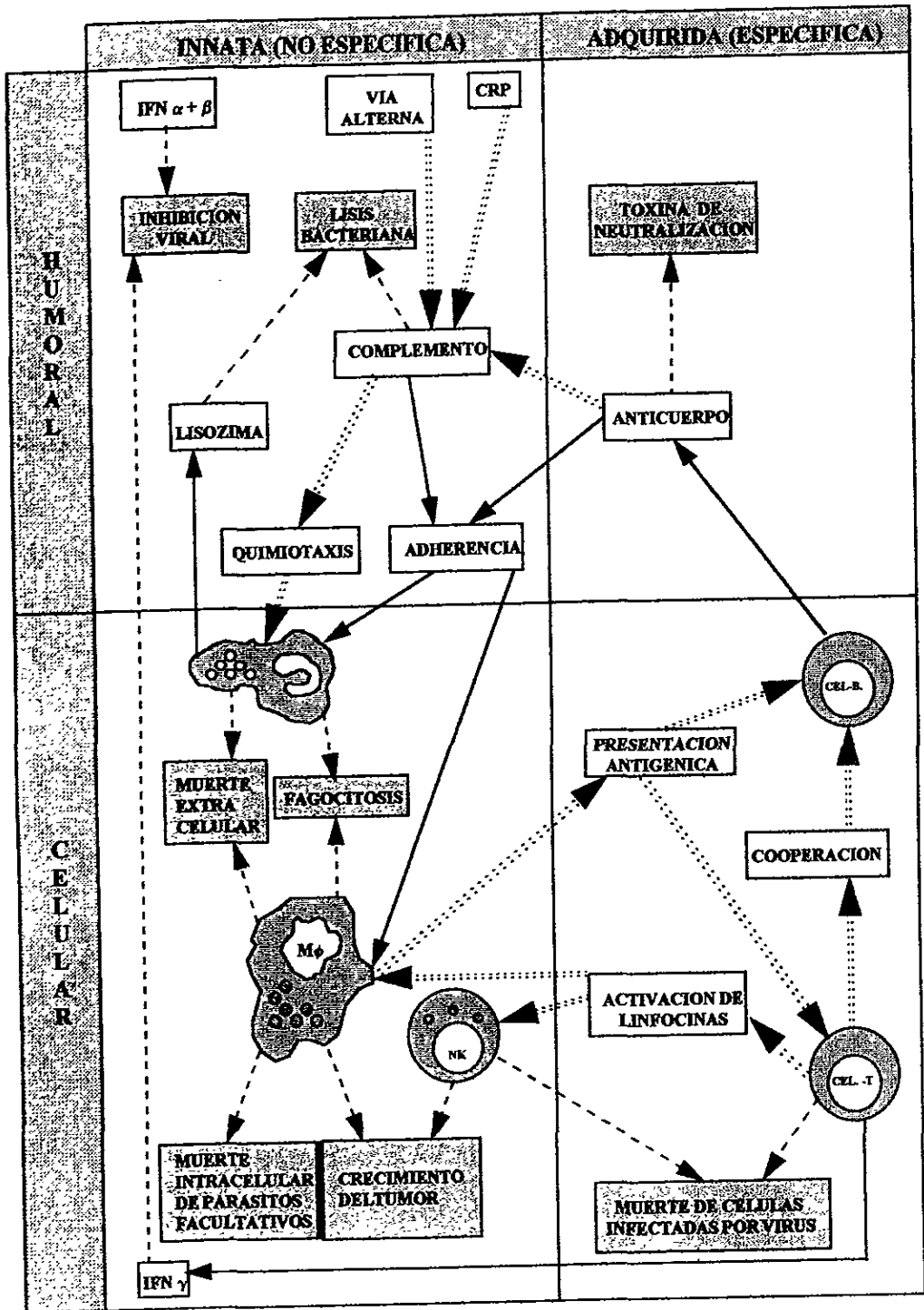


FIG. 4 EVENTOS LLEVADOS A CABO EN LA INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR (ROITT 1991) (4)

3.2 El timo.

El timo es un órgano linfoide de color blanco, situado por detrás del esternón en la parte superior del tórax. En la mayoría de las especies, se compone de 2 lóbulos, cada uno de ellos se divide en lóbulos más pequeños por tabiques de tejido conjuntivo que sirven de soporte a grandes vasos. El tamaño de los lóbulos varía con el tamaño del timo (0.5 a 2 mm), estos lóbulos se componen de 2 partes una periférica, que es una corteza muy rica en linfocitos, y una parte medular que es menos rica en linfocitos y de color más claro.

El timo es el primer órgano linfoide que aparece en la mayoría de los mamíferos de todas las especies, es una glándula de secreción interna que produce hormonas timicas timosina, factor tímico y timopoyetina, estas tienen la función de maduración, especialización y producción de las células T.(fig.4). El tamaño del timo en el hombre es mayor al nacer, momento en que pesa alrededor de 13g y en la pubertad alcanza hasta los 30g, en la vida adulta experimenta atrofia y sustitución por tejido adiposo. Las células epiteliales forman agrupaciones concéntricas llamadas corpúsculos de Hassal. En estudios experimentales se ha revelado que la timectomía neonatal interfiere en el desarrollo del sistema linfoide, altera la capacidad inmunológica llamada inmunidad celular, y bajo ciertas circunstancias disminuye la respuesta humoral. Las consecuencias de la timectomía son menos graves en el animal adulto, pero existen evidencias de que el timo continúa proporcionando un mecanismo por el que las células no formadas inmunológicamente adquieren la capacidad de responder a inmunógenos específicos. Las células derivadas del timo desempeñan un papel regulador, influyendo en forma positiva o negativa en la función de las células B y mediando la respuesta de los macrófagos.⁶²

La extirpación quirúrgica del timo en animales adultos ocasiona linfopenia generalizada sin mayores alteraciones sobre la respuesta inmune. Si la ausencia del timo en el animal adulto no parece traer consecuencias inmunológicas graves, la timectomía en el feto o en recién nacido es una catástrofe sobre todo en la inmunidad celular y en menor grado la inmunidad humoral, los hallazgos más importantes en el animal timectomizado son la enfermedad de desgaste caracterizada por pérdida de peso, diarrea, somnolencia y lesiones epidérmicas acompañadas de linfopenia generalizada e infecciones múltiples, que frecuentemente conducen a la muerte, en la inmunidad celular aceptan aloinjertos sin desarrollar hipersensibilidad celular, además los animales timectomizados presentan una mayor susceptibilidad a desarrollar tumores inducidos experimentalmente con agentes vírales o con hidrocarburos. Estas alteraciones vuelven a lo normal o no se presentan, si el animal recibe un injerto de timo o de células esplénicas o ganglionares de animales no timectomizados.⁶³

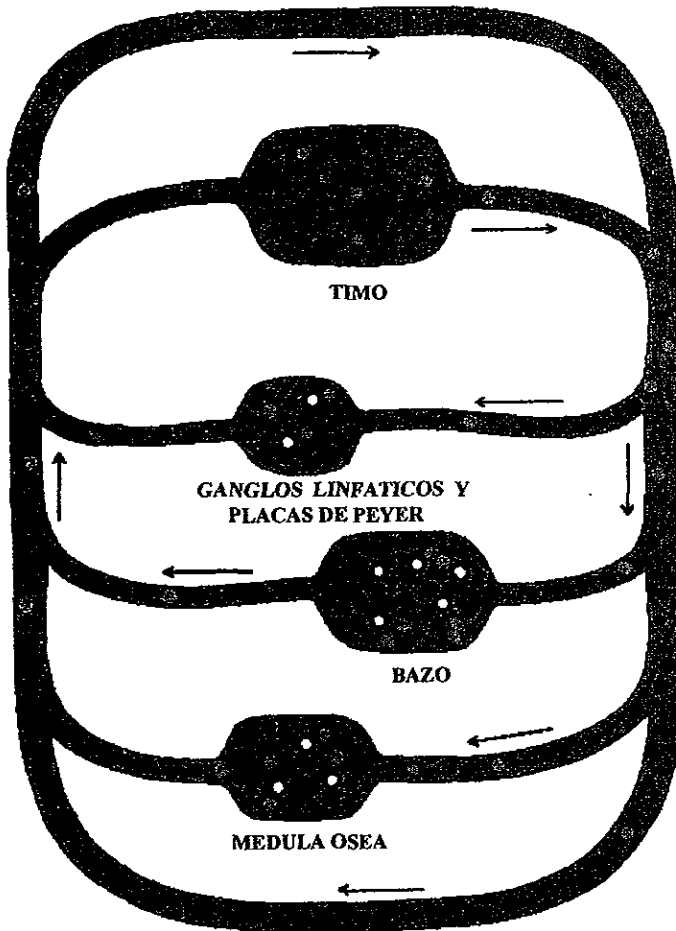
La influencia en el ratón desnudo o en la posttimectomía en ratones de un año de edad, timectomía neonatal en ratas no excluye las propiedades que dependen del timo en esos animales. En el ratón desnudo es expresada la actividad de células de bazo y son descritos diversos estados de maduración de las células T⁶². En el ratón desnudo algunas de

las funciones de las células T son restauradas con el uso de extractos tímicos además la restauración de la células T mitogénicas y la respuesta de las PFC.^{62,63}

En los ratones desnudos y los normales son utilizados extractos de timosina y la fracción 5 que también es utilizada en animales diversos, Thurman et al indican que el uso de la fracción 5 de timosina administrada *in vivo* induce la respuesta de células T mitógenas y poblaciones celulares de bazo en el ratón desnudo. Grupos de investigadores reportan la generación de un supresor de células en el bazo de ratón desnudo y normal después del efecto *in vivo* de la administración de hormonas tímicas. Diversos autores reportan que en ratones timectomizados al nacer las células T responden *in vitro* a PHA (fitohemaglutinina) dicha estimulación y reactividad permanece por semanas y hasta por un año.^{62,63}

Algunos factores sugieren que el control tímico tiene gran influencia sobre la maduración de las células pre-T el potencial del bazo es sugerido para este proceso por Goldstein. Además en contraste con la prolongación de la vida en ratas, ratones y puercos de guinea es observado un efecto contrario en otros animales al utilizar extractos tímicos de origen fetal.^{62,63}

FUNCION INMUNOLOGICA DEL TIMO



AL NACER, LA MAYORIA DE LOS LINFOCITOS RESIDE EN EL TIMO; EN LOS DEMAS ORGANOS LINFoidES HAY ALGUNOS, JUNTO CON CELULAS PRECURSORAS (CIRCULOS). LOS LINFOCITOS SON INCOMPETENTES (PUNTOS GRISES), INCAPACES DE REACCIONAR A ANTIGENOS, HASTA QUE NO HAN SIDO EXPUESTOS A UN FACTOR HUMORAL ORIGINARIO DEL TIMO (FLECHAS NEGRAS). EL FACTOR HUMORAL SE TRASLADA POR EL TORRENTE SANGUINEO HASTA OTROS TEJIDOS LINFoidES Y PRODUCE ALLI LINFOCITOS COMPETENTES (PUNTOS NEGRAS) QUE PUEDEN CONVERTIRSE EN CELULAS PRODUCTORAS DE ANTIGENO. (64)

FIG. 5

3.3 Las Inmunoglobulinas.

Las inmunoglobulinas son anticuerpos de origen glicoprotéico capaces de reaccionar específicamente con el antígeno que estimulo su producción, las inmunoglobulinas constituyen el 20 % de las proteínas totales del suero, una proporción variable de ellas tiene actividad de anticuerpo. Todas las inmunoglobulinas tienen patrones estructurales semejantes, con una gran diversidad de propiedades antigénicas de secuencias de aminoácidos. Estructuralmente se encuentran formadas por cadenas polipeptídicas ligeras (pequeñas) y pesadas (grandes). Cada cadena consta de una porción amino terminal variable (v) y de una porción carboxilo constante ©, cada una de ellas está genéticamente determinada, a su vez las cadenas pesadas y ligeras se encuentran unidas por enlaces disulfuro, las cadenas se encuentran plegadas en tres dimensiones con enlaces disulfuro para formar dominios variables y constantes (fig. 5).

Desde el punto de vista molecular se ha comprobado, a partir de extractos de células esplénicas y de nódulos linfáticos, que la biosíntesis de las cadenas ligeras (L) es llevada a cabo en los ribosomas, mientras que la de las cadenas pesadas (H) se presenta en los polisomas. La síntesis de la cadena L dura de 30 a 40 segundos y la de las H de entre 60 a 90. Las cadenas H y L son sintetizadas como precursores que contienen un péptido hidrofóbico adicional de aproximadamente 20 residuos secuencia que juega un papel en la unión al retículo endoplásmico en el momento del ensamblaje.⁶⁵

Varias clases de cadenas L y H han sido descritas, pero solo hay dos tipos principales de cadenas L en el hombre, las cadenas kappa (k) y las cadenas lambda (λ), distinguibles serológicamente por su secuencia de aminoácidos. Cualquier tipo de cadena puede estar asociada con cada una de las cadenas pesadas. Aproximadamente un 70% de las moléculas de inmunoglobulinas humanas portan cadenas kappa y un 30 % cadenas lambda. Cada una de las cinco clases de inmunoglobulinas tienen un conjunto antigénico de cadenas H (isótopos) con un peso molecular de 50000 a 70000, los cinco tipos de cadenas se denominan gamma (γ) en IgG para la IgA alfa (α); en la IgM cadena mu (μ), en la IgD cadena delta (δ); y en la IgE cadena épsilon (ε).^{59,65}

A). Inmunoglobulina IgG

La IgG es una sola unidad básica de inmunoglobulina con cadenas γ, comprende el 75 % de las inmunoglobulinas en los sueros normales. Cada molécula de IgG consta de dos cadenas ligeras y de dos cadenas pesadas ligadas por 20 a 25 enlaces disulfuro. Existen 4 subtipos diferentes de IgG basadas en las diferencias de las cadenas H. Cada molécula de

INMUNOGLOBULINA IgG

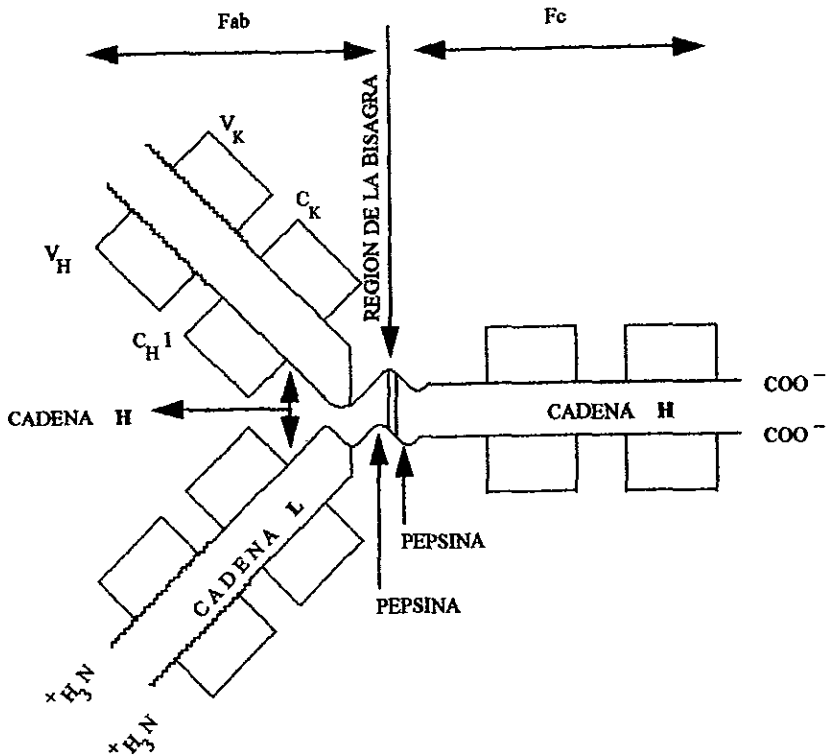


FIG 6 - Modelo simplificado de una molécula de anticuerpo IgG1 (k) humana que muestra la estructura básica de cuatro cadenas o dominios (V_H,C_H, etc) V indica la región variable; C indica la región constante, además se muestran los sitios de ruptura de la enzima pepsina Fab y Fc (Stites 1993). (58)

Ig G tiene un solo tipo de cadena L y un tipo de cadena H; probablemente las moléculas de IgG tienen una forma de Y con una bisagra cercana a la mitad de la cadena H que une a los segmentos Fab a los segmentos Fc (fig. 6).

La IgG es la primera inmunoglobulina sintetizada durante la respuesta secundaria, debido a capacidad para atravesar placenta ofrece una línea de defensa primordial contra las infecciones en los recién nacidos; la región Fc de la IgG se une a los receptores específicos de las células fagocitarias como son los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares, aumentando así la eficiencia de las células fagocíticas para que puedan ingerir agentes infectantes extraños que han quedado cubiertos por los anticuerpos IgG producidos por la respuesta a la infección. Además de unirse a las células fagocíticas, la región Fc de las moléculas IgG puede unirse activando, el primer componente del sistema del complemento que bajo estas circunstancias desata un ataque bioquímico que mata al microorganismo.⁵⁹

B). Inmunoglobulina IgM

Es la proteína más grande, contiene 576 aminoácidos y una masa de 950,000 daltones. La IgM es el primer anticuerpo en un animal o ser humano recién nacido, constituye el 10 % de las inmunoglobulinas del suero normal. El mayor tamaño de las IgM es debida al eslabonamiento de 5 unidades mediante enlaces disulfuro cerca de la región de la bisagra; cada unidad de IgM consta de 2 cadenas L y 2 cadenas H (fig.7).

Además hay una cadena J con un peso molecular de 15000 por cada 10 cadenas L de IgM. La cadena J es diferente en antigenicidad y composición de aminoácidos de las otras cadenas, presenta además características ácidas; es probable que esta cadena ayude a la polimerización y estabilización de las moléculas de IgM. Puesto que la molécula de IgM posee 10 segmentos Fab capaces de combinar 10 sitios antigénicos diferentes. Los anticuerpos IgM son los que se sintetizan primero en respuesta a un estímulo antigénico, las células que producen IgM después se dividen en células hijas que producen IgG, la IgM a diferencia de la IgG no atraviesa placenta.^{64,65}

3.4 Inmunoglobulinas en la enfermedad de Chagas'

La IgM es el anticuerpo de mayor prevalencia producido durante la fase inicial de la enfermedad de Chagas, aunque este es superado por la IgG y en mayor cantidad por la IgA durante la fase crónica. Aunque existen diferentes isotipos de IgG en el ratón y en el hombre presentes durante la fase crónica, la IgG2 es predominante en ratones; en cambio IgG1 e IgG3 se encuentra presente con mayor frecuencia en humanos. Los anticuerpos líticos y los asociados a transferencia pasiva de inmunidad son solamente del isotipo IgG2⁶⁶

INMUNOGLOBULINA IgM

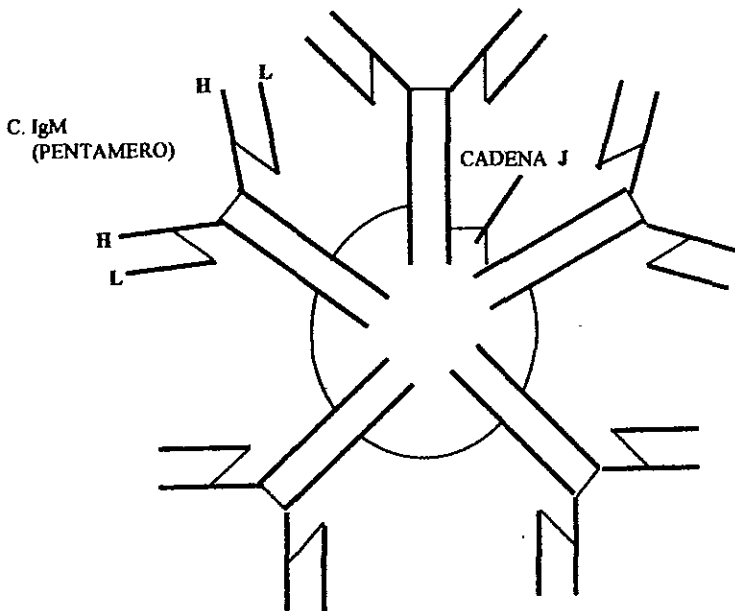


FIG 7- Ilustración de la molécula de anticuerpo IgM (Pentámero) . Las cadenas polipeptídicas se representan con líneas gruesas, los puentes disulfuro que unen a las diversas cadenas pépticas se representan con líneas delgadas (Stütes 1993).(58)

3.5. El ratón desnudo

La primera publicación relacionada con el ratón desnudo se realizó en el año de 1962 por J.H. Isaacson, B.M. Cattanach y N.A. Grist, este último envió dichos ratones y otros normales para su estudio al Instituto de Genética Animal en Edimburgo, Escocia. En este Instituto el Dr. S.P. Flanagan realizó cruces y más tarde en el año de 1966 reportó las siguientes características para el ratón desnudo: ausencia de pelo, baja fertilidad, inmunodeficiencia, tamaño reducido, atimia, además de un período de vida corto con presentación de un 100% de mortalidad a la edad de 25 semanas y mortalidad infantil hasta del 45 % en las dos primeras semanas de vida. Asimismo demostró por los datos de segregación, que el fenómeno se debe a un solo gen autosomal recesivo que el denominó nude (desnudo) y cuyo símbolo genético es nu, también reportó que los ratones normales son heterocigotos para el gen responsable de la ausencia de pelo.^{67,68}

En 1968 E. M. Pantelouris describió que los ratones homocigóticos recesivos para el gen nu (nu/nu) carecen de timo, mientras que los hermanos de camada homocigóticos dominantes (+/+) y heterocigóticos (nu/+) presentan timo normal. Asimismo describió la presencia de una marcada leucopenia en los ratones atímicos (815-3380 leucocitos/ μ l), mientras que sus hermanos fenotípicamente normales presentan hasta cuatro veces niveles más altos y otros con niveles intermedios, estos últimos fueron considerados como heterocigotos (nu/+).⁶⁹

A partir del reporte de Pantelouris se inició una ola de investigaciones, que llevaron a la utilización del ratón desnudo para usos experimentales en diferentes disciplinas. El ratón atímico ha sido cruzado con otros ratones portadores de defectos inmunológicos, aumentando el número de variantes de ratones con mutaciones.^{67,68}

En el ratón desnudo la actividad de las células B parece no estar alterada. Sprent y Miller estudiaron la recirculación y el tiempo de vida media de los linfocitos torácicos y encontraron que la función de los linfocitos B fue de un 97 %. La disgenesia del timo produce una falta de maduración de las células T, que lleva a un estado de inmunosupresión en estos animales. Con respecto a la síntesis de anticuerpos, se ha reportado en esta cepa que el contenido total de inmunoglobulinas presentes en su suero es comparable con el de los ratones normales, no obstante algunas clases de inmunoglobulinas se encuentran desbalanceadas.⁶⁹

Es así que se ha encontrado que los niveles de IgM se encuentran algunas veces por arriba de los valores normales, para el caso de otras inmunoglobulinas, los niveles encontrados han sido inferiores, tal es el caso de la IgA y de las subclases IgG1 e IgG2a. Estas observaciones hacen pensar a algunos investigadores que la relación de anticuerpos IgM/IgG1 distingue la respuesta inmune humoral de esos ratones.^{69,70}

En el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM surgió espontáneamente una cepa de ratones sin pelo derivados de la cepa CD1 et/et, el símbolo

“et” es adoptado para referirse a su forma mutante. Los animales son obtenidos al aparear machos y hembras et/+, o bien machos y hembras et/et, estos ratones, se diferencian de sus hermanos de camada los et/+ (portadores del gen de hipotímia) por carecer de pelo, característica que parece estar ligada a un gen autosomal recesivo. De acuerdo a un estudio realizado por Rosas et al se demostró que estos animales son hipotímicos, ya que los machos presentan un timo rudimentario y el peso del mismo órgano es bajo en los portadores et/+ machos. Las hembras et/et presentan una estructura semejante a los nódulos linfáticos situada donde se encuentra el timo normalmente, el peso de esta estructura es bajo al igual que en las hembras et/+. La supervivencia de los ratones et/et es similar en sus hermanos, aproximadamente de 80% a las 4 semanas y de 60% a la semana 52. Los ratones nu/nu presentan una mortalidad mayor, de 55% a las 2 semanas de vida y de 100% a las 25 semanas.⁷⁰ En un estudio para caracterizar estos animales se llegó a la conclusión de que estos ratones a pesar de ser hipotímicos no son incompetentes inmunológicamente, ya que presentan títulos de anticuerpos similares al de los ratones normales frente a un antígeno timo dependiente como la BSA.⁶

Algunos investigadores han determinado que en el ratón et/et existe un retardo en la aparición de la pubertad, esto no ocurre en la cepa et/+, aunque su fertilidad es semejante, los animales et/et presentan un ciclo estrogénico irregular quizá debido a su hipotímia. Según estudios realizados parece tener relación el bajo peso de las gónadas y próstata que modifica los niveles de gonadotropinas y hormonas sexuales que son descritos también en el ratón nu/nu.^{71,72} Esto denota la importancia del timo en la regulación del sistema reproductivo de esos animales.⁷² En el ratón nu/nu se presentan las mismas características fenotípicas que en el ratón et/et, solo se diferencian de que éste último es hipotímico según estudios realizados. Además se reporta que cuando estos ratones son nacidos y mantenidos en condiciones de libertad a enfermedad el tiempo de supervivencia se incrementa y pueden alcanzar hasta 2 años de edad.⁷³

3.6 Estudio Inmuno Enzimático (ELISA)

El inmunoensayo enzimático, conocido como ELISA por sus siglas en inglés (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) fue descrito en 1971 por Engvall y Perlman. En este método se utilizan anticuerpos conjugados a una enzima. En estos conjugados el anticuerpo conserva su capacidad de unión específica al antígeno, mientras que la enzima es capaz de catalizar una reacción de óxido- reducción, en la cual un sustrato o un cromógeno se transforman en un producto colorido. En este sistema el anticuerpo o el antígeno se adsorben a una fase sólida insoluble (micropozos, tubos o perlas de polivinilo o poliestireno, o bien papel de nitrocelulosa).

Existen diversas variantes del método de ELISA, como son los métodos directos, indirectos, en “sandwich” y el método de ELISA competitivo. Estos permiten la determinación de antígenos en fluidos biológicos, a excepción del método indirecto con el que se detecta anticuerpo (fig.8).

En los métodos directos, el anticuerpo dirigido específicamente contra el antígeno es el que lleva la enzima. En cambio en los métodos indirectos el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con un primer anticuerpo, el cual ya reaccionó con el antígeno adsorbido en la fase sólida.

En los métodos de ELISA en "sandwich," el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con el antígeno que se ha unido a un primer anticuerpo, adsorbido a una fase sólida. El o los componentes que no reaccionaron se eliminan con los lavados; por último se agrega el sustrato de la enzima y un cromógeno y se mide la intensidad del color desarrollado, el cual es proporcional a la magnitud de la reacción antígeno-anticuerpo.

En los ensayos de inhibición de ELISA se determina la concentración de antígeno en una muestra problema mediante una curva tipo. Este ensayo consiste en agregar cantidades variables de la muestra problema (que contiene el supuesto antígeno) a una concentración conocida de anticuerpos específicos para el antígeno. Posteriormente, estas mezclas después de un período de incubación, se adicionan al antígeno adsorbido en la fase sólida y los anticuerpos formados en la solución durante la primera fase son eliminados en los lavados. El conjugado se une a los anticuerpos que reaccionaron con el antígeno sobre la fase sólida. Finalmente, se elimina el exceso de conjugado y se agrega el sustrato. De esta forma la intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración del antígeno en la muestra problema. La absorbancia correspondiente a las muestras se interpola en una curva tipo.

El método de ELISA tiene aplicaciones muy variadas, por lo cual se hace muy versátil, se emplea en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, virales o parasitarias, cuantificación de hormonas, cuantificación de haptenos, titulación de anticuerpos en bajas concentraciones, determinación de isotipo específicos de anticuerpos, etc.

Las enzimas más empleadas en las pruebas de ELISA son: la peroxidasa de rábano (PR), la fosfatasa alcalina (FA) y la β -D-galactosidasa (BG), debido a su estabilidad y reproducibilidad de resultados.

Los sustratos que se emplean para la enzima PR son el peróxido de hidrógeno o el peróxido de urea, que al ser reducidos dan productos incoloros, por lo que se acompañan de productos cromógenos, los cuales al ser oxidados en la reacción enzimática desarrollan color. De éstos los más empleados son la orto-fenilendiamina, la diamino bencidina y la orto-dianisina, que continúan en forma soluble después de ser oxidados. El 1,4 cloro-naftol se utiliza en las técnicas de ELISA en mancha (dot-ELISA) debido a su insolubilidad en solución acuosa, cuando se encuentra en su forma oxidada. Los sustratos empleados para la FA son: el para- nitrofenil fosfato, que produce color al ser degradado por la enzima a temperaturas mayores de 30° C; el 5- bromo-4 cloro-3 indoil fosfato se usa como sustrato de FA, se puede emplear en las pruebas de ELISA en tubo o en placa o en dot-ELISA. La FA se inhibe por iones fosfato libres presentes en soluciones amortiguadoras de salina-fosfatos, por lo que es recomendable utilizar soluciones de tris-HCl. Los sustratos usados para BG son el para-nitrofenil - β -D-galactósido y el 4-metilumbeliferil- β -D-galactósido.

Esta enzima no se encuentra en el suero, pero puede encontrarse en algunos microorganismos.

En comparación con el radioinmunoensayo (RIA), las pruebas de ELISA presentan algunas ventajas, por ejemplo, el sistema de ELISA es más económico, no presenta el inconveniente de la eliminación de desechos radioactivos, los conjugados enzima-anticuerpo son generalmente más estables durante períodos de tiempo más prolongado, el ELISA es un método simple, específico, reproducible y muy sensible (detecta antígeno anticuerpos en el orden de ng).

La intensidad de la reacción se puede apreciar a simple vista, pero también es posible cuantificar la reacción mediante el uso de fotolorímetro, o de un densitómetro para el caso de ELISA -dot.⁷⁴

VARIANTES DEL METODO DE ELISA

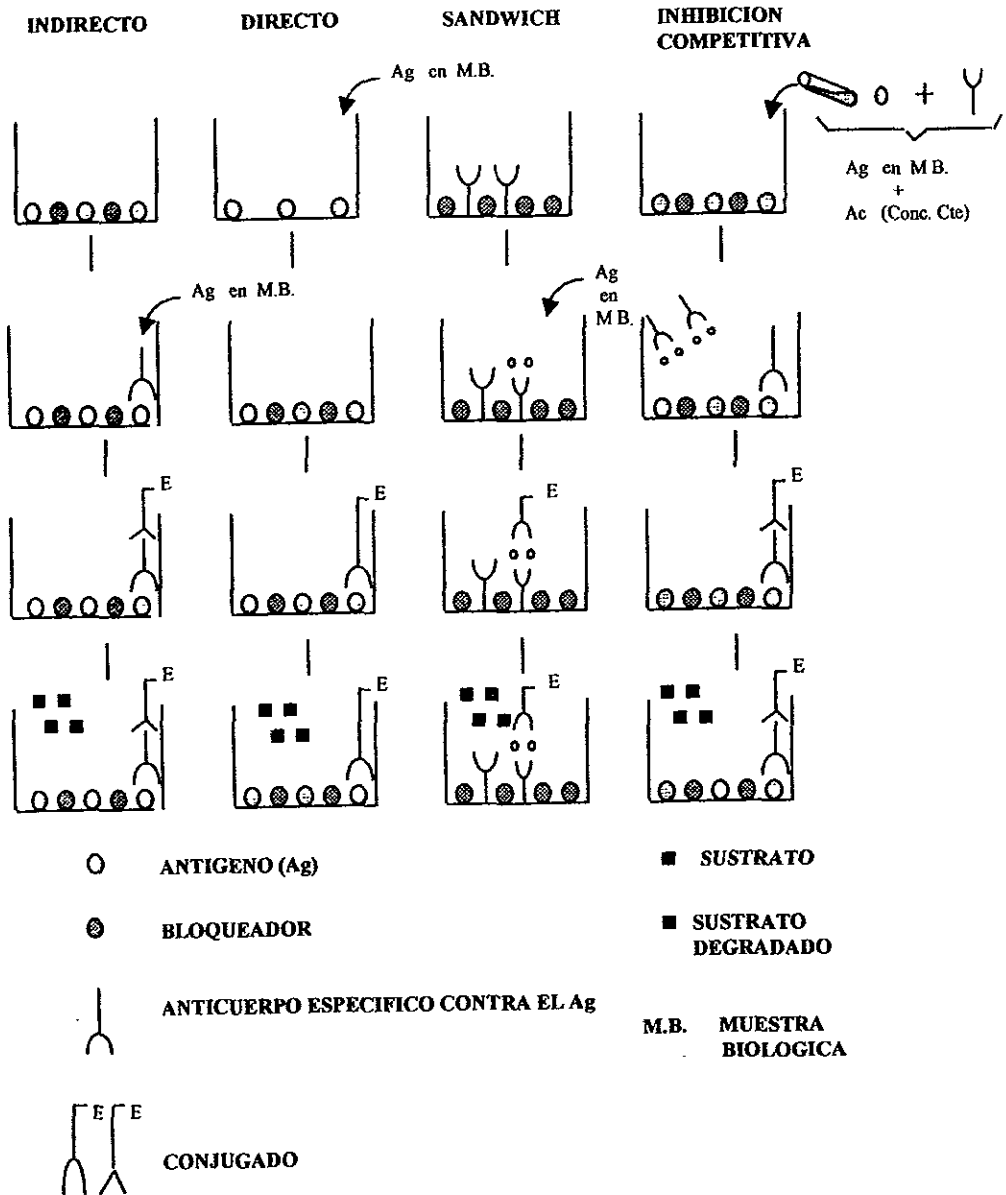


FIG. 8 Manual de inmunología IPN 1992 (75)

3.7.-Q.B.C. (Quantitative Buffy Coat)

Es un estudio relativamente nuevo para el diagnóstico parasitológico del paludismo, tripanosomiasis, oncocercosis, etc., a este método se le conoce como QBC (Quantitative Buffy Coat). El sistema de QBC es un método de diagnóstico cualitativo, para detectar rápidamente la presencia de parásitos hemáticos en sangre capilar o venosa centrifugada.

El QBC emplea tubos capilares especiales con naranja de acridina, además de un flotador que es un tubo de plástico y un tapón. Este equipo puede ser comprado en la casa comercial directamente. La capa de estrato amarillento que se forma en los tubos de sangre al ser centrifugados, que contiene glóbulos blancos y plaquetas, es expandida por medio del flotador cilíndrico de alta precisión introducido dentro del capilar. El flotador de plástico es ligeramente menos denso (1.070 g/ml) que el paquete de glóbulos rojos (1.090 g/ml), por lo que tiende a flotar al ser centrifugado, por la parte superior de éstos, desplazando a los leucocitos y plaquetas, de tal forma que quedan en la parte estrecha entre el flotador y la pared interna del tubo capilar.⁷⁶

El naranja de acridina tiene la función de teñir las núcleo proteínas de las células e incrementar la visibilidad de los componentes, ya que al incidir luz ultravioleta (480 nm) y al observar al microscopio se pueden localizar tres estratos: en la parte superior (hacia el plasma) se observan las plaquetas anaranjadas amarillas fluorescentes. En la capa media los linfocitos y monocitos en un tono verde y en la capa inferior se localizan los granulocitos amarillos y debajo de estos los glóbulos rojos. Los eritrocitos infectados son menos densos, por lo que aparecen en el espacio libre alrededor del flotador y son por lo tanto fáciles de examinar al microscopio (fig. 9).

Estudios de diferentes autores señalan que QBC posee una alta sensibilidad para la detección de *Plasmodium falciparum* en áreas de alta prevalencia, las infecciones no detectadas con métodos convencionales, como las preparaciones sanguíneas si lo son por QBC.⁷⁷ Otros investigadores indican que QBC es también de gran utilidad para detectar parásitos en ratas previamente infectadas con *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma rhodesiense* indican que al igual que en las infecciones humanas los parásitos pueden detectarse en 50 a 110 µl de sangre. En otros estudios realizados se ha demostrado que se puede detectar una célula roja infectada con plasmodios por 10, 000 000 de células no infectadas. Algunos autores reportan que encontraron de 2 a 4 parásitos por microlitro de sangre, además es posible determinar la presencia de los parásitos de 12 a 48 horas antes que con las preparaciones de gota gruesa.^{76,77}

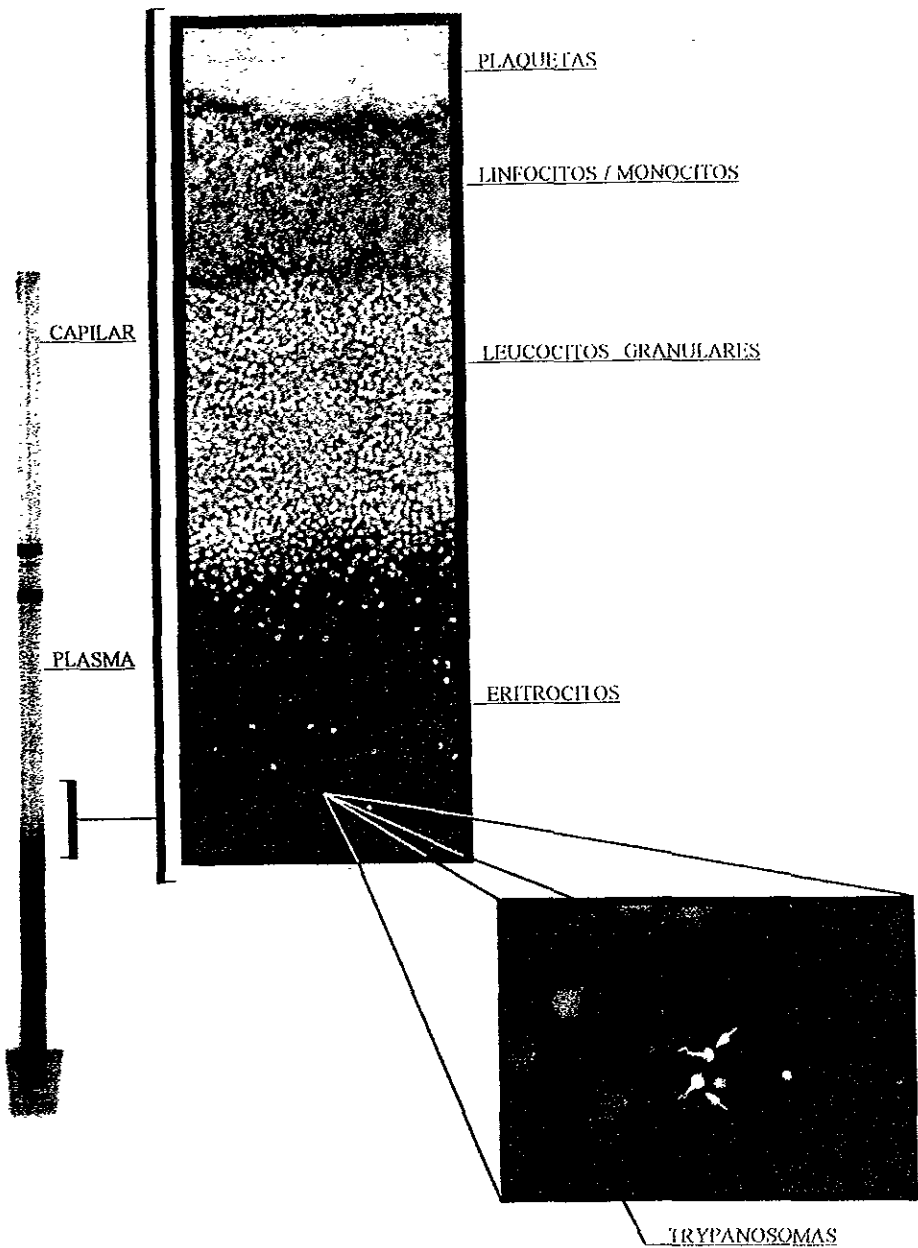
Lo anterior le confiere a QBC una sensibilidad significativamente mayor que los métodos convencionales y comparable con la metodología de tercer nivel como por ejemplo la hibridación de DNA por medio de sondas, existen otros factores importantes que hacen al QBC altamente sensible: la cantidad de muestra utilizada (55-65 µl), aunque varía por algunos autores es casi 100 veces mayor que la utilizada para preparaciones sanguíneas de portaobjetos, los parásitos se tiñen con naranja de acridina y aparecen fluorescentes, el flotador desplaza las células rojas infectadas al espacio libre entre el flotador y el tubo, lo

portaobjetos, los parásitos se tiñen con naranja de acridina y aparecen fluorescentes, el flotador desplaza las células rojas infectadas al espacio libre entre el flotador y el tubo, lo que permite su fácil observación al microscopio, su sensibilidad aunado a su bajo costo y fácil manejo hacen de esta técnica una alternativa más confiable y efectiva para el diagnóstico de hematoparásitos en los laboratorio y en las regiones endémicas.^{78,79}

El método de QBC proporciona una forma reproducible para estimar la cantidad relativa de parásitos contenida en una muestra mediante el sistema de cruces:

< 1	parásitos por campo	(1+)
1-10	parásitos por campo	(2+)
11-100	parásitos por campo	(3+)
>100	parásitos por campo	(4+)

DETECCION HEMATOPARASITOS



Q. BC. ATLAS OF BLOOD PARASITES. BECTON DINKINSON

FIG. 9

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Chagas se extiende como un problema grave de salud pública desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Chile, distribuyéndose principalmente en poblaciones rurales que habitan en viviendas de construcción deficientes. Se estima que aproximadamente 35 millones de gentes se encuentran infectadas con el parásito y de 10 a 12 millones están en riesgo de contraer la enfermedad.⁸¹

En algunas localidades de Brasil por encima del 13% de las muertes de personas entre las edades de 15 a 74 años son atribuibles a esta enfermedad. Además del mecanismo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* es posible la transmisión por coito, mediante secreción láctea, por vía placentaria, por ingestión de carne de animales infectados^{81,82,83} y una proporción poco despreciable es transmitida por transfusión sanguínea. Los diferentes mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas plantean la posibilidad de encontrar individuos infectados con *T. cruzi*, que no presentan sintomatología, sino que actúan como portadores aumentando la propagación de la infección.⁸¹

Diferentes medicamentos como el nifurtimox, el radanil, han sido utilizados para el tratamiento de tripanosomiasis y actualmente se utilizan derivados del 5-furano-2 nitroimidazol itraconazol y alopurinol estos últimos según algunos autores desarrollan un efecto supresor en animales de laboratorio^{46,47,48} y al parecer también son eficientes en el humano, pero no completamente esto es demostrable con el hecho de que aun cuando se utilicen los medicamentos en Latinoamérica donde millones de personas padecen esta enfermedad alrededor del 10% de ellos mueren después de un proceso crónico y asintomático.⁸¹

En nuestro país se localizan diversas zonas endémicas constituyendo un serio problema de salud, de acuerdo a los estudios serológicos y epidemiológicos realizados por Velasco Castrejón y su grupo existen hasta el año 1990 300 casos agudos y 300 casos crónicos comprobados y a este respecto la magnitud de la infección es controversial, ya que el mismo autor calculó una cifra mayor tomando en cuenta el número de individuos residentes en las áreas endémicas expuestos a la infección²

Las técnicas de diagnóstico para la tripanosomiasis disponibles en México son: el inmunodiagnóstico, el diagnóstico serológico y el diagnóstico parasitológico en el que se incluyen el examen microscópico directo y la inoculación de animales entre otros². La elección de modelos animales para el estudio e investigación de la enfermedad de Chagas representa un reto para los investigadores debido a la gran variabilidad en cuanto a la susceptibilidad y capacidad de respuesta inmunológica en las diferentes especies estudiadas entre las que se encuentra principalmente el ratón.⁸⁴

El ratón sin pelo denominado nu/nu carente de timo al igual que el ratón timectomizado han sido de los modelos más controversiales en cuanto a su respuesta inmune frente a *Trypanosoma cruzi* ya que la supresión en la actividad de las células T reduce la patología asociada a la fase crónica de la enfermedad además de presentar una

mayor susceptibilidad a la infección dando clara evidencia de la importancia de las células T en la respuesta inmune frente a la enfermedad de Chagas.

El ratón desnudo hipotímico (posee timo rudimentario y es fenotípicamente igual al ratón nu/nu) llamado et/et es derivado de la cepa CD1, surgió espontáneamente en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM, este ratón a pesar de su hipotimia presenta notable resistencia a condiciones normales de bioterio⁷⁵ y ha sido un modelo ideal para la investigación de enfermedades como la uveítis,⁵ este ratón no había sido utilizado con anterioridad para el estudio de la enfermedad de Chagas, de ahí la importancia de realizar este trabajo que tuvo como objetivo determinar la respuesta inmune humoral y la susceptibilidad a *Trypanosoma cruzi* en los ratones et/et haciendo una comparación con sus hermanos de camada portadores del gen de hipotimia llamados et/+ y con los CD1 (ratones albinos normales), para ello se determinó de parasitemia en cada uno de los 60 ratones de las tres cepas mediante QBC (Quantitative Buffy Coat) y frotis sanguíneos además de la cuantificación de anticuerpos de respuesta primaria y secundaria a antígenos de *T. cruzi* mediante ELISA en los ratones previamente inmunizados con la cepa "Miguz". Además se analizaron los órganos de otro lote de 60 ratones de las mismas cepas utilizadas con anterioridad (inmunizados con la cepa "Ninoa" de *Trypanosoma cruzi*) a los que se realizó la determinación de los índices esplénico y cardíaco con la finalidad de deducir la respuesta de esos animales durante la fase crónica de la infección debida a *T. cruzi*.

V. FUNDAMENTACION DEL TEMA

En 1909 Carlos Chagas descubrió el *T. cruzi* causante de la tripanosomiasis existente en América, los cuadros clínicos dados por esta enfermedad en humanos y las respuestas en animales de laboratorio son variables, estas parecen estar ligadas en el hombre al HLA (Complejo Principal de Histocompatibilidad) y en el ratón al H2.⁵⁹

Los estudios realizados en diversas especies animales incluyendo en el ratón indican una marcada diferencia en las respuestas inmunológicas tanto celulares como humorales, incluso algunos investigadores reportan una notable resistencia y "autocura" del roedor silvestre *Callomys callosus*.^{85,86} Las diversas respuestas nos llevan a pensar que *T. cruzi* lleva acabo una gran variedad de rutas en su mecanismo de invasión y capacidad patógena en cada especie. Los estudios realizados en el ratón respecto a la respuesta humoral indican que en ratones normales existen gran variabilidad en las respuestas aun utilizando la misma cepa de tripanosoma⁸⁷, sin embargo Edward et al han encontrado epitopos comunes en ratones inmunizados con *T. cruzi* proveniente de diferentes regiones.⁸⁸

Otros autores señalan que la inmunosupresión en la respuesta humoral y celular tanto en animales de laboratorio como en humanos se lleva acabo mediante diversos mecanismos. Estos autores describen alteraciones inmunológicas ocasionadas por *T. cruzi* en el ratón, algunos mecanismos aun no están establecidos en la enfermedad aguda y se atribuye a la deficiencia en la producción de IL-2, asimismo en infecciones exógenas es restaurada la respuesta con la presencia de IL-2 en estudios in vitro. Existen numerosos mecanismos que llevan acabo la inmunosupresión durante la infección aguda, hay la evidencia de sustancias supresoras que reducen la producción de IL-2.^{89,90} Por otra parte la producción del interferón γ (IFN- γ) en el ratón regula al parecer los picos de parasitemia durante la infección, aunque la producción crónica de INF- γ puede inducir una expresión inapropiada del MHC y una consecuente reactividad autoinmune.³

Asimismo se suprime la expresión de receptores para la IL-2 es decir para la IL-2R y sus componentes la P55 y la P70 que es responsable de la inmunosupresión durante la fase aguda de la infección.⁹¹ En humanos también se denota el decrecimiento en la actividad de las células TH y TC y una baja en la actividad de los receptores CD3, CD4 y CD8 que son inhibidos por el parásito.⁹² En otros estudios se ha comprobado que la transferencia de células CD4⁺ y CD8⁺ de ratón infectado crónicamente con *T. cruzi* producen desmielinización e inflamación en los nervios ciáticos de ratones normales, la transferencia de patología de las células de ratón infectado con *T. cruzi* describe un fenómeno de desorden a nivel celular durante la enfermedad.³

Reed et al; realizaron estudios en ratones infectados crónicamente con *T. cruzi* en relación a las células formadoras de placa (PFC) sugiriendo que existe una reducción en la formación de estas células en ratones infectados con *T. cruzi*. En ese mismo estudio se comprobó que existe un mecanismo de control de los macrófagos así como de las células de bazo en el ratón infectado de manera crónica debido a *T. cruzi*, se regula la inducción de IL-1, asimismo la producción de IL-2.⁹³

Las alteraciones inmunológicas ocasionadas por *T. cruzi* en el ratón aun no están esclarecidas sobre todo en la fase aguda y se atribuye a la deficiencia en la producción de IL-2, y asimismo la adición exógena de esta citocina restaura la respuesta inmunológica in vitro.⁹⁴ Otros estudios in vitro utilizando linfocitos humanos dan evidencia de la habilidad de *T. cruzi* para descender la producción de citocinas como: IL-2,4,5 además del interferón- γ dando la posibilidad de una alteración directa en la producción de dichas citocinas por parte del parásito.⁹⁵

Por su parte Eksi et al deducen que la fase aguda de la infección por *T. cruzi* en ratones al parecer esta influenciada por genes que se encuentran dentro y fuera del MHC. Asimismo que existe una sensibilidad y resistencia denotada por ciertos halotipos, de igual forma los niveles de IL-2,4,5,10 e INF- γ se encuentra genéticamente regulada y compactada en los huéspedes infectados por *T. cruzi*.⁹⁶

Minoprio et al señalan que en respuesta a la infección ocasionada por *T. cruzi* existe una activación de linfocitos B (clonas), o una indiscriminada estimulación mitogénica, de células B no específicas al parásito. Recientemente estos mismos autores indican un hallazgo de que la mayor parte de los hibridomas de células B obtenidas de una infección aguda de ratón secretan anticuerpos los cuales fracasan durante la unión con antígenos del parásito; algunos hibridomas producen IgG e IgM anticuerpos multiplicativos capaces de unir proteínas autólogas de ratón en la misma forma que los anticuerpos naturales. Las familias de genes VH son expresados durante el curso de la infección e indican la naturaleza policlonal natural para esas respuestas.⁹⁷ Otros estudios sugieren que durante la expresión del receptor de linfocitos T para IL-2 existe una elevación policlonal de linfocitos que ocasiona desordenes inmunológicos durante la fase aguda que puede convertirse en crónica debido a este fenómeno.⁹⁸ Se considera importante la respuesta de tipo celular para el control de la enfermedad, además se considera importante la producción de anticuerpos durante la fase aguda lo que regula la severidad de la fase crónica en el ratón.³

Diversos estudios indican que los animales experimentalmente infectados con *T. cruzi* muestran respuesta humoral y celular suprimida tanto antígenos de parásito como antígenos heterólogos.⁹⁹ Asimismo se ha demostrado que las células linfoides del ratón parasitado con *T. cruzi* son incapaces de responder positivamente en un cultivo mixto de linfocitos.¹⁰⁰

Al evaluar el estado inmunológico de ratones infectados con *T. cruzi*, se ha encontrado una respuesta suprimida a antígenos heterólogos tanto dependientes como independientes de T, aparentemente no es producto de la función de los macrófagos, además se ha demostrado que las células peritoneales tanto de ratones infectados con *T. cruzi* y de ratones normales no difieren en si en su capacidad para unir al antígeno.^{101,102}

Spears et al por su parte determinaron que la respuesta inmune humoral es elemental en la resistencia a la infección en ratones con tripanosomiasis crónica.¹⁰³

En la evaluación de la respuesta inmune humoral en ratones Bal/c se producen anticuerpos que reconocen proteínas propias de los tripanosomas que son reconocidas por ELISA, la gp82, gp90 y gp35/50 al aplicar antiseros se encuentran lisis del 90 al 100% de

las formas metacíclicas, contraste con los antisueros de la gp90 que proporciona una inmunidad protectora durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas.¹⁰⁴

En estudios realizados para evaluar respuesta inmune en ratones que son inmunizados con fracciones antigénicas acidificadas se encuentra respuesta a antígenos homólogos en los ratones inmunizados con diferentes fracciones de *T. cruzi*, a su vez se detecta IgE en el suero de esos ratones, confirmando la presencia de anticuerpos homocitotrópicos que proveen de protección parcial durante la fase aguda de la infección.¹⁰⁵

En otros estudios realizados en ratones CD1 infectados con *T. cruzi* se considera indispensable la producción de anticuerpos para la cura de los animales.¹⁰³ Asimismo en ratones CD1, *et/+* y *et/et* comparando su respuesta inmune humoral a BSA no se descubre diferencia entre ellos.⁶

En ratones inmunizados con *T. cruzi*, inmunosuprimidos por radiación y por fármacos como la ciclofosfamida se ha observado diferentes resultados que sugieren una modificación durante la fase aguda, que es donde se incrementa la resistencia del parásito a la infección, entre estos mecanismos se encuentran la colonización de sitios inmunoprivilegiados que complementan la activación de los mecanismos efectores por parte del parásito.⁵⁵ En el ratón inmunocompetente (deficiente en células T, B, CD4⁺, CD8⁺, NK o macrófagos) se exhibe una gran reducción de la respuesta inflamatoria, en la fase crónica de la tripanosomiasis, los efectos se denotan también por una baja en la respuesta humoral y celular.³

Por otra parte los estudios realizados en ratones desnudos genéticamente inmunodeficientes (atímicos), o bien ratones inmunodeficientes por radiación o inmaduros inmunológicamente (ratones recién nacidos) infectados con *T. brucei* desarrollan una parasitemia extremadamente alta y se hacen anémicos, pero no presentan reacciones inflamatorias significativas como los ratones con una respuesta inmunológica normal. En los ratones normales o atímicos infectados se restaura la inmunidad mediante la transferencia de células esplénicas singénicas y aparecen la respuesta inflamatoria normal además la localización de tripanosomas en los tejidos.¹⁰⁶

La severidad de la infección por *T. cruzi* en el ratón parece estar influenciada por una predisposición genética, ruta de infección y la dosis de inóculo. Asimismo tiene repercusión la edad, el sexo, tropismo de la cepa y el estado inmunológico del huésped.³

VI. HIPOTESIS

La respuesta inmune de tipo IgG e IgM para *Trypanosoma cruzi* en el ratón *et/et* se espera será menor que en el heterocigoto (*et/+*) y en el CD1, mientras que la parasitemia será mayor en los ratones *et/et* que en los animales *et/+* y CD1.

VII. OBJETIVOS

objetivo general:

Determinar el grado de parasitemia y evaluar la respuesta inmune humoral a *Trypanosoma cruzi* en ratones *et/et* comparandolos con los *et/+* y los CD1.

Objetivos específicos:

Evaluar la respuesta inmune humoral para *Trypanosoma cruzi* mediante títulos de anticuerpos IgG e IgM en los ratones CD1, *et/+* y *et/et* utilizando el ensayo de enzimas ligadas a inmunoadsorbentes (ELISA).

Comparar el grado de parasitemia en los tres tipos de ratones utilizando las técnicas de frotis sanguíneo y Q.B.C. (Quantitative Buffy Coat).

VIII. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

8.1 TIPO DE ESTUDIO:

- Observacional
- Prospectivo
- Comparativo
- Transversal

POBLACIÓN:

- 20 ratones et/et machos
- 20 ratones et/et hembras
- 30 ratones et/+ machos
- 20 ratones et/+ hembras
- 10 ratones CD1 machos
- 20 ratones CD1 hembras

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Inclusión: ratones et/et machos y hembras de 2 meses de nacidos
ratones et/+ machos y hembras de 2 meses de nacidos
ratones CD2 machos y hembras de 2 meses de nacidos

Exclusión:

ratones de cepas ajenas a las estudiadas o especies animales diferentes

VARIABLES:

Dependiente: Susceptibilidad de los ratones a la infección

Independientes: método a seguir, tipo de ratón y la cepa de *T. cruzi*

8.2 MATERIAL Y REACTIVOS

NOMBRE	ESPECIFICACIÓN
Carbonato de Sodio (Na_2CO_3)	J.T.BAKER
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	J.T. BAKER
Cloruro de Potasio (KCl)	ROD. QUIM MONTERREY
Bicarbonato de Sodio (Na_2HCO_3)	J.T. BAKER
Ácido Cítrico ($\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$)	J T. BAKER
Fosfato de Sodio Dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	J.T.BAKER

Acido Sulfúrico (H₂SO₄)
Metanol Absoluto(CH₃OH)
Aceite de inmersión
Conjugado anti IgM de ratón - peroxidasa
Anti Mouse IgG - peroxidasa
Tween
Leche semidescremada
Solución Salina estéril (SSI) al .085%
Colorante de Giemsa
Capilares para QBC
Cada capilar para QBC contiene:
Naranja de Acridina
Oxalato de Potasio
Heparina Sódica
EDTA

Balanza granataria
Balanza analítica
Agitador vortex
Microscopio de fluorescence
Microscopio óptico
Microcentrífuga
Centrífuga
Lector para ELISA
Espectrofotómetro
Micropipeta de 20-100 microlitros
Micropipeta de 200-1000 microlitros
Portaobjetos (75x25)
Vasos de precipitados de 50,100,500 y 1000 ml.
Tubos de ensaye (13x100)
Pipetas graduadas de 1,2,5 y 10 ml.
Pipetas pasteur
Celdas para espectrofotómetro
probetas de 25,50,500 y 1000 ml
matraces aforados de 50,100,1000 y 2000 ml
Puntas para pipetas
Espátulas de acero inoxidable
Piseta de 250 ml.
Tripie metálico
Soporte universal
Mechero
Equipo de destilación
Gradillas

TEC. QUIM. S.A.
MERCK

PIERCE
SIGMA CHEMICAL
SIGMA DE MEX. S.A.
NESTLE

MERCK
BECTON DICKINSON

(5.6 µg)
(.03 mg)
(3.8 U.S.P Units)
(0.44 mg)

OHAUS
METTLER H-80
SCIENTIFIC INDUS

ZEISS
BECTON DICKINSON
SOL-BAT
DYNATECH
ESPECTRONIC 20
BRAND
BRAND

PYREX
PYREX
PYREX

BAUCH&LOMB
PYREX
PARES

PARES

Placas de poliestireno
Equipo de disección
Perillas de plástico
Bulbos para pipeta Pasteur

COSTAR

8.3 METODOS

A) Inmunización de ratones con *Trypanosoma cruzi*

- Se llevo acabo la inmunización con lotes de 10 ratones de cada grupo machos y hembras. A la cepa de *Trypanosoma cruzi* proporcionada por el INDRE (INSTITUTO DE DIAGNOSTICO DE REFERENCIA EPIDEMIOLOGICO) se le realiza un conteo en cámara de Neubauer encontrando un total de 74×10^6 epimastigotes en un volumen de 6.7ml. se lleva a cabo un ajuste con solución salina estéril hasta tener 1×10^6 epimastigotes por 0.5 ml. Cada uno de los ratones son inmunizados con 1×10^6 epimastigotes por vía intraperitoneal.

B) Seguimiento de la infección

- 6 días posteriores a la inmunización de los ratones se realizan frotis sanguíneos a dos ratones de cada grupo, esta sangre es obtenida de punta de cola, se realiza una extensión, se fija con metanol absoluto y se tiñe con Giemsa.
- Se realizan frotis a los días 10, 20, 21 y 23 posteriores a la infección y se observan en microscopio óptico en objetivo de inmersión.
- A los 30 días posteriores a la inoculación se obtienen macrófagos de peritoneo de cada uno de los tres grupos de ratones con solución salina fría y se realiza frotis teñido con Giemsa para encontrar Tripomastigotes.

C) Realización de la técnica de QBC

- A los 30 días posteriores a la inmunización son sacrificados 3 ratones de cada grupo y con su sangre se llenaron los capilares especiales para Q.B.C., se homogenizaron, se coloco el flotador y el tapón al capilar se centrifugaron a 14,000 rpm. durante 15 min. en microcentrifuga Se observaron cada uno de los capilares al microscopio de fluorescencia.
- Se repite este procedimiento al día 47 después de la inmunización en esta ocasión se realiza sangrado de seno orbital directamente con el capilar a 5 ratones de cada grupo, se lleva a cabo el mismo procedimiento que para el día 30 posterior a la inoculación, se observaron al microscopio de fluorescencia y se reportan resultados en tablas.

D) Obtención del suero de los ratones para la realización de ELISA

- A los 30 días después de la inmunización se sacrificaron 3 ratones de cada uno de los grupos mediante cámara de éter y rasgado de vena axilar su sangre es recolectada con pipetas Pasteur en tubos de ensayo previamente etiquetados. Esta sangre se centrifugó a 3000 r.p.m. por 5 minutos, los sueros son separados y mantenidos en congelación, estos serán utilizados para realizar ELISA.
- Esta misma operación se repitió al día 54 posterior a la inmunización en todos los ratones existentes de cada uno de los grupos, estos son mantenidos en congelación para ELISA.

E) Obtención de los órganos de los ratones

- Al día 54 posterior a la inoculación se sacrificaron todos los ratones de cada grupo y se obtuvieron su corazón y su bazo. Se determinó sus índices esplénico y cardíaco. Para calcularlo se dividió el peso del órgano entre el peso del animal completo y el resultado se multiplicó por 100.

F) Obtención y cuantificación del antígeno de *Trypanosoma cruzi*

- Se realizó sangrado de corazón a un conejo adulto, la sangre se recolectó en un matraz y se desfibrinó con perlas de vidrio. Se conservó en el refrigerador.
- Se observaron los tubos de ensayo proporcionados por el INDRE, determinando cual de ellos eran mas viable para resembrado de cepas, éste se efectuó realizando pases de un tubo a otro que contenía previamente medio difásico y reconstituyendo el volumen con BHI, se mantuvieron las cepas hasta obtener gran cantidad de epimastigotes para sembrar en los matraces.
- De los tubos de ensayo donde se encuentra las cepas de *T. cruzi* se toma con una pipeta estéril una gota de la fase líquida y se coloca entre portaobjetos y cubreobjetos, son observados al microscopio óptico en objetivo de 40 X y se eligen los que estén más viables y en mayor cantidad.
- Se colocaron 3 matraces de 125 ml cada uno, los cuales se agregaron 10 ml de sangre de conejo + 40 ml de agar nutritivo se homogeneizó y se esperó a que solidificara.
- Al medio anterior se agregaron 5 ml de forma de cultivo de *T. cruzi* + 20 ml de BHI previamente estéril + 5 gotas de gentamicina (80 mg/2ml) después se guardaron en incubadora a 28 °C.
- Se dejaron reproducir los epimastigotes y a los 10 días se tomó un gota del contenido de la fase líquida y se revisó entre porta objetos y cubre, se observó al microscopio óptico a objetivo de 40 X. Se repitió este procedimiento hasta obtener una gran cantidad de células viables y sin contaminación.
- El contenido líquido del medio bifásico fue puesto en dos botellas de Roux estériles, se agregó caldo de BHI y se enriquece con unas gotas de suero fetal de ternera más

gentamicina, se dejaron 10 días a 28°C y al final de este tiempo se cosecharon las células y se procedió a la obtención del antígeno.

- Las células obtenidas del cultivo fueron centrifugadas 6000 rpm/30 min. y fueron lavadas 4 veces con PBS pH=7.4. Después se obtuvo el paquete celular que fue conservado en un tubo de plástico especial, este tubo fue puesto dentro de un tanque de nitrógeno líquido hasta congelar totalmente, después es puesto en baño de agua 37°C, se repite la operación durante 10 pases sucesivos.
- La proteína obtenida es cuantificada por el método de Lowry para determinar su concentración..
- El antígeno obtenido fue estabilizado con formalina al 0.1% y timerosal al 0.01 % en cantidad de 25 µl.
- Se construyó una curva tipo de proteínas utilizando albúmina de la siguiente forma:
- Se trabajaron diferentes concentraciones de albúmina de 10µl en el tubo 1 hasta 1000 µl en el tubo 10. Se completó en el volumen en cada tubo a 1 ml. con solución salina isotónica al 0.85%.
- Se adicionaron 3 ml. del reactivo C a cada tubo y se agitó en el vortex se esperó 10 min.
- Se pusieron 0.1 ml. de reactivo de Folin, se agitó y se esperó 30 min. ; se seleccionó la longitud de onda a 600 nm y se leyó la absorbancia. 600 nm .
- Con estos resultados se construyó la curva tipo de proteínas.
- La proteína obtenida de los epimastigotes es cuantificada para determinar su concentración.
- Se colocaron por duplicados 0.2 ml de muestra y se agregaron a cada tubo 1 ml. del reactivo C y se dejó reposar 20 min.
- Se agregaron a cada tubo 0.1 ml. del reactivo D y se leyó a longitud de onda de 600 nm en el Espectrofotómetro.
- Con base a la curva realizada con concentraciones estándar de albúmina se interpoló este valor y se determinó la concentración del antígeno.

G) Determinación de los títulos de anticuerpos IgG e IgM

- En una gradilla se realizan diluciones de 8µg/ml. y 16µg/ml. de antígeno de *Trypanosoma cruzi* con buffer de carbonatos-bicarbonatos y son pegados 100µl a las placas de poliestireno, excepto en tres pozos de la fila H donde solo se coloca PBS. Esta operación se realizó en 4 placas 2 de ellas para 8µg/ml y 2 para 16µg/ml. Se dejó reposar las placas a 4°C durante 18 horas.
- Se eliminó el sobrenadante de la placa y se bloqueó con 300µl de albúmina de huevo al 1% en PBS con leche al 5% incubándose a 37 C° durante 30 min.
- Se eliminó el sobrenadante de las placas lavándose 4 veces con PBS-TWEEN dejando actuar la solución de lavado 1 min antes de tirar el sobrenadante.
- Se prepararon soluciones de suero de los ratones 1:40 y 1:80 para IgG, 1:80 y 1:160 para IgM tanto de los sueros problema como de los control, que fueron sueros de ratones inmunizados con BSA.

- Se agregaron 100µl de cada suero a cada una de las 4 placas y se incubaron durante 1 hora a 37°C, se tiró el sobrenadante y se lavaron 4 veces cada placa con PBS-TWEEN, dejando actuar 1 min. la solución de lavado antes de tirar el sobrenadante.
 - Se pusieron 100µl de sustrato y se incubó a 37°C durante 15 min., se detuvo la reacción con H₂ SO₄ a 2.5N.
- Se leyó a densidad óptica de 492 nm.

H) Determinación del diámetro de los órganos de los ratones inmunizados con la cepa NINOA

En otro lote de ratones al día 63 postinfección con la cepa NINOA se obtuvieron los siguientes órganos: corazón, bazo, ciegos y colón, a los cuales se les midió su diámetro.

8.4 DISEÑO ESTADÍSTICO

PRUEBA DE RANGO PARA MUESTRAS INDEPENDIENTES O PRUEBA DE U DE MANN-WHITNEY

La prueba de U de Mann-Whitney se utiliza para probar hipótesis acerca de dos medias de dos muestras independientes cuando los datos no alcanzan a ser de tipo cuantitativo sino cualitativo.

FUNDAMENTO: Esta prueba se basa en que para cada pareja se evalúa la magnitud de la discrepancia entre los valores de sus dos elementos. Se determina la dirección de la misma, la cual se ordena en rangos. Una de las variantes del estudio, tratamiento A, tiende a tener valores mayores que el otro (tratamiento B) en toda la población, entonces se esperará un predominio de rangos (diferencias) grandes positivos. Si se obtiene una suma de rangos muy grande, poco probable ($p < 0.05$) de ocurrir cuando la distribución de los valores de la variable ordinal es la misma para las dos poblaciones, se rechazará la hipótesis. Si el tratamiento B tiende a tener valores mayores se espera un predominio de rangos, grandes negativos y se razona igual que antes.

REQUISITOS: Debe tratarse de muestras relacionadas entre sí, que pueden estar formadas por parejas sometidas cada una a distinto tratamiento, o bien por un paciente que sirve como su propio control. Otro caso es el llamado antes y después de un procedimiento. Las observaciones deben haber sido medidas por lo menos en escala ordinal, o de intervalo o de relación, cuando no se ajustan a una distribución normal y las muestras son pequeñas, digamos de menos de quince.¹⁰⁷

En este ensayo estadístico se utilizan las siguientes fórmulas:

$$U1 = n1n2 + 1/2n2(n2+1) - R2$$

$$U2 = n1n2 + 1/2n1(n1+1) - R1$$

Donde:

$n1$ = Es igual al número total de observaciones de la muestra A o 1.

$n2$ = Es igual al número total de observaciones de la muestra B o 2.

$R1$ = Es la suma de los rangos correspondiente a la muestra A o 1.

$R2$ = Es la suma de los rangos correspondiente a la muestra B o 2.

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA UN SOLO CRITERIO DE CLASIFICACION POR RANGOS, DE KRUSKAL- WALLIS.

Es una prueba de estadística no paramétrica que se utiliza cuando las poblaciones de las cuales se extraen las muestras no están distribuidas normalmente con varianzas iguales, o cuando los datos para el análisis constan sólo de rangos, la aplicación de esta prueba comprende los siguientes pasos: Las $n1, n2, \dots, nk$ de las observaciones se combinan en una sola serie de tamaño n y se disponen en orden de magnitud desde la más pequeña

hasta la más grande. Las observaciones se sustituyen entonces por rangos desde 1, que es el asignado a la observación menor, hasta n que se asigna a la observación mayor. Cuando dos observaciones tienen el mismo valor, a cada una de ellas se les da la media de los rangos con los cuales está relacionado, enseguida los rangos asignados a las observaciones en cada uno de los k grupos se suman por separado para dar k sumas de rangos y finalmente se calcula la estadística de la prueba de acuerdo a la ecuación:

$$H = 12 / n(n+1) \sum_{j=1}^k R_j^2 / n_j - 3(n+1)$$

k= el número de grupos

n_j= número de observaciones en el j-ésimo grupo

n= es el número de observaciones en todos los grupos combinados

R_j= la suma de los rangos en el j-ésimo grupo.

Cuando se tienen varias observaciones empatadas se emplea otra fórmula para calcular H:

$$H' = \frac{H}{1 - \sum T / (n^3 - n)}$$

H' es la calculada

n = es el número de observaciones empatadas.

Cuando hay cinco observaciones en uno o más grupos H se compara con los valores tabulados de la X² con k-1 grados de libertad, una p menor de 0.05 indica diferencias significativas de lo que se analiza, en este caso una serie de valores.¹⁰⁸

IX. RESULTADOS

En los frotis sanguíneos a los días 6,10,20,21 y 23 y al día 30 en macrófagos de peritoneo no se encontraron tripanosomas.

TABLA NO.1 CUANTIFICACION DE TRIPANOSOMAS MEDIANTE FROTIS SANGUINEO

RATON	TRIPANOSOMAS/CAMPO	GRUPO
21	1	et/et H
26	1	et/et H
27	3	et/et M
28	8	et/et M
29	4	et/et M
30	2	et/et M
32	2	et/+ M
33	1	et/+ M

NOTA:NO SE ENCONTRARON TRIPANOSOMAS EN EL RESTO DE LOS RATONES; SOLAMENTE EN LOS QUE SE REPORTAN.

TABLA NO. 2 DETERMINACION DE Q.B.C. A RATONES INFECTADOS CON T. cruzi DIA 47 DE INFECCION

RATON	CDI M	et/+ H	et/+ M	et/et H	et/et M
1	(-)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)
2	(-)	(+)	(++)	(++)	(++++)
3	(-)	(-)	(+++)	(++)	(+++)
4	(+)	(++)	(+++)	(+++)	(++++)
5	(+)	(++)	(++)	(++)	(++++)

M=MACHOS

H=HEMBRAS

TABLA N° 3. DETERMINACION DE IgM POR ELISA DIL 1:160 30 DIAS P.I.
CEPA " MIGUZ "

RATON	CD1	RANGO	ET/+	RANGO	ET/ET	RANGO
1	0.162	1	0.263	6.5	0.263	6.5
2	0.183	3.5	0.352	9.5	0.352	9.5
3	0.237	5	0.183	3.5	0.493	12
4			0.179	2	0.496	13
5			0.325	8	0.43	11
	n1=3	R1=9.5	n2=5	R2=29.5	n3=5	R3=52

$$H = 12 / n(n+1) \sum_{j=1}^k R_j^2 / n_j - 3(n+1)$$

j= es el número de observaciones en la muestra.
n= es el número total de oservaciones.
R= es igual a la suma de los rangos de la muestra
H= 7.1164

$$H' = \frac{H}{1 - \sum T / (n^3 - n)}$$

T= número de observaciones empatadas.
H= es la calculada

H'= 7.1755

P < 0.05 SIGNIFICATIVA.

Se realizó una prueba de U de Mann-Whitney y solo se encontró diferencia significativa entre los grupos et/+ con et/et (p < 0.05) y CD1 con et/et P < 0.05.

**TABLA NO. 4 DETERMINACION DE IgM POR ELISA DILUCION 1:160 54 DIAS
P.I. CEPA "MIGUZ"**

RATON	el/±	RANGO	el/el	RANGO
1	0.480	16	0.511	24
2	0.367	3	0.367	13
3	0.437	10	0.402	8
4	0.506	25	0.499	23
5	0.548	27	0.491	19
6	0.380	6	0.487	18
7	0.484	7	0.466	12
8	0.370	4	0.473	14
9	0.371	5	0.497	21.5
10	0.600	24	0.497	21.5
11	0.478	15.5		
12	0.452	11		
13	0.412	9		
14	0.493	20		
15	0.478	15.5		
16	0.099	1		
17	0.351	2		
	n1=17	R1=202	n3=10	R3=176

$U1 = n1n2 + 1/2n2(n2+1) - R2$
 $U2 = n1n2 + 1/2n1(n1+1) - R1$
 $U1 = 170 + 1/2(10+1) - 176$
 $170 + 55 -$
 176
 $225 - 176$
 $U1 = 49$

$U2 = 170 + 1/2(17)(18) - 202$
 $170 + 153 - 202$
 $323 - 202$
 $U2 = 121$

SIGNIFICATIVA $P > 0.05$.

**TABLA NO.5 DETERMINACION DE ANTICUERPOS IgG
ANTI-T. cruzi MEDIANTE ELISA DIL. 1:180 54 DIAS P.I
CEPA "MIGUZ"**

RATON	ET/+	RANGO	ET/ET	RANGO
1	0.367	17	0.365	15.5
2	0.404	25	0.389	22
3	0.365	19.5	0.376	18
4	0.300	8	0.401	23.5
5	0.365	15.5	0.409	27
6	0.180	2	0.310	10
7	0.358	13	0.364	14
8	0.397	21	0.244	5
9	0.416	26	0.312	11
10	0.401	23.5	0.386	19
11	0.385	19.5	0.340	12
12	0.306	9		
13	0.231	4		
14	0.299	7		
15	0.284	6		
16	0.120	1		
17	0.194	3		
	n1=17	R1=220	n2=11	R=177

$$U1 = n1n2 + 1/2 n2(n2+1) - R2$$

$$U2 = n1n2 + 1/2 n1(n1+1) - R1$$

$$U1 = 17(11) + 1/2(11)(12) - 177$$

$$187 + 66 -$$

$$177$$

$$253 - 177$$

$$U1 = 76$$

$$U2 = 187 + 1/2(17)(18) -$$

$$220$$

$$187 + 153 -$$

$$220$$

$$U2 = 120$$

NO SIGNIFICATIVA $P < 0.05$

**TABLA NO.6 DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI BSA TIPO IgG
MEDIANTE ELISA DILUCION 1:180 CEPA "MIGUZ"**

RATON	CD1	RANGO	et/et	RANGO	et/+	RANGO
1	0.156	17	0.275	39	0.214	30
2	0.172	22	0.225	34	0.250	38
3	0.170	21	0.16	18	0.202	26
4	0.105	7	0.229	35	0.206	28
5	0.166	20	0.155	16	0.222	33
6	0.112	10	0.188	25	0.218	31
7	0.154	14.5	0.177	24	0.165	19
8	0.079	2	0.141	13	0.233	37
9	0.900	3			0.208	29
10	0.110	9			0.203	27
11	0.091	4			0.232	36
12	0.101	6			0.154	14.5
13	0.065	1			0.092	5
14					0.221	32
15					0.106	8
16					0.140	12
17					0.119	11
18					0.173	23
	n=13	R1=136.5	n=8	R2=204	n=18	R3=439.5

$$H = 12 / n(n+1) \sum_{j=1}^k R_j^2 / n, - 3(n+1)$$

j= es el número de observaciones en la muestra
n= es el número total de observaciones.
R= es igual a la suma de los rangos de la muestra

$H = 13.813$

$$H' = \frac{H}{1 - \sum T / (n^2 - n)}$$

T= número de observaciones empatadas.
H= es la calculada

$H' = 13.6258$

P < 0.05 SIGNIFICATIVA. Al realizar la prueba de U de Mann Whitney entre grupos, se encontró que existe diferencia significativa entre los grupos CD1 con et/+ y CD1 con et/et, a un nivel de significancia de P < 0.05.

TABLA NO. 7 INDICE CARDIACO EN RATONES AL DIA 54 POSTERIOR A LA INOCULACION CON LA CEPA "MIGUZ" ANALISIS DE VARIANZA KRUSKAL WALLIS.

RATON	CD1	RANGO	et/t	RANGO	RANGO	et/et
1	0.446	2	0.525	12	0.538	15
2	0.704	29	0.593	20.5	0.634	26
3	0.449	3	0.684	28	0.613	22
4	0.057	18	0.593	20.5	0.546	16
5	0.062	25	0.798	34	0.515	8
6	0.518	9	0.506	7	0.666	27
7	-	-	0.495	6	0.530	14
8	-	-	0.491	5	0.707	30
9	-	-	0.411	1	0.732	32
10	-	-	1.184	35	0.617	24
11	-	-	0.488	4	0.616	23
12	-	-	0.619	10	-	-
13	-	-	0.521	11	-	-
14	-	-	0.557	17	-	-
15	-	-	0.769	33	-	-
16	-	-	0.586	19	-	-
17	-	-	0.527	13	-	-
18	-	-	0.709	31	-	-
	n=6	R1=86	n2=18	R2=305	R3=237	n3=11

$$H = 12 / n(n+1) \sum_{j=1}^k R_j^2 / n_j - 3(n+1)$$

j= es el número de observaciones en la muestra.
n= es el número total de observaciones.
R= es igual a la suma de los rangos de la muestra

.H= 1.590

$$H' = \frac{H}{1 - \sum T / (n^3 - n)}$$

T= número de observaciones empatadas.
H= es la calculada

H'=1.590 SIGNIFICATIVA P > 0.05

TABLA No. 8 DIAMETRO DEL TAMAÑO DEL CORAZON EN RATONES AL DIA 63 POSTERIOR A LA INOCULACION CON LA CEPA N10A.
ANALISIS KRUSKAL WALLIS

RATON	CDI φ σ	RANGO	et/+ φ σ	RANGO	et/et φ σ	RANGO
1	0.84	14.5	1.20	46	0.92	33
2	0.96	39.5	1.30	47.5	0.80	5
3	0.91	30.5	0.93	34.5	0.75	15
4	1.02	46	1.30	47.5	0.95	36.5
5	0.99	43.5	0.90	27	0.81	8
6	0.91	30.5	0.93	34.5	0.80	5
7	0.96	39.5	0.86	20	0.87	22
8	0.97	42	0.75	1.5	0.85	17
9	0.88	24	0.91	30.5	0.81	8
10	0.82	11	0.79	3	0.82	11
11	0.88	24	0.86	20	0.84	14.5
12	0.96	39.5	0.90	27	0.82	11
13	0.85	17	0.83	13		
14	0.85	17	0.81	8		
15	0.90	27	0.88	24		
16	0.99	43.5	0.96	39.5		
17	0.80	5	0.91	30.5		
18	0.86	20				
19	0.95	36.5				
	n1=19	R1=549.5	n2=17	R2=454	n3=12	R3=172.5

$$H = 12 / n(n+1) \sum_{j=1}^k R_j^2 / n_j - 3(n+1)$$

j= es el número de observaciones en la muestra.
n= es el número total de oservaciones.
R= es igual a la suma de los rangos de la muestra
H= 8.591

$$H' = \frac{H}{1 - \sum T / (n^3 - n)}$$

T= número de observaciones empatadas.
H= es la calculada
H' = 8.61

P < 0.05 SIGNIFICATIVA

Al realizar la prueba de U de Mann Whitney entre los grupos se encontró que el grupo et/et es diferente a los et/+ y CD1. P < 0.05

TABLA NO. 9 DIAMETRO DE LOS CIEGOS EN RATONES AL DIA 63 POSTERIOR A LA INOCULACION CON LA CEPA NINOA ANALISIS KRUSKAL-WALLIS.

RATON	CD1 M/H	RANGO	el/+M/H	RANGO	el/+ M/H	RANGO
1	0.49	28.5	0.65	42.5	0.53	35
2	0.48	26.5	0.53	36	0.38	8.5
3	0.63	40.5	0.57	42.5	0.47	24.5
4	0.51	33	0.62	37	0.58	38
5	0.44	21	0.42	39	0.47	24.5
6	0.46	23	0.44	15.5	0.48	26.5
7	0.41	8.5	0.41	21	0.49	28.5
8	0.38	21	0.76	12	0.50	31
9	0.44	44.5	0.34	48	0.40	10
10	0.67	31	0.41	3	0.42	15.5
11	0.50	2	0.43	18.5	0.36	5.5
12	0.25	4	0.50	12	0.37	7
13	0.35	5.5	0.21	18.5		
14	0.36	15.5	0.67	31		
15	0.42	40.5	0.42	1		
16	0.63			44.5		
17	0.70			15.5		
18	0.53					
19	0.66					
	n1=19	R1=485	n2=17	R2=436.5	n3=12	R3=254.5

$$H = 12 / n(n+1) \sum_{j=1}^k R_j^2 / n_j - 3(n+1)$$

j= es el número de observaciones en la muestra.
n= es el número total de observaciones.
R= es igual a la suma de los rangos de la muestra

H= 0.885

$$H' = \frac{H}{1 - \sum T / (n^3 - n)}$$

T= número de observaciones empatadas.
H= es la calculada
H'= 0.99

NO SIGNIFICATIVA P > 0.05.

TABLA No. 10 DIAMETRO DE LOS ESOFAGOS EN RATONES AL DIA 63 POSTERIOR A LA INOCULACION CON LA CEPA NINOA ANALISIS KRUSKAL WALLIS

RATON	CDI σ	RANGO	et/+ σ	RANGO	et/et σ	RANGO
1	0.13	6.5	0.17	23	0.19	29.5
2	0.18	27.5	0.16	17.5	0.17	23
3	0.17	23	0.23	43.5	0.17	23
4	0.16	17.5	0.23	43.5	0.18	27.5
5	0.16	17.5	0.20	39	0.12	3
6	0.16	17.5	0.12	3	0.22	40
7	0.22	40	0.13	6.5	0.15	12.5
8	0.16	12.5	0.12	3	0.20	33
9	0.17	23	0.28	47.5	0.15	12.5
10	0.14	8.5	0.22	40	0.14	8.5
11	0.22	40	0.22	40	0.21	36.5
12	0.16	12.5	0.28	47.5	0.24	45
13	0.12	3	0.20	33		
14	0.15	12.5	0.20	39		
15	0.21	36.5	0.17	23		
16	0.12	3	0.15	12.5		
17	0.17	23	0.19	29.5		
18	0.20	39				
19	0.25	46				
	n1=19	R1=403	n=17	R2=479	n3=12	R3=294

$$H = 12 / n(n+1) \sum_{j=1}^k R_j^2 / n_j - 3(n+1)$$

j= es el número de observaciones en la muestra.
n= es el número total de observaciones.
R= es igual a la suma de los rangos de la muestra
H= 2.214

$$H' = \frac{H}{1 - \sum T / (n^3 - n)}$$

T= número de observaciones empatadas.
H= es la calculada

H' = 2.23

NO SIGNIFICATIVA P > 0.05

TABLA No. 11 DIAMETRO DEL COLON DESCENDENTE EN LOS RATONES AL DIA 63 POSTERIOR A LA INOCULACION CON LA CEPA NINOA ANALISIS KRUSKAL WALLIS

RATON	CDI φ σ	RANGO	et/+ φ σ	RANGO	et/et φ σ	RANGO
1	0.44	28.5	0.33	10.5	0.27	6.5
2	0.46	35	0.33	10.5	0.20	2
3	0.51	43.5	0.45	32	0.28	8
4	0.50	42	0.47	37.5	0.37	14.5
5	0.45	32	0.47	37.5	0.47	37.5
6	0.51	43.5	0.45	32	0.37	14.5
7	0.42	25.5	0.44	28.5	0.33	10.5
8	0.47	37.5	0.25	5	0.34	13
9	0.45	32	0.42	25.5	0.40	21.5
10	0.68	48	0.38	17	0.16	1
11	0.48	40.5	0.41	23	0.27	6.5
12	0.42	25.5	0.21	3	0.24	4
13	0.40	21.5	0.45	32		
14	0.57	45	0.38	17		
15	0.59	46.5	0.42	25.5		
16	0.39	19.5	0.33	10.5		
17	0.59	46.5	0.38	17		
18	0.48	39.5	-			
19	0.39	19.5				
	n 1 = 19	R 1 = 638.5	n 2 = 17	R 2 = 345	R 3 = 134.5	n 3 = 12

$$H = 12 / n(n+1) \sum_{j=1}^k R_j^2 / n_j - 3(n+1)$$

j= es el número de observaciones en la muestra.
n= es el número total de observaciones.
R= es igual a la suma de los rangos de la muestra
H= 22.121

$$H' = \frac{H}{1 - \sum T / (n^3 - n)}$$

T= número de observaciones empatadas.
H= es la calculada
H'= 22.196

P<0.05 SIGNIFICATIVO

Se realizó la prueba de U de Mann Whitney entre los grupos y se encontró que entre los grupos et/+ y et/et no hay diferencias; pero entre estos y el grupo CD1 si, con una P < 0.05.

TABLA No. 12 DIAMETRO DEL COLON TRANSVERSO EN RATONES AL DIA 63 POSTERIOR ALA INOCULACION CON LA CEPA NINOA. ANALISIS KRUSKAL WALLIS

RATON	CDI $\rho \gamma \delta$	RANGO	et/+ $\rho \delta$	RANGO	et/et $\rho \delta$	RANGO
1	0.66	42	0.40	23.5	0.33	16
2	0.61	40.5	0.41	25.5	0.20	3.5
3	0.72	43	0.54	37.5	0.30	13.5
4	0.74	44	0.47	30	0.27	11
5	0.49	32.5	0.60	39	0.39	22
6	0.77	46	0.24	7.5	0.42	27
7	0.88	48	0.38	20.5	0.51	35.5
8	0.49	32.5	0.33	16	0.50	34
9	0.41	25.5	0.54	37.5	0.20	3.5
10	0.84	47	0.24	7.5	0.16	1
11	0.76	45	0.28	12	0.47	30
12	0.61	40.5	0.19	2	0.23	6
13	0.47	30	0.25	9.5	-	-
14	0.25	9.5	0.43	28	-	-
15	0.35	18	0.21	5	-	-
16	0.33	16	0.38	20.5	-	-
17	0.51	35.5	0.30	13.5	-	-
18	0.37	19	-	-	-	-
19	0.40	23.5	-	-	-	-
	n1=19	R1=638	n2=17	R2=335	n3=12	R3=203

$$H = 12 / n(n+1) \sum_{j=1}^k R_j^2 / n_j - 3(n+1)$$

j= es el número de observaciones en la muestra.

n= es el número total de observaciones.

R= es igual a la suma de los rangos de la muestra H=13.504

$$H=13.504$$

$$H' = \frac{H}{1 - \sum T / (n^3 - n)}$$

$$H'=13.51887$$

T= número de observaciones empatadas.

H= es la calculada

Se realizó la prueba de U de Mann- whitney y no se encontró diferencia significativa entre los grupos et/+ y et/et ; pero et/+ y et/et son diferentes al grupo CD1. Con un nivel de significancia al $p < 0.05$

TABLA No. 13 DIAMETRO DEL COLON ASCENDENTE EN RATONES AL DIA 63 POSTERIOR A LA INOCULACION CON LA CEPA NINOA ANALISIS KRUSKAL WALLIS

RATON	cdi qy ↗	RANGO	et/+q ↗	RANGO	et/et q ↗	RANGO
1	0.69	11	0.73	14.5	0.78	25.5
2	1.1	43	0.77	21.5	0.75	19
3	1.09	41	0.72	13	0.65	8.5
4	1.02	39	0.79	27	1.0	38
5	0.63	3	1.1	43	1.77	0.77
6	1.19	47	0.74	17	0.80	28.5
7	1.10	43	0.77	21.5	0.66	6.5
8	0.80	28.5	0.70	12	1.13	46
9	0.68	10	0.65	4.5	0.78	25.5
10	1.03	40	0.73	14.5	0.91	31
11	1.11	45	0.81	2	0.74	17
12	0.84	30	0.94	32	0.77	21.5
13	0.67	8.5	0.78	25		
14	0.66	6.5	0.96	33		
15	0.97	34.5	0.74	17		
16	0.54	1	0.67	8.5		
17	1.20	48	0.98	36		
18	0.99	37	.			
19	0.97	34.5	.			
	n 1 = 19	R 1 = 550	n 2 = 17	R 2 = 342	n 3 = 12	R 3 = 283.5

$$H = 12 / n(n+1) \sum_{j=1}^k R_j^2 / n_j - 3(n+1)$$

j= es el número de observaciones en la muestra.
n= es el número total de observaciones.
R= es igual a la suma de los rangos de la muestra
H=3.65

H' = 3.656

$$H' = \frac{H}{1 - \sum T / (n^3 - n)}$$

T= número de observaciones empatadas

H= es la calculada

P > 0.05 NO SIGNIFICATIVO

TABLA No. 14 INDICE ESPLENICO EN RATONES AL DIA 54 POSTERIOR A LA INOCULACION CON LA CEPA "MIGUZ"
ANALISIS KRUSKAL - WALLIS

RATON	CDI ♀	RANGO	ot/+ ♀ y ♂	RANGO	ot/ot ♀ y ♂	RANGO
1	0.684	6	0.721	8	0.789	13
2	0.762	12	0.815	15	0.909	22
3	0.524	1	0.909	22	1.174	30
4	0.712	7	0.726	9	0.909	22
5	0.550	2	1.189	31	1.264	32
6	0.892	19	0.779	11	1.070	28
7	-	-	0.619	3	1.109	29
8	-	-	1.032	25	1.346	34
9	-	-	0.656	5	1.516	35
10	-	-	0.847	16	0.808	14
11	-	-	0.907	20	1.268	33
12	-	-	0.670	18	-	-
13	-	-	1.530	26	-	-
14	-	-	1.058	27	-	-
15	-	-	1.015	24	-	-
16	-	-	0.852	17	-	-
17	-	-	0.763	10	-	-
18	-	-	0.654	4	-	-
	n1=6	R1=47	n2=18	R2=291	n3=11	R3=292

$$H = 12 / n(n+1) \sum_{j=1}^k R_j^2 / n_j - 3(n+1)$$

j= es el número de observaciones en la muestra.
n= es el número total de observaciones.
R= es igual a la suma de los rangos de la muestra

$$H = 14.126$$

$$H = \frac{H}{1 - \sum T / (n^3 - n)}$$

T= número de observaciones empatadas.

H= es la calculada

H' = 14.127

SIGNIFICATIVA $P < 0.001$

Se realizó la prueba de U de Mann Whitney entre los grupos y se encontró que el grupo et/et es diferente a los grupos CD1 y et/+

X. ANALISIS DE RESULTADOS

De los estudios de las parasitemias observadas mediante frotis sanguíneos hasta los 30 días post-infección no se encontraron tripomastigotes en sangre; sin embargo al día 54 posterior a la inoculación (tabla No. 1) se observó que los ratones et/et presentaron un pico de parasitemia, que se observa también pero en menor cantidad en los ratones et/+, el grupo de los machos en ambos grupos fue el que mostró la mayor cantidad de tripomastigotes. Mientras que los ratones CDI controlaron la infección. Cuando el seguimiento de la parasitemia se realizó mediante la técnica de Q.B.C. que es una técnica más sensible que el frotis sanguíneo, el pico de parasitemia se observó a los 47 días post-infección (tabla No. 2) y fueron los ratones et/et los que mostraron muy abundantes parásitos, dentro de este grupo los machos fueron más susceptibles a la infección en comparación con las hembras, mientras que los ratones CDI mostraron ausencia de tripomastigotes. Una explicación de la alta susceptibilidad de la cepa et/et pudiera ser que los mecanismos celulares juegan un papel muy importante en el control de los tripanosomas y que los ratones et/et son más sensibles a la infección debido a su hipotímia.³

La respuesta inmune de tipo IgM contra antígenos de *Trypanosoma cruzi* al día 30 posterior a la infección muestra al analizar la prueba de Kruskal -Wallis para el ensayo estadístico, que las 3 poblaciones de ratones fueron significativamente diferentes en cuanto a su respuesta inmunológica y al analizar por grupos apareados esos mismos datos por la prueba de Mann-Whitney se encontró que la respuesta de la cepa et/et es mayor a la et/+ y a la CDI en ambos casos $P < 0.05$ (tabla No. 3). Sin embargo al día 54 posterior a la infección se realizó la técnica de ELISA para determinar IgM anti-*T. cruzi* en los grupos et/+ y et/et (tabla No. 4), y se encontró una respuesta similar en esos grupos. Es importante hacer notar la existencia de IgM específica para *T. cruzi* a los 54 días de la infección, esto hace pensar que la respuesta inmune podría ir dirigida contra carbohidratos del parásito, que se sabe no dejan memoria inmunológica, otra posibilidad poco probable sería la variación antigénica en *T. cruzi*, pero esta no está reportada, como ocurre en las tripanosomiasis africanas. Por otra parte al determinar la respuesta secundaria (anticuerpos tipo IgG) mediante ELISA al día 54 posterior a la infección, el comportamiento de los animales et/et y et/+ fue similar según el análisis de Mann-Whitney $P > 0.05$ (tabla No. 5). Como se puede apreciar no hay diferencia en la respuesta específica contra *T. cruzi* en las cepas estudiadas, esto sugiere que la respuesta inmune más importante contra *T. cruzi* es la respuesta celular. Otros investigadores reportan que la síntesis de anticuerpos en los ratones desnudos (nu/nu) es comparable con la de los ratones normales y puede verse afectada en esos animales por enfermedades que causan inmunosupresión como la tripanosomiasis entre otras.^{4, 69}

La respuesta tipo IgG determinada por ELISA frente a un antígeno timo-dependiente como es la BSA (Albúmina Sérica Bovina)⁶ fue analizada mediante Kruskal -Wallis, no se encontró diferencia significativa entre los grupos CDI comparados con los et/+ y la concentración de IgG en los animales et/et comparándolos con los et/+ y el grupo et/et comparados con la cepa et/+ es semejante a un nivel de significancia $P > 0.05$ (tabla No. 6)

Con relación al índice cardíaco (peso del corazón en relación al peso total del ratón) determinado al día 54 posterior a la inoculación determinado en ratones inmunizados con la cepa "MIGUZ" de *T. cruzi*, se analizó estadísticamente mediante Kruskal -Wallis y U de Mann- Whitney, se encontró que el comportamiento de los animales es semejante $P < 0.05$ (tabla No. 7). Sin embargo al medir el diámetro del corazón al día 63 posterior a la infección en los ratones inoculados con la cepa "NINOA" de *Trypanosoma cruzi* si existió diferencia significativa en las 3 cepas de ratones usando el estudio de Kruskal-Wallis $P < 0.05$ y mediante la prueba de Mann-Whitney se ve que la cepa et/et es la que presenta el menor diámetro de las 3 cepas (tabla 8). Es posible que la cardiomegalia en el grupo et/et se pueda presentar posterior a los días 54 y 63 que duró el estudio; algunos investigadores sugieren que la severidad de la enfermedad está dada sobre todo por la cepa usada, cantidad de esta y vía de inoculación³, en este estudio la vía y cantidad de epimastigotes usados en la inoculación fue la misma; sin embargo la cepa "NINOA" si indujo cardiomegalia en el ratón eutímico CD1.

Cuando se midió el diámetro de los ciegos y los esófagos no se encontró diferencia significativa usando la prueba de Kruskal-Wallis $P > 0.05$ (tablas 9y10). Cuando se midieron los diámetros del colon descendente tabla 11, el grupo CD1 mostró tener el mayor diámetro comparado con las cepas et/+ y et/et. El mismo comportamiento demuestra en la tabla 12, en donde el grupo CD1 es el que presenta el mayor diámetro, esto se puede explicar en función de las células T que son las responsables de las reacciones de hipersensibilidad retardada, y como en estos ratones existe deficiencia tímica es de esperarse que presenten una reacción inflamatoria menor.^{3,4} Sin embargo cuando se midió el diámetro del colon ascendente y se analizó mediante Kruskal -Wallis el comportamiento de las 3 cepas de animales se encontró que son similares, es decir no existe diferencia significativa en ninguna de las 3 cepas (tabla 13). Con relación al índice esplénico (tabla 14) se observa que el grupo et/et es el que presenta un índice esplénico mayor que el que se observa en las cepas CD1 y et/+ $P < 0.05$ para la prueba de Kruskal- Wallis y una P de igual significancia para la prueba de Mann-Whitney.

XI. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos y el análisis realizado se plantean las siguientes conclusiones:

1. Comparando las técnicas de frotis sanguíneo y Q.B.C. para medir parasitemia en los 3 grupos de ratones es más sensible el Q.B.C., ya que por ser una técnica de concentración fue más sencillo encontrar y cuantificar los parásitos en la sangre de los animales, además el Q.B.C. es más rápido y de fácil manejo que los frotis.
2. Los machos *et/et* resultaron más susceptibles que las hembras del mismo grupo, por lo que se propone al ratón *et/et* macho como un medio de mantenimiento y aislamiento de cepas, debido a que estos animales se infectan muy bien y sobrevivieron aun a parasitemias altas.
3. En general se puede decir que no hay diferencia entre las cepas CD1, *et/+* y *et/et* en cuanto a la respuesta de tipo humoral primaria y secundaria, por lo que los resultados sugieren que este tipo de respuesta no es eficiente en el control de la tripanosomiasis americana.
4. La presencia de IgM específica contra antígenos de *T.cruzi* a tiempos avanzados de infección (54 días) sugieren que las respuestas inmunes de las cepas estudiadas van dirigidas contra antígenos de naturaleza de azúcares, que se sabe no dejan memoria inmunológica y las respuestas que se dan son de tipo primario.
5. No se encontró supresión inespecífica en el ratón hipotímico *et/et*, pues sus valores de IgG contra un antígeno timo-dependiente como la BSA, tienen una respuesta similar a la encontrada por las cepas CD1 y *et/+*.
6. Se observó que la cepa "NINOA" induce cardiomegalia en la cepa CD1 al día 63, mientras que con la cepa "MIGUZ" no se logró encontrar diferencia en las cepas estudiadas al día 54 post-infección.
7. Se encontró que la cepa CD1 tiene un diámetro mayor en el colon descendente y en el colon transverso, cuando se comparo con las cepas *et/+* y *et/et*.
8. No se observó diferencia estadística alguna entre las cepas estudiadas, en cuanto al colon ascendente.
9. Los animales *et/et* presentaron un índice esplénico mayor que los CD1 y los *et/+*.

XII. ANEXOS

MEDIO DE MANTENIMIENTO PARA *Trypanosoma cruzi*

Fase sólida

Sangre (conejo o carnero)	80 ml.
Agar nutritivo	23 g.
Cloruro de sodio NaCl	5 g.
Agua destilada	1000 ml.

NOTA: Cuando el agar tiene cloruro de sodio (NaCl) se resta o aumenta para 8 g. de cloruro de sodio por litro.

Fase líquida

Medio BHI	370 g.
Agua destilada	1000 ml

NOTA: La sangre utilizada en la fase sólida se agrega en un 10% en base a la cantidad de agar, además la fase líquida es adicionada con gentamicina ajustando a relación a 2 $\mu\text{g/ml}$.

METODO DE LOWRY

Reactivo A

Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2 % + tártrato de Sodio y potasio.
($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6\text{H}_2\text{O}$) al 0.02 % en hidróxido de sodio (NaOH) a concentración de 0.1N.

Reactivo B

Sulfato de cobre (CuSO_4) al 0.5 % en agua.

Reactivo C

50 ml. del reactivo A + 1 ml del reactivo B

Reactivo D

Solución de folin diluida al 1:2 en agua

CALCULOS

Na_2CO_3 0.3379 PAPEL + 0.1 MUESTRA	CuSO_4 0.3354 PAPEL + 0.025 MUESTRA
0.4379	0.3604

0.2249 PAPEL 0.01 MUESTRA	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2 MUESTRA
0.2349	0.4766

Cuenta de tripanosomas en cámara de Neubauer:

$221 \times 50 \times 1000 = 11,050,000/\text{ml} \Rightarrow$ ajustar a 60×10^6 .
 Los parásitos se encuentran en 6.7 ml.
 Hay 11,50000/ml. en 6.7 ml hay un total de 74.035×10^6 .
 74.035×10^6 -----6.7ml.
 60×10^6 -----X \Rightarrow 8.26ml.

$C_1V_1 = C_2V_2$
 $74.035 (6.7 \text{ ml.})$ $V_2 = 8.26 \text{ ml.}$

 60 $6.7 \text{ ml.} + 1.56 \text{ ml sol. salina estéril para ajustar el volumen de tripomastigotes necesario para inmunizar a los ratones.}$

Acido sulfúrico 2.5 N
 (2.5N) (0.5L) 1.25Eq.
 1Eq.-98g/mol.
 $1.25\text{Eq} - X$
 $X = 122.5\text{g.}$ $D = m/v$ $V = m/D = 122.5\text{g} / 1.8\text{g/ml} = 68.05\text{ml}$
 68.05ml -----1L
 X -----0.01L
 X -----0.6805ml.

TECNICA DE ELISA

Amortiguador de recubrimiento

Carbonato -bicarbonato pH=9.63

1.59g. de carbonato de sodio Na_2CO_3

2.93g. de bicarbonato de sodio NaHCO_3

Llevar a 1L. de agua bidestilada en equipo de vidrio. Se puede almacenar a 4 °C por no mas de 2 semanas.

Solución de PBS-Tween

8.0g de cloruro de sodio NaCl

0.2g de fosfato diácido de potasio KH_2PO_4

2.9g de fosfato ácido de sodio dodecahidratado $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

0.2g de cloruro de potasio KCl

0.5mL. de Tween 20

Llevar a un litro de agua bidestilada ajustando a pH=7.4 y guardar a 4°C

Sustrato de peroxidasa

Acido cítrico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 0.1M (24.3 ml.)

Fosfato ácido de Sodio Na_2HPO_4 0.2M (25.7 ml)

Ortofenilendiamina 40 mg. disuelto en 100 ml del amortiguador del sustrato y adicionarle 40 μl H_2O_2 de al 30%.

El sustrato se prepara poco antes de usarlo pues lo daña la luz.

Solución bloqueadora

0.3g de albúmina en 30 ml de leche diluida en PBS.

XIII. REFERENCIAS

1. Sierra J. Enfermedad de Chagas Asociación Mexicana de Infectología 2 (4) 1982; 287-292
2. Velasco C.O La enfermedad de chagas Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas; Secretaria de Salud 1991 7-18
3. Kenneth S.W. Immunology and Molecular Biology of Parasitology Infections. Blackwell Scientific Publications, U.S.A 1993:213-228.
4. Roitt M.I Brostoff J. And malek D. Inmunología 2a. Edición . Salvat Editores S.A. Barcelona España 1991 254-259
5. Urbieto M.E. Participación de la respuesta inmune en la oftalmopatía que sufren los ratones cepa CD1 et/et Tesis profesional Fes Zaragoza UNAM 1996.
6. Castro B.A. Evaluación de las poblaciones celulares de Linfocitos T Mediante C.F. Respuesta primaria y secundaria a BSA Medida por Elisa para caracterizar el modelo murino CD1 et/et Tesis Profesional Fes Zaragoza UNAM. 1995
7. Chester B.P; Rodney C.J. Parasitología Clínica, Salvat España; 1986: 100-108
8. Craig and Faust
9. Roitt I.M. Trypanosomiasis Encyclopedia of Immunology Academic Press inc. U.S.A. 1992 326-329,1512-1514
10. De Andrade A. Changes in Cell-Surface Carbohydrates of *Trypanosoma cruzi* During Metacyclogenesis Under Chemically Defined Conditions, Journal of General Microbiology Great Britain. 1991; 2845-2849.
11. Isselbacher J.K et al. Principles of Internal Medicine MC Graw-Hill, 1980 878-879,1146-1147.
12. Bronfen E, Rocha F. Isolamento de Amostras do *Trypanosoma cruzi* por Cronica Da doenca do Chagas *Trypanosoma cruzi* Samples Witch Chronic. Chagas Disease. Mem Inst. Oswaldo Cruz. 1989; 84: 237-240..
13. Cetrón M.S.; et-al. Humoral and Cellular Immune Response of Adults from North Eastern Brazil With Chornic *Trypanosoma cruzi*. AM.J.Trop Med Hyg Sep. 1993;49(3):370-382.
14. Luquetti, A.O. Megaesofago e Anticorpos Anti-*Trypanosoma cruzi* Rev.Goiana Med. 1987; 33(1/4): 1-16.
15. Said G. Infective Neuropathies. Curr. Neurol. 1994; 7(5): 398-401.
16. Bonfa E. Vian S.T. Barreto C.P Yoshinari H.N. and Cossermelli W. Autoantibodies in Chagas' Disease an Antybody Cross-Reactive with Human and *Trypanosoma cruzi* Ribosomal Proteins. The Journal of Immunology 1993; 150 (9) : 3917-3923.
17. Norris K.A; Galvao L.M.S; Schimp J.E; Cancado J.R ; Humoral Immune Response to the *Trypanosoma cruzi* Complement Regulatory Protein as a Indicator of Parasitologic Clearence in Human Chagas' Disease. Infect Immun 1994 62 (9) 4072-4074.
18. Norris K.A. Brandt B, copper R.N. and S. M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 Binding protein With Funtional and Genetic to the Human Complement Regulatory

- Protein Decay-Accelerating Factor. *The Journal of Immunology* 1991,147(7). 2240-2247.
19. Bach J F. *Inmunología* tomo 1-2-3-4 México Limusa, 1989;125-127,24-31.
 20. Visone E; Campos R; Guilherme C.S. Xenodiagnostico na Doença do Enfermedad de Chagas: Influencia do Sexo dos Triatomíneos. Mem. IV. Jornada do Medicina Tropical de Sao Paulo 1993 s-11.
 21. Venegas B, Guzmán Q, Comparación de dos Técnicas en el Diagnóstico del *Trypanosoma cruzi*. *Gac. Méd de Bolív*; 12(1) Feb. 1988 12-14.
 22. Breniere S.F. Carrasco R; Miguez H; Lemesre J. L. Comparisons of Immunological Tests for Serodiagnosis of Chagas Disease in Bolivian Patients. *Trop Geogr Med*. 1985; 37(3): 231-238.
 23. Perez A.B. de Mello E. Tambouring D.V. and Kipnis T.L. Avaliação da Reactividade Antigenica no Teste Elisa Dos Antigenos Purificados (T-DAF), semi-purificado (F-G2) Edo Extracto total (Ext) para pesquisa de anticorpos Anti-*Trypanosoma cruzi*. Med IV Jornada Científica do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 1993 s-24
 24. Peralta J.M; Teixeira M.G; Shreffler W.G; and Pereira J .B. Serodiagnosis of Chagas' Disease by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Two Synthetic Peptides as Antigens *J. Clin Microbiol* 1994 Apr; 32(4). 971-974
 25. Boiso, Y. J; Wide *Trypanosoma cruzi*: Solubilización y Caracterización parcial de componentes Antígenicos con Triton x-100 rev. *Argent. Microbiol*; 1985 17(3):165-175.
 26. Wincker, Bosseno M F; Britto and Yaksic N. High Correlation Between Chagas' Disease Serology and PRC-Based Detection of *Trypanosoma cruzi* Kinetoplast DNA in Bolivian Children Living in a Endemic Area. *Fems Microbiol Lett* 1994;. 15 124(3). 419-423.
 27. Velasco C.O. Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en México *Rev. de Salud Pública* 1992;34:186-196
 28. Centurion Lara; Barratt I.; Van Voorhis W. .Reaction Amplification of Parasite Kdna Minicircles During Chronic Infection With *Trypanosoma cruzi* *J. Infect Dis* 1994, 170(5): 1334-1339.
 29. Britto C; Cardoso M.A; Vanni C.M; Polimerase Chain Reaction Detection of *Trypanosoma cruzi* in Human Blood Samples a Tool for Diagnosis and Treatment Evaluation. *Parasitology* 1995; 110-115.
 30. Lorca M; Gonzalez A; Veloso C; Reyes V; Vergara; U. . Immunodetection of Antibodies. In sera from Symptomatic and Asymptomatic Chilean Chagas' Disease Patients with *Trypanosoma cruzi* Recombinant Antigens *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1992 Jan; 46(1): 44-49.
 31. Matsumoto K.T. Hoshino-Shimizu S. Nakamura M.P. and Andrade F. H. *Trypanosoma cruzi*: High Resolution of Amastigote form as Antigen in the Serodiagnosis of Chagas' disease. Mem. IV Jornada Científica do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 1993 S-21.
 32. Glaucia s. Paranhos, Cotrim P. and Franco F Molecular Analysis of the gene Encoding a *T. cruzi* Antigen Expressed in Acute Chronic Phases of Chagas Disease. IV Jornada Científica do instituto de medicina tropical de Sao Paulo, 1993;35(10): s-10.

33. Umesawa S.E, da Silveira J, Cotrim P, Glauca S.P and Katzin M.A. Detection of Urinary *T. cruzi* Antigens in Human Chronic Chagasic Patients. Mem. IV Jornada Científica do Medicina Tropical de Sao Paulo 1993 s-19.
34. Umesawa E.S, Dasilveira J. F, Cotrim and Katzin A. M. Circulant Urinary Antigens in Human Chronic Chagasic Patients Sharing Common Epitopes with an Immunodominant Preparative Antigen of *T. cruzi* Mem. IV Jornada Científica do Medicina Tropical de Sao Paulo 1993 s-20
35. Glauca S. Paranhos Cotrim P. and Mortara R. A. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* Repetitive Antigen Associated with the Cytoskeleton. IV Jornada Científica do Instituto do Medicina Tropical de Sao Paulo 1993 35(10):s-10
36. Pastini A C; Iglesias S.R. Carricarte V. C. and Guerin M.E; Immunoassay With Recombinant *Trypanosoma cruzi* Antigens Potentially Useful for Screening Dotblotted Blood and Diagnosing Chagas' Disease; Clin Chem 1994; 40 (10): 1893-1897
37. Brashear R.J. Gixkler M.A; Schur J.D; Leg H. Detection of Antibodies *Trypanosoma cruzi* Among Blood Donors in the Southwestern and Western United States. Evaluation of the Sensitivity and Specificity of an Enzyme Immunoassay for Detection Antibodies to *T. Cruzii* Transfusion 1995 Mar; 35(3):213-218.
38. Winkler M.A., Brashear R.J., Hall H J., Schur J.D. Detection of Antibodies Among Blood Donors in the Soutwestern and Western United States. *Trypanosoma cruzi* Evaluation of a Supplemental Enzyme Immunoassay and Radioimmunoprecipitation assay for Confirmation of Seroreactivity Transfusion 1995; 35(3):219-225
39. Pan A, Rosenberg G.B; Hurley M.K; and Schock G-J; Detection of Antibodies to *Trypanosoma cruzi* Chagas' Disease J. Infect Dis 1992; 165(3):585-588
40. Andrade C.R, Andrade P, Antigens *Leishmania Donovanii* Recognized By Kala-azar Patient sera and Identification of Cross Reacting to Chagas' Disease. Braz J. Med Biol Resp. 1988; 21(3): 511-515.
41. Hindler L.A. Infeccion Chagásica en donantes de sangre de la Rioja: Comparación entre seis reacciones serológicas realizadas. Acta Bioquim. Clin. Latinoam; 1986 Ene-Mar, 20(1):39-47.
42. Barroy G. Screening for Chagas Disease by Immunoenzymology; Comparasion of Elisa with Immunofluoresce and Indirect Hemagglutination in 976 of Blood Donors. Rev Fr. Transfus Immunohematol 1985 Jun; 29d3:201-233.
43. Abreu D.C, Tambourgi D.V., Silva M.R. and Lima D.I., Serological Diagnosis of Chagas Disease Comparison Between T-DAf Specific Elisa assay and other Conventional Test. Mem. IV Jornada Científica de Medicina Tropical do Sao Paulo 1993 s-13.
44. Lemesre J.L; Afchain D; Orozco O; Lovens M. Specific and Sensitive Immunological Diagnosis of Chagas' Disease by Competitive Antibody Enzyme Immuno Using a *Trypanosoma cruzi*- Specific Monoclonal Antibody. Am.J. Trop Med. Hgy 1986; 35(1):86-93.
45. Cuna R.W. Rodriguez C, Torrico F. Afchain D. Loyens M. and Desjeux P. Evaluation of a Competitive Antibody Enzyme immunoassay for Specific Diagnosis of Chagas Disease J Parasitol 1989; 75(3): 357-359

46. Pappas M.G, Hukowki R, Cannon Lt Sr, Hockneyer Wt. Dot Enzymelinked Immnosorbent assay (DOT-ELISA): Comparison with standard Elisa and Complement Fixation assays for the Diagnosis of Human visceral Lishmaniasis Vet Parasitol 1984;14:(3-4) 239-249
47. Matsumoto K.T., Katzing M.A, Shimizo H.S. and Umesawa E.. High Efficiency of DOT ELISA For Detection of Chagasic IgG and IgM Antibodies: Survey in Different Clinical forms of Chagas' Disease. Mem IV Jornada Cientifica do Medicina Tropical de Sao Paulo 1993 s-13
48. Botasso Da, Ingledew N. Cellular Immune Response to Common Mycobacterial Antigens in Subjects Seropositive for *Trypanosoma cruzi*. Lancet 344(8936) Dec. 3 1995 1540-1541
49. Aft W., Aguilera X, Arribada A; Perez C. Treatment of Chronic Human Chagas' Disease With Itraconazole and Allopurinol. Preliminary Report. Rev. Med. Chil. 1994; 122(4): 420-427.
50. Baillot M.A.; Wulert B, Amato N, Avaliacao do Actividade Terapeutica do Itraconazol Nas Infeccoes Cronica, Experimental e Humana, pelo *Trypanosoma cruzi*, Mem. IV. Jornada Cientifica do Instituto do Medicina Tropical do Sao Paulo 1993 s-12.
51. Campos R; Amato N; Baillot N.V.; Avaliacao do Actividade do Fluconazol Na Infeccao aguda, Experimental pelo *Trypanosoma cruzi* Rev. Inst. Med. Trop. do Sao Paulo, 1993 : 35 (10) s-11514
52. Ruiz R.C., Fernández M. and Irulegui I. Observation of Marked Thrombocytopenia during the course of acute experimental Chagas' Disease. Mem. IV Jornada Cientifica do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 1993. S-23.
53. Fernandes M, Velosa A. P, and Irulegui Y. Removal of *Trypanosoma cruzi* from Blood Circulation of Mice Treated with Indometacin. Mem. IV Jornada Cientifica do Medicina Tropical do Sao Paulo , 1993 s-22
54. Fernández M, Hoshikawa-Fujimura A. Y, Azmar A. E, Orechouski H. and Kloetzel J.K. Role of Platelet Aggregation in the Lysis of *T. cruzi* Bloodstream Trypomastigotes . Mem. IV Jornada Cientifica do Instituto do Medicina Tropical do Sao Paulo, 1993 s-22.
55. Fernández M; Veloso A. Irulegui I. Clearance of *Trypanosoma cruzi* in mice treated with a platelet function inhibitory drug. Mem. IV Jornada cientifica do Instituto de Medicina Tropical do Sao Paulo 1993, S-23.
56. Alvarez .M. J. Romero F.C Oshima A. And Menezes H. Resistance of *Trypanosoma cruzi* to blood clearance induced by acute-phase Immune Mouse serum J. Parasitol. 1992, 78(6): 1074-1077.
57. Sato N.M,H.E. Yamashiro-Kanashiro, Iqueoka Y.R Avaliacao do Fenotipo e - Citotoxicidade natural (NK) de Celulas do infiltrado inflamatorio de Miocardio de ratos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*; Rev. Inst. Med. Trop. S- Paulo 1993; 31(sup-10) s-9
58. Sato N.M,H.E,Yamashiro-Kanashiro, Iqueoka. Restauracao da Reposta Blastogenica a con a Celulas de ratos infectados por *Trypanosoma cruzi* a traves da Cimetidina. Med IV Jornada Cientifica do Instituto do Medicina Tropical do Sao Paulo 1993 35(10):s-9.

59. Stites P.D. Terr I.A. Inmunología, humana y básica Edición El manual Moderno, México D.F. 1994 93-101, 113-118 y 191-202.
60. Bellanti J. A. Inmunología Interamericana 3er. Edición., México D.F. 1986 42-49
61. Hamblin A.S. lymphokines. washington dc: IRL Press Oxford, 1990:36.
62. Dabrowski P.M, Dabrowska K.D. Immunoregulatory Role of thymus Press Ed. U.S.A. 1990: 45-51, 76-85.
63. E.S. Golub. Base Celular de la respuesta inmunológica Ed. Reverté S.A Barcelona España 1987:48-49, 26-64.
64. Margni R. Inmunología e inmunquímica 4a. edición. Panamericana Buenos Aires Argentina 1989: 459-460.
65. Harper H.A. Rodwell V.W. and Mayes A.P. Manual de Química Fisiológica 6a. edición, El manual Moderno, México D.F. 1978: 6665-669.
66. Rowland E.C Mikhail K.S and Mc. Cormic T. S. Isotype Determination of Anti-*Trypanosoma cruzi* Antibody in Murine Chagas' Disease J. Parasitol. 1992;78(3): 557-561.
67. Flanagan SP. Nude, A. new hairless gene with pleist effects in the mouse. Genet Res. 1996; :8-295.
68. Pantelouris E.M: Thymus rudiment of the athymic nude mouse. Nature 1975; 256.491-493.
69. Averbach R. Animal Models of Immunological Process Academic press Lond 1982:138-141.
70. Memorias del curso de actualización El ratón desnudo en la Investigación Científica. División de Educación Continua Facultad de Veterinaria y Zootecnia UNAM 1992; 69-82.
71. Rosas P., Castellanos P. and Roberto Domínguez The existence of espontaneous hairless (nude) hypotymic mutant mice from the CD1 Strain, reared under conventional animal house conditions Med. Sci Res. 1987; 15: 533-554.
72. Rosas P, de Paz V, Hernández E, Quiroz U and Dominguez R. Sex Differences in the Effects of Gonadectomy on the weight of the tymus in Adult mice med. Sci Res. 20 1992 509- 510.
73. Klein J. Immunology Blackwell Scientific Publications U.S.A. 1982; :491-492
74. Rose N.R. Friedman J.L. Manual of Clinical Immunology 3er. Edition Washigton D.C American Society for Microbiology 1986:414-426, 484-489 y 798-807.
75. Manual de Inmunología ENCB IPN 1992: PAGINAS
76. Levin R.A; Wardlow S.C. Patton C.L. Detection of Haematoparasites Using Quantitative Buffy Coat Analysis Tubes, Parasitology Today 1989; 11:4.
77. Parcy Dy Cols. Quantitative Buffy Coat. Monofluo Kit Falciparum Comparative Value in the Rapid Diagnosis of Malaria Med. Trop. 1990; 50:97-101.
78. Patton C. L. Cols. Diagnosis of Malaria Using Quantitative Buffy Coat (Q.B.C.) Tubes, 3er International Congress of Malaria and Babesiosis 1987; 7-11.
79. Gray A.D. Akin M.T Evaluation of the Q.B.C. Method to Detect Malaria Infected Red Blood Colls Military Med 1991; 156:245.
80. Atlas of blood parasites Becton Dickinson 1990, 2-5

81. Goldsmith R. and Heyneman D. Parasitología y Medicina Tropical Ed. El manual moderno S.A. México D.F. 1995; 346-350.352-359.
82. Barr S.C., Brown C, Dennis V.A. and Kleit R. The Lesions and prevalence of *Trypanosoma cruzi* in opossums and Armadillos from Southern Louisiana J. parasitology 1991;77(4): 624-627.
83. Barr S.C. Dennis A.V. and Kleit R.T. Growth Characteristics in axenic and cell Cultures, Protein profiles, and zymodeme Typing of three *Trypanosoma cruzi* isolates from Louisiana Mammals J. parasitol. 1990; 76(5):631-638.
84. Knecher I.M; Rojkin I.F; Capriotti G.A.; Lorenzo I.e. Chagas' Disease Screening in Blood Bank Employing Enzyme Immunoassay. Int. J. Parasitol 1994; 24(2): 207-211
85. Prado J. C, Toldo M. P, Garcia T.A, and Kloetzelt K. Auto- cura de *Callomys Callosus* Infectados por *Trypanosoma cruzi*. Mem. IV Jornada Científica de Medicina Tropical do Sao Paulo 1993 s-18
86. Prado J.C. Pilatti C G. Comparative Hemogram of *Callomys Callosus* Infected With high and Low Doses of the y strain of *Trypanosoma cruzi* Mem IV Jornada Científica Instituto de Medicina Tropical do Sao Paulo. 1993; S-18.
87. Licon Trillo A; Peres R.R. Kimestics of the Humoral Immune Response In mice Immunized Against and Inoculated With *Trypanosoma cruzi*. Rev Latinoamericana Microbiol.36(2) Apr-Jun 1994; 119-125.
88. Rosfjord E.C. Spears K. M and Rowland C. E. Analysis of Antibody cross-Reactivity in Experimental American Trypanosomiasis. J.Parasitol. 1990;76 (5). 698-702.
89. Sztejn B.M. cuna R.W. an Kierszenbaum F. *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8 and IL-2R By Mitogen- Activated Helper and Cytotoxic human Lymphocytes. The Journal of Immunology 1990; 144(9) 3558-3562.
90. Sztejn B.M and Kierszenbaum F. *Trypanosoma cruzi* Suppresses the ability of activated human lymphocytes enter the Cell Cycle. The Journal of Parasitology 1991;77 (33): 502-503.
91. Kierzenbaum F, Cuna R.W, Beltz a and Sztejn B.M. *Trypanosoma cruzi* reduces the Number of High- Affinity IL-2 Receptors on activated Human Lymphocytes by Suppressing the Expression of the p55 and p70 receptor Components. Journal of Immunology 1989; 143(1) :275-279.
92. Gomez A.N. Previato O.J. and zingales B. Down-Regulation of Lymphocyte Activation in vitro and in vivo Induced by Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* Journal of Immunology 1996; 156 628-635.
93. Reed G.S et.al Recombinant Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor the Journal of Immunology 1990; 145(5):1560-1564.
94. Cliton B A Y Ortiz L Garcia W *Trypanosoma cruzi*: Early Immune Responses Infected Mice. Exp. parasitol, 1980; 37: 417-425.
95. Kierszenbaum F, Mejia L. H. and Sztejn M. B. *Trypanosoma cruzi* Down regulates the Production of Interleukin-4 and Interleukin-5. Activated Human Lymphocytes J Parasitol, 1996; 82 (4); 652-656.

96. Eski S, Wasson D. L, and Powell R. M. Host Genetics and Resistance to Acute *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice: Profiles and Compartmentalization of IL-2-4-5-10 and inf- γ Producing Cells. *J. Parasitol*, 1996; 82(1): 59-65.
97. Minoprio P, Andrade L, Lembezat M.P. and Coutinho A. Indiscriminate Representation of VII -gene families in the Murine B Lymphocyte Responses to *Trypanosoma cruzi* the *Journal of Immunology* 1989; 142 4017-4021.
98. Voorhis Van C. coculture of human peripheral Blood Mononuclear Cell with *Trypanosoma cruzi* Leads to proliferation of Lymphocytes and cytokine production. *The Journal of Immunology* 1992; 148 (1) 239-248.
99. Cunningham D.S., and Kuhn, R.E: Suppression of Humoral Responses during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infec. Immun.* 1984; 22: 167-182.
100. Rowland E.C. and Kuhn R.E. Suppression of Cellular Responses in Mice during *Trypanosoma cruzi* . *Infection Immun.* 1982; 25 393-397.
101. Ramos, C. Lomoyi E Feal M. and Ortiz-Ortiz, L. *Trypanosoma cruzi* Immunosuppressed response to different antigens in the infected mouse. *Exp. parasitol*, 1983; 45: 190-194.
102. Spears Krand Rowland E.C *Trypanosoma cruzi* Antigen-specific Antibody response in Immunized Mice During Acute and Chronic Infection. *J. Parasitol* 1990; 76(5):690-697
103. Yoshida N, Araya S, Da Silveira J. F. *Trypanosoma cruzi* Antibody Production and T cell Response Induced by Stage-Specific Surface Glycoproteins Purified From
104. Gea S., Grupi A, Cerbanf, Pistorosi Palencia M.C. Immune Response In mice Immunized With Acidic Antigenic Fractions From *Trypanosoma cruzi* Cytosol. *Rev Inst. Med Trop. Sao Paulo* 1992; 34(5) : 389-394.
105. Umezawa E.S. Nascimento M. Alves I.C. and Zingales B. Characterization of Surface Antigens by Antibodies of Mice Inoculated with Diverse Strain Evaluation in crossed immunoprotection IV *Jornada Científica do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 1993 S-20.
106. Rose R.N.; Milgron F. and Carel J.V. *Principios de Inmunología* Ed. Continental, Mex 1983.
107. Mendez R.I; Moreno A.D. *El protocolo de investigación 2ª* Editorial Trillas , México 1996: 154-157.
108. Daniels W.W.. *Bioestadística 2a.* Ed. Limusa México. 1992: 729-733.