

03062

3
2ef



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE EPITOPOS
PROTEICOS DE UNA CEPA MEXICANA DE
Trypanosoma cruzi A TRAVES DEL USO
DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A:
BIOL. MARIA VICTORIA LOPEZ OLMOS

MEXICO. D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

27-3255 1999



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE EPITOPOS
PROTEICOS DE UNA CEPA MEXICANA DE
Trypanosoma cruzi A TRAVES DEL USO
DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MAESTRA EN INVESTIGACION

BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A:

BIOL. MARIA VICTORIA LOPEZ OLMOS

Esta investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, y fue financiada por la DGAPA (UNAM), proyecto IN 224798 y el CONACYT, proyecto 2235 PM. Además, agradezco a la primera institución por la asignación de una beca para estudios de maestría y a la segunda por otorgarme una beca parcial para el término del presente proyecto.

MEXICO. D. F.

1999

DEDICATORIA.

A Froylán por todas tus enseñanzas, pero
sobre todo por confiar siempre en mi.

A mis padres: Alejandra y Ausencio por
darme un hogar feliz.

A mis hermanos: Lupita, Tina, Elo y Jaime
por su presencia.

A mis sobrinos pequeños: Néstor, Alejandra, Aldo, Leonardo, Adrián,
Montserrat, Gaby, Frida, Enrique y la recién llegada, Jimena.

A mis pequeñas mascotas: Dulcinea, la de los ojos tiernos;
a Kika, la de gran carácter, como testimonio de su existencia.
También a Kika, la nueva mascota.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por contribuir en mi formación y por ser parte de ella.

A la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez por su dirección y enseñanzas para la realización del presente trabajo de investigación, que sin duda se reflejarán en el éxito de futuras investigaciones.

Al comité tutorial integrado por la Dra. Ana Flisser y el Dr. Enrique Ortega, gracias por sus invaluableles sugerencias.

Al Comité de Sinodales formado por el Dr. Alejandro Alagón Cano, Dr. Celso Ramos García, Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez, Dra. Luz María López Marín y la Dra. Ingeborg Becker Fauser, por su gran amabilidad y sus acertados comentarios en la revisión del presente trabajo.

Al personal del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas y especialmente a los M.V.Z. Gerardo Arrellín y Georgina Herrera por proporcionarme los animales de experimentación.

Al Sr. José Avilés por su ayuda en la elaboración del material de ilustración.

A mis amigas de laboratorio: Gina, Elba, Lulú, Dolores, Betty y Diana por su apoyo constante y sobre todo por su amistad, mil gracias.

A mi gran amiga Marisela por los buenos momentos que compartimos juntas.

ÍNDICE.

	Páginas
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
II.1. Generalidades	3
II.2. Biología de <i>T. cruzi</i>	4
II.2.1. Posición taxonómica	4
II.2.2. Morfología	5
II.2.3. Ciclo biológico	7
II.3. Mecanismos de Transmisión de <i>T. cruzi</i>	7
II.4. Vectores de <i>T. cruzi</i> en México	9
II.5. Patología de la Enfermedad de Chagas	9
II.6. Distribución Geográfica de la Enfermedad de Chagas	10
II.7. Enfermedad de Chagas en México	12
II.8. Respuesta Inmune Generada por el Hospedero Ante la infección por <i>T. cruzi</i>	13
II.8.1. Respuesta inmune en fase aguda	14
II.8.1.1 Inmunosupresión	17
II.8.2. Respuesta inmune en fase indeterminada	18
II.8.3. Respuesta Inmune en fase crónica	18
II.9. Interacción <i>T. cruzi</i>-Célula Hospedera	20
II.10. Principales Moléculas de Superficie Celular de <i>T. cruzi</i> que Participan en la Infección de la Célula Hospedera	24
II.11. Heterogeneidad en <i>T. cruzi</i>	33
III. JUSTIFICACION	35
IV. OBJETIVOS	36
V. METODOLOGIA	37
V.1. Parásitos	37
V.1.1. Cultivo de parásitos	38
a. Estadio de epimastigotes	38
b. Estadio de tripomastigotes	38
b.1. Tripomastigotes sanguíneos	38
b.2. Tripomastigotes de cultivo	38
V.2. Cultivo de Líneas Celulares	39
V.3. Preparación de Extractos Antigénicos de Diferentes Parásitos	40
V.4. Obtención de Proteínas Secretadas/Excretadas por Epimastigotes y Tripomastigotes	41
V.5. Producción de Anticuerpos Monoclonales	41
V.5.1. Infección e inmunización de ratones	41
V.5.2. Obtención de células de bazo.	41
V. 5.3. Fusión celular	42
V.5.4. Selección y expansión de hibridomas productores de anticuerpos	43
V.5.5. Clonación de hibridomas productores de anticuerpos	44
V.5.6. Producción de ascitis en ratón	44
V.5.7. Congelación de clonas	45
V.5.8. Descongelación de clonas	45

V.6. Determinación del Isotipo de los Anticuerpos Monoclonales	45
V.7. Precipitación de los Anticuerpos Monoclonales con Sulfato de Amonio	46
V.8. Purificación de Anticuerpos Monoclonales	46
V.8.1. Purificación de B106E (IgG2a) y de IgGs de ratón BALB/c	47
V.8.2. Purificación de F14B (IgM)	47
V.8.3. Purificación de 1D5 y 32.2 (IgG1)	48
V.9. Caracterización de los Epitopos de <i>T. cruzi</i>	48
V.9.1. Determinación del peso molecular de los epitopos de <i>T. cruzi</i> reconocidos por los anticuerpos monoclonales	48
V.9.2. Identificación de antígenos comunes en los tres estadios de <i>T. cruzi</i>	49
V.9.3. Identificación de antígenos compartidos con diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> , otros tripanosomátidos y agentes infecciosos.	49
V.9.4. Localización de antígenos de superficie de <i>T. cruzi</i> por diferentes anticuerpos monoclonales	50
V.9.4.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	50
V.9.4.2. Marcaje de proteínas de superficie de <i>T. cruzi</i> por el método de I ¹²⁵ -lactoperoxidasa	51
V.9.4.3. Inmunoprecipitación de proteínas de superficie reconocidas por los diferentes anticuerpos monoclonales	51
V.9.5. Identificación de proteínas secretadas/excretadas por los anticuerpos monoclonales	52
V.9.6. Reconocimiento de carbohidratos por diferentes anticuerpos monoclonales	53
V.9.7. Reconocimiento de proteínas por diferentes anticuerpos monoclonales	54
V.9.8. Actividad lítica de los anticuerpos monoclonales sobre <i>T. cruzi</i>	54
V.9.9. Efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la infección <i>In vitro</i> de células Vero	55
V.9.10. Efecto de los anticuerpos monoclonales en la infección de parásitos <i>in vivo</i>	55
V.9.10.1. Efecto de los anticuerpos monoclonales en la cinética de parasitemia de ratones infectados.	55
V.9.10.2. Efecto de anticuerpos monoclonales en la sobrevivencia de ratones infectados	56
V.10. Análisis Estadístico	56
VI. RESULTADOS	57
VI.1. Producción y Caracterización de los Anticuerpos Monoclonales	57
VI.1.1. Producción de anticuerpos monoclonales	57
VI.1.2. Determinación del isotipo de cada anticuerpo monoclonal	58
VI.1.3. Purificación de los anticuerpos monoclonales	59
VI.2. Caracterización de Epitopos de <i>T. cruzi</i> Mediante el Uso de Anticuerpos Monoclonales	62
VI.2.1. Peso molecular de epitopos de <i>T. cruzi</i>	62
VI.2.2. Reactividad de anticuerpos monoclonales contra tres estadios de <i>T. cruzi</i>	62
VI.2.3. Presencia de las proteínas B106E, F14B, C16D y 1D5 en diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> .	63
VI.2.4. Presencia de las proteínas B106E, F14B, C16D y 1D5 en diferentes agentes infecciosos	66
VI.2.5. Presencia de las proteínas B106E, F14B, C16D y 1D5 en sobrenadantes de epimastigotes y tripomastigotes de cultivo	70
VI.2.6. Localización de antígenos de superficie de <i>T. cruzi</i> por los anticuerpos monoclonales	70

VI.2.6.1. Inmunofluorescencia indirecta de epitopos de superficie	70
VI.2.6.2. Inmunoprecipitación de proteínas de superficie	73
VI.2.7. Identificación de la reactividad de los anticuerpos monoclonales por carbohidratos	73
VI.2.8. Identificación de la reactividad de los anticuerpos monoclonales por proteínas	73
VI.2.9. Actividad lítica de los anticuerpos monoclonales sobre <i>T. cruzi</i>	74
VI.2.10. Efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la infección <i>in vitro</i> de células Vero	77
VI.2.11. Efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la cinética de parasitemia en sangre de ratones	80
VI.2.12. Efecto de los anticuerpos monoclonales en la sobrevivencia de ratones infectados	81
 VII. DISCUSIÓN	 84
 VIII. CONCLUSIONES	 93
 IX. BIBLIOGRAFIA	 95
 APÉNDICE TEÓRICO I	 108
APÉNDICE TEÓRICO II	113
APÉNDICE EXPERIMENTAL I	115
APÉNDICE EXPERIMENTAL II	116
APÉNDICE EXPERIMENTAL III	118
APÉNDICE EXPERIMENTAL IV	119
APÉNDICE EXPERIMENTAL V	121
APÉNDICE EXPERIMENTAL VI	126
APÉNDICE EXPERIMENTAL VII	127

I. RESUMEN.

Trypanosoma cruzi es un protozooario parásito que causa la enfermedad de Chagas en el humano. Es bien conocido que (*T. cruzi*) tiene una constitución antigénica compleja y los antígenos situados en la superficie celular intervienen en la interacción con la célula hospedera. La caracterización de estos antígenos es fundamental para tratar de entender la patología de la enfermedad. Tal caracterización se facilita con el uso de anticuerpos monoclonales (mAbs). Así, se fusionaron linfocitos B obtenidos de un ratón BALB/c que fue infectado con la cepa Querétaro (QUE) (fase crónica), con células de mieloma SP2/0. Los hibridomas se clonaron por dilución limitante. Las clonas resultantes produjeron cuatro diferentes anticuerpos monoclonales denominados: B106E, F14B, C16D y 1D5. Se inició la caracterización de los mAbs y mediante un inmunoblot, se observó que en extracto proteico de epimastigotes, el mAb B106E reconoció un doblete proteico de 180 kilodaltones (kDa); el mAb F14B identificó una proteína de 35 kDa y dos más en el área de 40 kDa; el mAb C16D reconoció dos antígenos de 42 y de 71 kDa, y el mAb 1D5 identificó una proteína de 45 kDa. Con extracto de tripomastigotes y amastigotes, el mAb B106E reconoció aparentemente a la misma proteína que en epimastigotes; el mAb F14B identificó cuatro antígenos de 35, 40, 60 y 70 kDa en tripomastigotes. En amastigotes este anticuerpo identificó a las bandas de 35 y 40 kDa, al igual que en epimastigotes. Los mAbs C16D y 1D5, no reaccionaron con proteínas de tripomastigotes y amastigotes. Por otro lado, se determinó si los mAbs eran específicos de cepa o de especie mediante un inmunoblot. Los cuatro mAbs reaccionaron con las mismas proteínas que previamente fueron identificadas en la cepa QUE, en seis cepas mexicanas y dos cepas sudamericanas de *T. cruzi*; mientras que con *T. rangeli* y *Leishmania sp.*, los mAbs B106E y 1D5, no reaccionaron con ninguna proteína, los mAbs F14B y C16D sí reconocieron proteínas de ambos organismos. Al probar extracto proteico de *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii* y fluido de cisticercos de *Taenia crassiceps*, los mAbs B106E y 1D5 no reaccionaron con proteínas de estos agentes infecciosos, sólo el mAb F14B reaccionó con proteínas de tales parásitos. El mAb C16D cruzó con *M. tuberculosis*. Estos resultados mostraron que los mAbs B106E

son específicos de especie, pues no reaccionaron con parásitos pertenecientes a la misma familia Tripanosomatidae, ni con los agentes infecciosos ya mencionados. La localización de los antígenos se determinó por inmunofluorescencia indirecta y por inmunoprecipitación de proteínas de superficie. Ambas pruebas mostraron que el mAb B106E, está dirigido contra un antígeno de superficie; mientras que el mAb F14B fue positivo por la segunda prueba, mostrando que también se localiza en la superficie celular. Para determinar si estos epitopos eran carbohidratos o proteínas, se trató el extracto de epimastigotes con ácido peryódico y proteinasa K, respectivamente. A través de un ensayo inmunoenzimático (ELISA), se observó que los epitopos fueron de naturaleza proteica. Tratando de estudiar el papel biológico de los antígenos de *T. cruzi* mediante el uso de los mAbs, se evaluó el efecto protector de estos mAbs en ensayos de infección *in vitro* e *in vivo*. Únicamente el mAb B106E inhibió la infección de *T. cruzi* a células Vero, a las 48 h post-infección. En ensayos de infección *in vivo*, el mAb B106E bajó la parasitemia y protegió entre el 50 y 33% de los ratones infectados. Estos resultados hacen a los antígenos caracterizados interesantes para estudiar su función en la interacción de *T. cruzi* con la célula hospedera, su empleo en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y su posible papel protector.

II. INTRODUCCIÓN.

II.1. Generalidades.

Trypanosoma cruzi es un protozooario parásito, cuyo vector es un insecto triatómino perteneciente a la familia Reduviidae. Este parásito causa la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana en el humano, restringida al Continente Americano (W.H.O, 1986; Salazar y col., 1988, OMS, 1991). La mayor parte de los enfermos se encuentran en áreas rurales y suburbanas, en donde la endemia se mantiene debido a las precarias condiciones socioeconómicas de la población, así como a la naturaleza doméstica del vector. Por otro lado, la creciente migración de la población del campo a las ciudades, hace de la transfusión sanguínea otro mecanismo de transmisión importante. También la transmisión congénita se observa en los países con alta endemicidad (Kumate y col., 1992). Se estima que existen de 15 a 20 millones de personas infectadas por *T. cruzi* y se encuentran en riesgo de padecer la enfermedad cerca de 90 millones (W.H.O, 1986).

En México tradicionalmente se piensa que la enfermedad de Chagas no es frecuente, debido al reducido número de casos reportados, pues generalmente se tiende a comparar con los países donde la enfermedad constituye un problema de salud, como: Brasil, Argentina, Chile, Uruguay, Venezuela, Colombia, Bolivia y Ecuador (Kumate y col., 1992); sin embargo, en nuestro país se ha demostrado parasitológicamente y serológicamente que la infección existe. Por otro lado, los vectores infectados con *T. cruzi* se distribuyen en casi todo el territorio nacional (Tay y col., 1992), lo que sugiere que los niveles de enfermedad pudieran ser más altos de lo que se cree.

II.2. Biología de *T. cruzi*.

II.2.1. Posición taxonómica (Levine y col., 1980).

Reino	: Protista Haeckel, 1866
Subreino	: Protozoa Goldfuss, 1818, emd. Vonsiebold, 1846
Phylum	: Sarcomastigophora Honingberg y Balamuth, 1963
Subphylum	: Mastigophora Diesing, 1866
Clase	: Zoomastigophorea Calkins, 1909
Orden	: Kinetoplastida Honigberg, 1963 emd. Vickerman, 1976
Suborden	: Trypanosomatina Kent, 1880
Familia	: Trypanosomatidae Doflein, 1911
Género	: <i>Trypanosoma</i> Gruby, 1843
Especie	: <i>Trypanosoma cruzi</i> Chagas, 1909

T. cruzi pertenece al subphylum Mastigophora, en donde se incluyen a todos los protozoarios que se conocen como flagelados, caracterizándose por poseer uno o más flagelos en su forma trofozoide. La mayoría de los flagelados son de vida libre y se encuentran en varios hábitats, pero algunos son simbioses y otros parasitan vertebrados e invertebrados. Muchas de las especies parásitas habitan el tracto digestivo del hospedero, el sistema circulatorio y los tejidos (Cheng, 1986). Generalmente su reproducción es asexual, siendo básicamente por fisión binaria intracinetal. En otros representantes, la reproducción es sexual (Levine y col., 1980).

El orden Kinetoplastida, incluye a los organismos que presentan una estructura característica: el cinetoplasto, el cual se localiza en la región anterior del cuerpo, asociado a la mitocondria; este organelo está constituido fundamentalmente por ácidos nucleicos que le confieren la capacidad de autoduplicarse. La familia más representativa es la Trypanosomatidae, donde se incluyen formas parásitas del sistema circulatorio causantes de enfermedades serias en el hombre y animales domésticos. Los miembros de esta familia tienen forma alargada, presentan un solo núcleo y un blefaroblasto del cual se origina un flagelo que forma el margen exterior de la membrana ondulante. Son polimórficos, pues presentan estadios flagelados y no flagelados a lo largo de su ciclo de vida (Cheng, 1986).

II.2.2. Morfología. *T. cruzi* en sus diversos hospederos y en medios de cultivo presenta cuatro estadios morfológicos: epimastigotes, tripomastigotes, amastigotes y promastigotes (Schmidt y Roberts, 1984; Sleight, 1989); pero generalmente sólo se consideran los tres primeros estadios (Wyler, 1990).

El **tripomastigote** es un flagelado de cuerpo alargado que mide de 20-25 μm de longitud y 2 μm de ancho, presenta un gran núcleo centrovacuolar, un cinetoplasto subterminal posterior al núcleo formado principalmente por ADN y al cual se asocia una gran mitocondria. El flagelo está adherido a la membrana ondulante del parásito y sale libre en la porción anterior. Este estadio morfológico no reproductivo, se le encuentra en la sangre de mamíferos y en el intestino posterior de los triatóminos infectados como tripomastigotes metacíclicos. La forma de tripomastigote, es infectiva para los mamíferos y para los triatomas cuando chupan sangre de un animal u hombre infectados (Fig. 1A).

El **epimastigote** es de aspecto fusiforme, mide de 20 a 40 μm de longitud. El cinetoplasto se encuentra anterior al núcleo y el flagelo forma una pequeña membrana ondulante. Este estadio morfológico se multiplica en el intestino de los triatóminos y da lugar a los tripomastigotes metacíclicos.

El amastigote es de forma redondeada, mide de 2 a 3.5 μm . El flagelo no es libre y es visible únicamente por microscopio electrónico, el cual se ve dentro de la bolsa flagelar; presenta un núcleo y un cinetoplasto. Este estadio es la forma replicativa intracelular de hospederos mamíferos (Fig. 1B) (Tay y col., 1984; Wyler, 1990). También, se ha observado que los amastigotes transformados en cultivo, tienen la capacidad de entrar y multiplicarse dentro de las células de mamífero e infectan a ratones de la misma manera que los tripomastigotes (Ley y col., 1988).

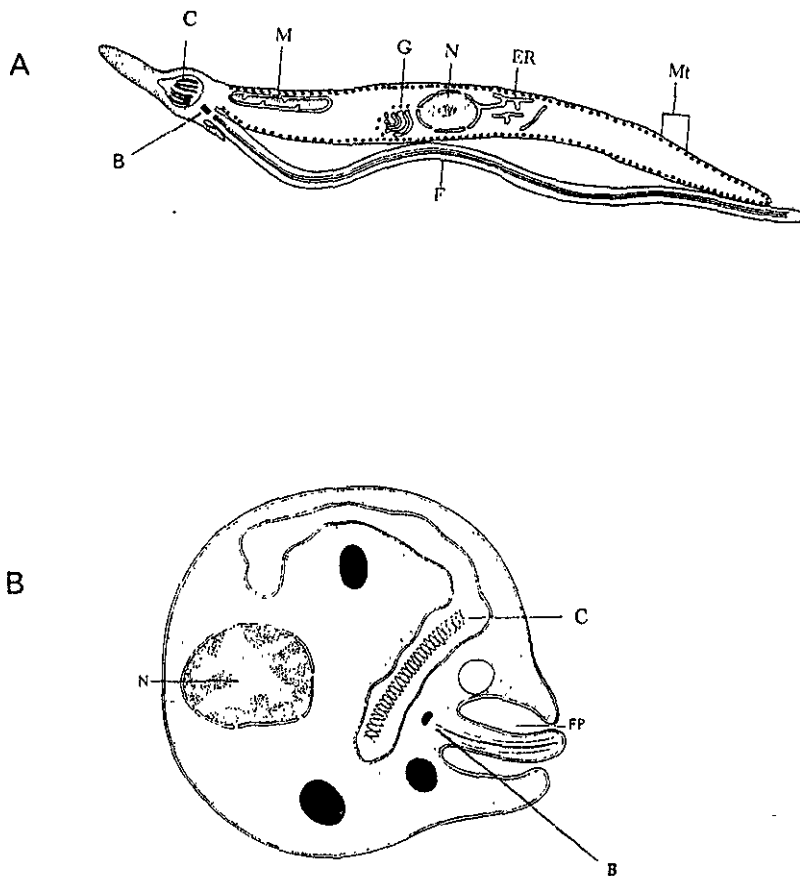


Fig. 1. ULTRAESTRUCTURA DE *T. cruzi*. A) Tripomastigote y B) Amastigote. C, cinetoplasto; M, mitocondria; G, aparato de Golgi; N, núcleo; ER, retículo endoplasmático; Mt, microtúbulos submembranales; B, blefaroblasto; F, flagelo; FP, bolsa flagelar (tomado de Wyler, 1990).

II.2.3. Ciclo biológico. Los tripomastigotes son ingeridos por los triatomas al alimentarse de sangre de mamíferos infectados y una vez dentro del intestino medio de los triatomas, los tripomastigotes se diferencian en epimastigotes y al pasar al intestino posterior se transforman en tripomastigotes metacíclicos. Estos salen de los triatomas a través de las heces durante o después de alimentarse y penetran la piel del vertebrado hospedero mediante punciones o abrasiones cutáneas ocasionadas por el mismo individuo, se introducen en las células del tejido laxo, y adquieren la forma de amastigote. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria, repletan las células, que terminan por romperse, y los parásitos salen a la circulación bajo el aspecto de tripomastigotes, diseminándose por todo el organismo, infectando nuevas células que se transforman en amastigotes para reproducirse y salir a la circulación como tripomastigotes. El ciclo biológico se completa cuando los tripomastigotes son ingeridos por nuevos triatomas hematófagos (Fig. 2) (Athías y Neghme, 1984).

II.3. Mecanismos de Transmisión de *T. cruzi*.

La transmisión de *T. cruzi* es a través de vectores infectados, principalmente del género *Triatoma* por contaminación de la piel y mucosas con las deyecciones del insecto. También la infección se adquiere por hemotransfusiones provenientes de individuos que tienen al parásito, este último mecanismo es el responsable del 20 % de los casos de Tripanosomiasis Americana. Otros mecanismos de transmisión menos comunes lo constituyen la vía transplacentaria, el trasplante de órganos, la ingesta de leche materna, accidentes de laboratorio, el desollamiento de animales silvestres y la ingestión de carne semicruda o de bebidas contaminadas con materia fecal de triatomas (Velasco-Castrejón y col., 1992).

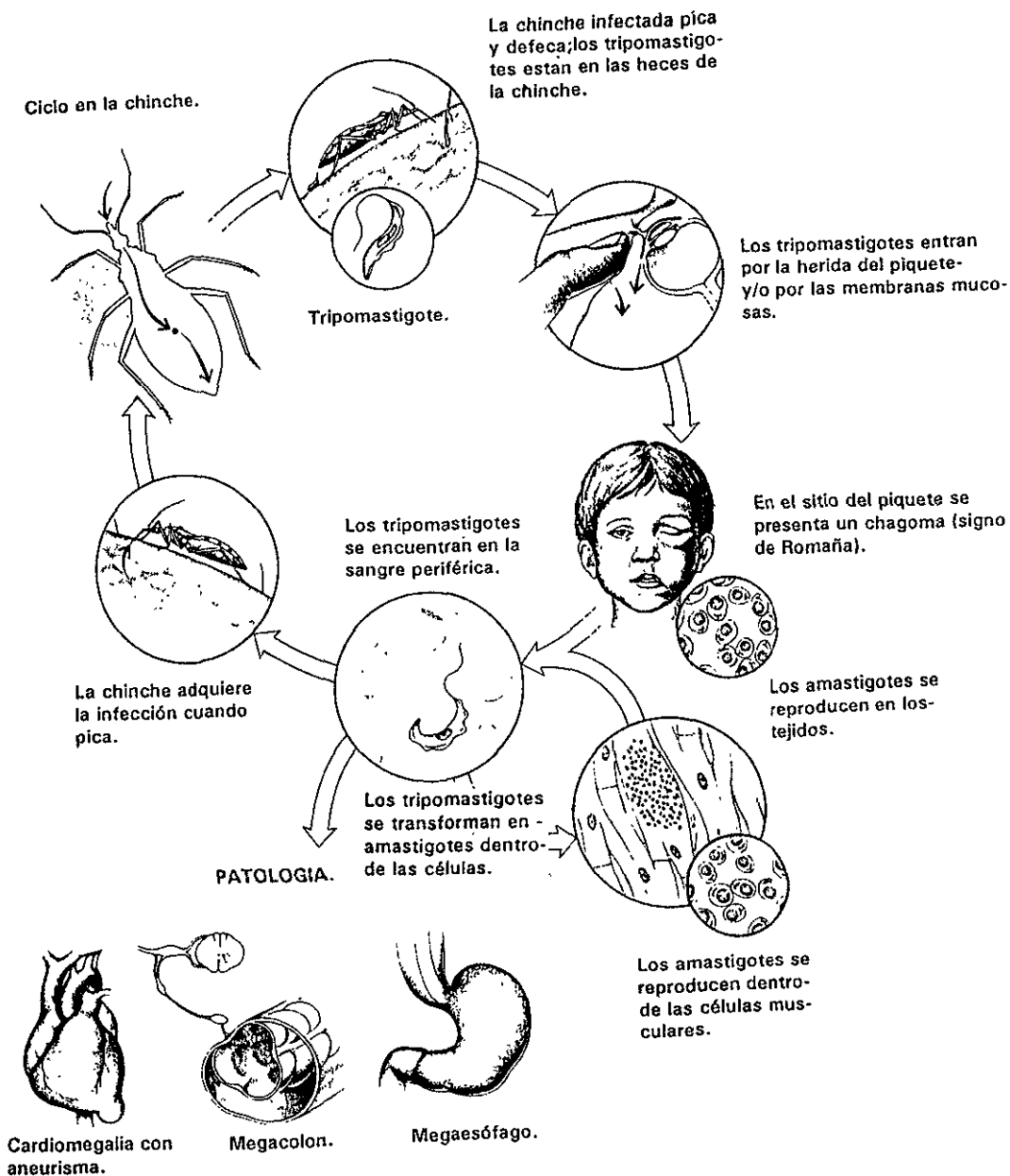


Fig. 2. CICLO DE VIDA DE *T. cruzi*. Se muestran las diferentes fases de desarrollo de *T. cruzi* en el vector y en el hospedero humano (tomado de Katz, Despommier y Gwadz, 1988).

II.4. Vectores de *T. cruzi* en México.

En prácticamente todos los estados de la República Mexicana, se distribuyen 34 especies de triatóminos, pertenecientes a siete géneros diferentes. Así, se han encontrado, 25 especies del género *Triatoma*, una del género *Rhodnius*, una del género *Dipetalogaster*, dos del género *Paratriatoma*, una del género *Panstrongylus*, dos del género *Belminus* y dos del género *Eratyrus*. La distribución de vectores infectados, se ubica desde 0 hasta 2200 metros sobre el nivel del mar y se encuentran en mayor parte en la vertiente del Pacífico lo que hace suponer que la zona endémica de la enfermedad de Chagas es muy amplia, ya que ocupa casi las dos terceras partes del territorio nacional. Las especies mexicanas de mayor importancia por su mayor distribución geográfica y domesticidad son: *T. barberi*, *T. dimidiata*, *T. phyllosoma*, *T. longipennis* y *T. picturata* (Schenone y Rojas, 1989; Velasco-Castrejón, y col., 1991; Tay y col., 1992).

II.5. Patología de la Enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas de acuerdo con la patología que causa en los individuos presenta tres etapas: aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda es más frecuente en los niños y la etapa crónica en las personas adultas.

La fase aguda puede ser asintomática, pero cuando hay signos y la transmisión es por triatomas, aparecen manifestaciones de entrada, presentándose en el sitio de la picadura de la chinche donde los tripomastigotes metacíclicos han entrado a los tejidos, una inflamación generalmente en uno o en ambos párpados (signo de Romaña), si la entrada fuera por el ojo. Las inflamaciones en otras partes del cuerpo, se conocen como chagomas de inoculación. Más tarde hay adenitis, aumento del tamaño de los ganglios linfáticos cervicales y de otras regiones.

También se presenta anemia, dolor de cabeza y en el 95 % de los casos agudos hay fiebre, alcanzando de 38 a 39.5° C. Además, hay muchos tipos de bloqueo cardíaco. La tasa de mortalidad en la fase aguda es probablemente menos del 10 %. Los niños afectados mueren por meningoencefalitis, fallas cardíacas o de bronconeumonía. La duración de esta etapa es de dos a cuatro semanas.

Fase indeterminada o también conocido como etapa crónica asintomática, se presenta después de ocho o diez semanas de que ha terminado la etapa aguda y puede mantenerse por varios años, durante este estado desaparece el cuadro clínico y el individuo se considera curado; sin embargo, la serología es positiva y en algunos casos sí se le estudia adecuadamente hay afecciones cardíacas, y frecuentemente se revelan cambios patológicos indicando el inicio de miocarditis chagásica (síntomas crónicos). No obstante se sugiere la terminación de inflamación activa con ausencia de anormalidades en los electrocardiogramas y un tracto digestivo normal.

Fase crónica, los individuos infectados pueden pasar a esta fase después de 10 a 20 años de que ha ocurrido la infección. La fase crónica se caracteriza por presentar alteraciones cardíacas y/o gastrointestinales. Las anormalidades del corazón incluyen palpitaciones recurrentes, insuficiencia cardíaca, cardiomegalia y por consecuencia cambio en el electrocardiograma. También hay aumento del tamaño del esófago y del colon, con alteraciones del movimiento peristáltico (Hudson y Britten, 1985).

II.6. Distribución Geográfica de la Enfermedad de Chagas.

T. cruzi, los triatomas y la enfermedad de Chagas se distribuyen ampliamente a lo largo del continente Americano (Fig. 3), desde el sur de los Estados Unidos (42° latitud norte) hasta Chile y Argentina (43° latitud sur. Apéndice teórico I) (OPS, 1990; Domínguez, Ricárdes y Espinoza, 1990; OMS, 1991).



Fig. 3. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. Se muestran los principales países (zonas punteadas) con casos humanos infectados con *T. cruzi* (tomado de OMS, 1991).

II.7. Enfermedad de Chagas en México.

Se tiene conocimiento que la enfermedad de Chagas originalmente fue una enzootia silvestre, pero cuando la civilización invadió y degradó los ecosistemas naturales, el vector y *T. cruzi* se adaptaron al hombre.

En nuestro país el estudio de la presencia de *T. cruzi* y la enfermedad de Chagas ocasionada por este parásito, se inició formalmente en 1928 por Hoffman, pues este autor reportó el hallazgo de triatóminos que pudieran ser los transmisores de la enfermedad de Chagas en el humano. En 1940, Mazzotti informó la existencia de dos casos humanos con enfermedad de Chagas en la población de Teojomulco, estado de Oaxaca. Palomo y Rubio reportaron el tercer caso de tripanosomiasis en Mérida, Yucatán (citado en Mazzotti y Dias, 1949). En los años subsecuentes se han seguido reportando enfermos en diferentes estados. Schofield en 1985 calculó 3 millones 800 mil infectados basándose en los datos de Goldsmith y colaboradores (1979, 1986), casi un millón más de los calculados por Velasco-Castrejón en el mismo año. Estos datos parecen ser mayores a los encontrados en la encuesta serológica nacional, en la cual los estados que tuvieron mayor prevalencia de infectados no sobrepasaron el 1%, por lo que se pueden calcular sólo en varios cientos de miles los mexicanos infectados (Velasco-Castrejón y col., 1992). Sin embargo, debido a que la enfermedad se encuentra distribuida en focos, es posible que muchos de éstos no se hayan investigado durante la encuesta seroepidemiológica y sean en realidad muchos más los afectados. En cuanto a los padecimientos no se ha reconocido la presencia de cardiopatía chagásica, sin embargo parece ser más común de lo que se cree. Así, en la Costa Chica común a Guerrero y Oaxaca, se han identificado 50 casos de cardiopatía Chagásica en 120 pacientes cardiológicos que asistían a consulta en un hospital de Acapulco, Guerrero (Velasco y col., 1991), casi todos con importante cardiomegalia. Con respecto a la presencia de megaesófago y megacolon chagásico, se han descrito casos en Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Jalisco y Tabasco (Velasco y col., 1991; Bayona y col., 1983).

El problema de la enfermedad de Chagas por hemotransfusión en México ha sido

estudiado en los bancos de sangre y su búsqueda es de manera obligatoria desde 1992 (Diario Oficial), aunque en la práctica no se realiza. El primer trabajo mexicano en donde se estudió la posible presencia de *T. cruzi* en hemodonadores de la ciudad de Oaxaca, fue realizado por Goldsmith y colaboradores en 1978, quienes reportaron 4.4% de seropositividad. En 1984 se detectaron 16.5% de positivos entre los donadores del Hospital Universitario de Puebla (Bayona y col., 1983)., en 1985 en el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea de la Ciudad de México, se encontró seropositividad en el 0.67%; en 1987 en la ciudad de Acapulco se reportó 11.2% de positividad entre los hemodonadores familiares y 19% entre los remunerados; en 1989 en el banco de sangre del Hospital General "Rubén Leñero" la seroprevalencia fue del 2%; en 1990 en el banco de sangre del Hospital de la Mujer se detectó 1.6% de positividad y en 1991 reportaron 1% de seropositividad en 2,115 hemodonadores de la Cruz Roja Mexicana en el D.F. En todos estos estudios se empleó la técnica de hemaglutinación indirecta. Monteón y colaboradores (1987), en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", detectaron alrededor de 1% de seropositividad en hemodonadores del D.F con una prueba de contrainmunolectroforesis y dot-ELISA.

II. 8. Respuesta Inmune Generada por el Hospedero Ante la Infección por *T. cruzi*.

Durante la enfermedad de Chagas en el hombre y en modelo experimental (ratones) se presentan generalmente tres fases de la enfermedad: aguda, indeterminada y crónica. En cada fase se presenta una respuesta inmune particular.

Los organismos infectados con *T. cruzi* generan una respuesta inmune tanto protectora, como patógena, pues si el hospedero no tiene un sistema inmune competente, éste no será capaz de controlar el crecimiento del parásito. En la resistencia a la infección intervienen muchos componentes del sistema inmune, los cuales se revisaran en cada fase de la enfermedad de Chagas.

II. 8.1. Respuesta inmune en fase aguda. La fase aguda en el humano dura de 1 a 2 meses, lo cual imposibilita su detección y cuando se descubre se da tratamiento médico temprano, lo cual representa un obstáculo para la investigación de esta etapa. Sin embargo, la fase aguda sí se ha estudiado en modelos animales de experimentación (por ejemplo: ratones y ratas). Esta fase se caracteriza por presentar una respuesta policlonal de los linfocitos T y B, hecho asociado con el fenómeno de inmunosupresión, permitiéndose con ello el establecimiento del parásito en el hospedero, por lo que es posible observar parásitos en la circulación sanguínea de individuos infectados. Por otro lado, fueron detectados anticuerpos protectores en ratones infectados después de la cuarta semana de infección, aunque antes de este periodo se encontraron inmunoglobulinas específicas para *T. cruzi*, con isotipo IgM e IgG (Norris, Hart y So, 1989). También se ha planteado que el control de parásitos por el hospedero en la etapa aguda se da en dos fases: en la primera, el control de los parásitos no está mediado por anticuerpos y la respuesta inmune es celular; en la segunda fase, el control de los parásitos es dependiente de anticuerpos, lo cual se demostró por el aumento en la infección de los ratones a los cuales se les suprimieron las células B (Trischman, 1983). La timectomización de ratones neonatales ocasionó un aumento en el número de parásitos y la muerte de los ratones infectados, a diferencia de los ratones controles que sobrevivieron (Brener, 1980).

Otras inmunoglobulinas que se han detectado en organismos infectados son: la IgA, en ratones y en humanos (Primavera y col., 1990) y la IgE en ratones (Bouhdidi y col., 1994). Estas inmunoglobulinas también pueden estar participando en la protección del hospedero, sin embargo no se ha podido establecer su papel claramente.

Por otro lado, estudiando la respuesta inmune humoral en ratones vacunados con la clona no patógena y no infectiva, CL-14 de *T. cruzi*, se observó una producción temprana de IgG1 e IgG2a específicas para el antígeno. Al considerar la falta de infectividad de la clona CL-14, se sugiere fuertemente la participación de la IgG1 e IgG2a en la protección contra la infección por *T. cruzi* (Pyrrho y col., 1998).

Las células T de ayuda (Th) se clasifican de acuerdo al tipo de citocina que producen. Las células Th1 producen interleucina 2 (IL-2), e interferón γ (IFN γ) y las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-10. En la fase aguda de ratones infectados con *T. cruzi*, parece que hay una respuesta de células Th1. Esto se dedujo al observar un aumento en el número de parásitos, de nidos de amastigotes en tejido muscular y en el número de ratones (BALB/c) muertos infectados con tripomastigotes, a los que previamente se les inyectó anticuerpos monoclonales anti-IFN γ , con respecto a los ratones infectados controles (Torrice y col., 1991). Humphrey, McCormick y Rowland (1997), estudiando el papel de las células Th1 y Th2 en ratones resistentes (B10.D2) y ratones susceptibles (DBA/2) a la infección por *T. cruzi*, sugirieron que tanto la respuesta Th1 como la Th2 son activadas durante la fase aguda, ya que los niveles de IFN γ (ratones resistentes) e IL-4 (ratones susceptibles) fueron aumentados.

Existen reportes donde se evaluó el efecto de la IL-10 (Th2) en la infección por *T. cruzi*, y se encontró que ésta actúa como un factor inhibitorio de la producción de INF γ en ratones susceptibles, regulando con ello la severidad de la enfermedad de Chagas en la fase aguda (Silva y col., 1992).

Otra citocina que participa en el control de la infección de *T. cruzi* experimental (fase aguda temprana) es la IL-12. Ésta es sintetizada por los macrófagos al interactuar con tripomastigotes y actúa sobre las células NK para inducir la producción de IFN- γ (respuesta inmune inata). El papel de la IL-12 fue determinado por el tratamiento de ratones infectados con anticuerpos monoclonales contra la IL-12, analizando tanto la parasitemia como la mortalidad en la fase aguda. Los ratones tratados con el mAb contra IL-12 presentaron altos niveles de parasitemia y mortalidad comparada con los ratones controles. También, el tratamiento de ratones infectados con mAbs específicos para IFN- γ o TNF- α inhibieron el efecto exógeno de IL-12. Por otro lado, el TGF- β e IL-10 producidos por macrófagos inhibieron la inducción y efectos de la IL-12. De esta manera, la IL-12, el TNF- α y el IFN- γ participaron en la resistencia a la infección; mientras que el TGF- β y la IL-10 promovieron la susceptibilidad a la infección. Estos resultados apoyaron la participación de la inmunidad

innata del hospedero en el control de la infección de *T. cruzi*. Además, se sugirió que la IL-12 puede participar en la modulación de la miocarditis inducida por *T. cruzi*, pues el tratamiento de ratones infectados con la IL-12 o con el mAb contra la IL-12 indujeron el aumento o decremento de infiltrados inflamatorios en el corazón, respectivamente (Silva y col., 1998).

Los estudios para determinar qué tipo celular participa en la defensa del tejido cardiaco infectado de diferentes animales de experimentación, es decir, células T CD4+ (de ayuda) o células T CD8+ (citotóxicas) mostraron resultados contradictorios. Algunos trabajos señalaron a las células T CD4+ (Ben Younes-Chennoufi y col., 1988; Ribeiro-dos-Santos, Pirmez y Savino, 1991) como predominantes, mientras que otros autores sugirieron que las células T CD8+ (Sato y col., 1992; Sun y Tarleton, 1993) son las que predominan. Datos experimentales sugieren que al eliminar a las células CD4+ y CD8+, hay diseminación de la infección y muerte de los animales, indicando la importancia de estas células en la resistencia a la infección por los parásitos.

Siguiendo con el estudio de la respuesta inmune y tratando de establecer cual mecanismo efector es el que participa en el control de la infección por *T. cruzi*, se emplearon ratones con mutaciones inducidas en los genes responsables de la producción de anticuerpos y en la función citolítica de los linfocitos T. Los ratones deficientes en la producción de anticuerpos mostraron un retraso en la aparición de parásitos y la sobrevivencia de éstos se extendió mayor tiempo, a diferencia de los ratones carentes de células T CD8+. Por otro lado, los ratones deficientes en células B, murieron por efecto de la infección. La infección previa de los ratones con una cepa no virulenta de *T. cruzi* no indujo la protección de los ratones deficientes en células T CD8+ y células B a un nuevo reto con parásitos virulentos. En contraste, ratones con mutaciones en los genes que controlan la vía citolítica mediada por perforina/granzima B, mostraron una tasa de parasitemia y mortalidad similar a los ratones sin mutar (silvestres) y fueron protegidos de una infección secundaria, debido a la exposición previa con parásitos no virulentos. Estos resultados demostraron que la participación de los anticuerpos es necesaria para el control de la infección y que la vía

lítica mediada por perforina/granzima B, no participó en el control de la infección por *T. cruzi* (Kumar y Tarleton, 1998).

Otro tipo celular que interviene en la defensa del hospedero es el macrófago. Su papel se demostró en ratones C3H/HeN infectados con tripomastigotes de la cepa RA (parásitos que son eficientemente internalizados por macrófagos), letales para los ratones y la cepa K98 (parásitos pobremente internalizados por macrófagos), no letales. Los macrófagos de los ratones fueron suprimidos al darles a fagocitar sílica, ocasionando con ello, un aumento en la parasitemia y mortalidad de los ratones infectados con la cepa RA (Celentano y González, 1993). Los macrófagos son activados por IFN- γ , TNF- α (Tarleton, 1988), IL-3 (Ho y col., 1992) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, Reed y col., 1987), eliminando a los parásitos intracelulares a través de la producción de óxido nítrico.

II.8.1.1. Inmunosupresión. Durante la infección aguda por *T. cruzi* se observó inmunosupresión de la respuesta inmune. Hay una reducción en la producción de anticuerpos ante antígenos heterólogos dependientes e independientes de células T (Ramos y col., 1978). Por otro lado, tratando de definir los mecanismos involucrados en la inmunosupresión, se demostró la existencia de células de bazo de ratón supresoras de la respuesta mitogénica de células T a concanavalina A y de la respuesta mitogénica de células B a lipopolisacáridos (Ramos, Shädtler-Siwon y Ortiz-Ortiz, 1979). La interleucina 2, que es un factor de crecimiento de células T y es producida por ellas mismas, está suprimida severamente durante la fase aguda de la infección (Tarleton y Kuhn, 1984) por tal motivo, se ve reducida la proliferación *in vitro* de las células T. No obstante estos resultados, al agregar IL-2 exógena hubo restauración parcial de la respuesta de células T *in vitro*. La expresión de receptores para la IL-2 también se redujo. La producción de IL-3 disminuyó, pero no de la misma manera que la IL-2. Por otro lado, se ha observado supresión del receptor de células T, TCR + y conjuntamente hay disminución en los niveles de las moléculas CD4+ y CD8+ en los linfocitos T de ayuda y citotóxicos, respectivamente

(Sztein, Cuna y Kierzenbaum, 1990; Sztein y Kierzenbaum, 1992).

La variedad de mecanismos que envuelven la supresión de células T podrían reflejar el reclutamiento secuencial de distintas respuestas del hospedero al ir progresando la infección.

II.8.2. Respuesta inmune en fase indeterminada. En esta fase aparentemente no hay síntomas de enfermedad en los individuos infectados con *T. cruzi*, pero sí se presentan daños histopatológicos en células del corazón, esófago y colon. No se detectaron parásitos, pero se cree que los amastigotes al matar a las células infectadas provocan la liberación de una serie de componentes que ocasionan que el hospedero genere anticuerpos contra antígenos propios, causando además la infiltración de células, principalmente de linfocitos en el tejido cardíaco. Los productos tóxicos liberados por las células producen inflamación y daño a los tejidos (Hudson y Britten, 1985). Todo esto hace que los tejidos pierdan funcionalidad y se destruyan, ocasionando la producción de autoanticuerpos (Ternyck y col., 1990).

II.8.3. Respuesta inmune en fase crónica. Durante la fase crónica, los parásitos no son detectados en la circulación sanguínea del hospedero debido a que se localizan dentro de las células que infectaron (Kierszenbaum, 1985). En el modelo murino, la respuesta generada en esta fase por ratones infectados con *T. cruzi* consistió en una respuesta policlonal de células B, produciendo predominantemente IgG2a y una respuesta específica con la producción de IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (Spinella, Liegear y Hontebeyrie-Joskowicz, 1992).

Wirth y Kierszenbaum en 1987, purificaron IgG e IgM de sueros de pacientes y conejos en estado crónico de la enfermedad de Chagas y los probaron en un modelo de infección *in vitro*. Los parásitos se pre-incubaron con los diferentes anticuerpos y después se co-

cultivaron con mioblastos de corazón de ratas. La IgG y la IgM redujeron la infección de los mioblastos un 63% y 65%, respectivamente.

Por otro lado, en la infección por *T. cruzi* en el estado crónico (modelo murino), se pueden observar infiltrados inflamatorios de células mononucleares asociadas al daño presente en tejido muscular, cardíaco y esquelético, resultado que mimetiza funcional e histopatológicamente a lo observado en la enfermedad de Chagas humana (Andrade, 1991; Brener, 1994). Los mecanismos que causan tales lesiones han generado intensos debates. El daño en el tejido puede ser el resultado de una respuesta local de los linfocitos en contra de los antígenos del parásito, antígenos propios del hospedero o a ambos, aunque recientemente con el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ha detectado el ADN del parásito en la lesión del miocardio humano (Brandariz y col., 1995).

Se concluye que en el corazón de ratones infectados con *T. cruzi*, tanto en el estado agudo como crónico, son importantes los infiltrados celulares, principalmente de linfocitos T CD8+. Esto se observó al eliminar tanto a los linfocitos T CD8+ como a los CD4+ a lo largo de las diferentes fases de la enfermedad, utilizando anticuerpos específicos para cada población celular. De esta manera, en la fase postaguda y crónica hubo un incremento en la patología crónica y un aumento de parásitos en el miocardio al quitar las células T CD8+ (Tarleton y col., 1994). Recientes estudios realizados en humanos en estado crónico de la enfermedad y con miocarditis chagásica, mostraron también que las células T CD8+ son las responsables de activar la respuesta inmune del hospedero (Higuchi y col., 1997).

En cuanto a los patrones de citocinas presentes en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, se ha observado que las células T CD4+ producen un patrón de citocinas Th1/Th2, no mostrándose un desplazamiento hacia Th1 o Th2, como en los ratones infectados con *Leishmania major* (Mosman y Sad, 1996), pues se produjo tanto INF- γ como IL-10. De esta manera, al analizar diferentes modelos de infección en donde se emplearon ratones

resistentes y susceptibles y distintas cepas de *T. cruzi*, se observó la producción de INF- γ , sin que para ello influya la constitución genética de los ratones, y la producción de IL-10, la cual se ha asociado a la susceptibilidad, que en este sentido no tuvo un papel claro (Reed y col., 1994, Minoprio y col., 1993). Otro trabajo, mostró un desplazamiento de la respuesta hacia Th1 en ratones resistentes y Th2 en ratones susceptibles (Zhang y Tarleton, 1996). Estos resultados indicaron que el patrón de citocinas producido durante la infección con *T. cruzi*, va a depender de la constitución genética de los ratones y de las cepas utilizadas, señalando la gran complejidad del fenómeno.

En esta fase crónica de la enfermedad, como se ha mencionado hay daño del tejido cardíaco y se había propuesto que se debía a una respuesta autoinmune (Rosenbaum, 1964), ya que las formas intracelulares del parásito raramente se encuentran en las lesiones cardíacas. Sin embargo, como se ha mencionado, técnicas nuevas han podido detectar a los parásitos, como el PCR, que amplifica el ADN de los mismos (Brandariz y col., 1995). Por otro lado, también se observó que anticuerpos contra *T. cruzi* tuvieron reacción cruzada con el músculo cardíaco, músculo esquelético, hígado, sistema nervioso central y periférico, y otros órganos (Cossio y col., 1974; Snary y col., 1983; Towbin y col., 1987), lo que sugiere una respuesta autoinmune del hospedero. Los mecanismos por los cuales se presenta el fenómeno de autoinmunidad y su importancia en la enfermedad de Chagas están en discusión.

II.9. Interacción *T. cruzi*-Célula Hospedera.

El estudio de la interacción *T. cruzi*-célula hospedera, constituye la base para el entendimiento de la patología *in vivo* y la respuesta inmunológica a la infección. Así, la interacción de estas células se ha estudiado desde 1935 (Kofoid, Wood y McNeil, 1935) y continúa en los últimos años, debido a que no se han encontrado aún los mecanismos bajo los cuales *T. cruzi* infecta a su célula hospedera.

T. cruzi invade *in vivo* e *in vitro* a una gran variedad de células hospederas, incluyendo macrófagos, fibroblastos, células epiteliales, células musculares y neuronas. Los macrófagos residentes (no activados) ingieren tanto epimastigotes como tripomastigotes, no obstante, los epimastigotes son destruidos dentro del fagosoma, en tanto que los tripomastigotes escapan al citosol y empiezan el proceso de multiplicación. El destino de los tripomastigotes puede cambiar cuando los macrófagos son activados y transformados en células efectoras de la respuesta inmune. En este caso los macrófagos realmente ingieren y destruyen a tripomastigotes opzonizados (tripomastigotes + anticuerpos). La muerte de los tripomastigotes dentro de los macrófagos se atribuye al efecto de radicales de oxígeno libre, H_2O_2 y O_2 (explosión respiratoria). No obstante Liew y Cox (1991) señalaron que la destrucción de microorganismos por macrófagos se debe a un mecanismo no específico, el cual es mediado por óxido nítrico (NO) derivado de L-arginina.

La interacción entre un parásito y una célula fagocítica puede ser diferente a la que se da con el parásito y una célula no fagocítica, además de que podría depender de la cepa del parásito (Snary, 1985). En este sentido, las cepas con altos porcentajes de tripomastigotes con forma alargada, tendrán la capacidad de invadir cultivos celulares no fagocíticos. Sin embargo, esta capacidad no sólo está dada por características morfológicas. La constitución genética del hospedero también influye en la infección, ya que existen cepas de ratones con alta y baja susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* (Humphrey, McCormick y Rowland, 1997). La fase de crecimiento en la que se encuentre la célula hospedera influirá en el mayor o menor éxito de penetración del parásito (Segura y Cappa, 1985).

La entrada de *T. cruzi* a macrófagos, fibroblastos y células epiteliales ocurre por un proceso de endocitosis, en el cual se presentan tres etapas diferentes: a) adhesión del parásito, b) internalización y c) destino intracelular del parásito, en donde éste es envuelto por una vacuola endocítica y los lisosomas se fusionan o se da el rompimiento de la membrana vacuolar, para finalmente liberar al parásito en el citoplasma para multiplicarse

(Fig. 4) (De Araujo-Jorge, 1989).

Para que ocurra la interacción de *T. cruzi*-célula hospedera están involucrados receptores de ambas células y antígenos del parásito. De esta forma, el parásito presenta en su superficie glicoconjugados y/o componentes del plasma unidos o absorbidos a su membrana, los cuales interaccionan con receptores presentes en la superficie de diferentes células hospederas.

En los macrófagos se expresan muchos receptores que median la fagocitosis, entre ellos tenemos receptores para la porción Fc de diferentes isotipos de inmunoglobulinas (FcR) (Zenian y Kiersenbaum, 1983; Nogueira y Cohn, 1976), tres receptores para los componentes del complemento (CR1, CR2, CR3, receptores de C3b/C4b, C3d y iC3b, respectivamente), receptores para fibronectina (Fn-R), receptores para alfa-2 macroglobulina (A2M-R), receptores parecidos a lectinas que reconocen residuos de azúcar (De Araujo-Jorge y De Souza, 1984; Stahl y col., 1984; Kolb-Bachofen y col., 1984; Neufeld y Ashwell, 1979). También los macrófagos presentan en la superficie moléculas que no son receptores, como son las integrinas (glicoproteína formada por dos subunidad, α y β), las cuales median la interacción célula-célula y célula- matriz extracelular. Estas integrinas (subunidad $\beta 1$ de la familia VLA) participan en la invasión de *T. cruzi* a macrófagos (Fernández, Muños-Fernández y Fresno, 1993).

Otro de los carbohidratos que participa en la invasión de tripomastigotes a la célula hospedera, es el ácido siálico. Se tiene conocimiento de que la enzima trans-sialidasa del parásito participa con el ácido siálico de una manera coordinada en estados iniciales de la invasión. Dada la importancia de los sialoglicoconjugados, se han propuesto dos modelos de interacción parásitos-células de mamífero. En el primer modelo, participa la neuraminidasa removiendo ácido siálico de la superficie del parásito, permitiendo con esto la unión a un aceptor para galactosa en la célula hospedera. El segundo modelo de invasión celular por *T. cruzi*, esta dado por un control negativo y otro positivo. El control positivo, lo ejerce la glicoproteína Gp 85. La unión de la fibronectina a la gp85, permite la

adhesión del parásito a la célula hospedera. La neuraminidasa ejerce un control negativo, pues promueve la desialización del parásito, lo que genera una disminución del nivel de infección (Vermelho y Leal, 1994).



FIG. 4. REPRESENTACION ESQUEMÁTICA DE LAS FASES DE LA INTERACCIÓN T. cruzi-MACRÓFAGO. 1) Adhesión, con estados de atracción, contacto, reconocimiento y unión del parásito a la membrana del macrófago, 2) Internalización, con activación de la maquinaria endocítica, y 3) Destino Intracelular, con fusión del fagolisosoma y además digestión del parásito o rompimiento de la membrana vacuolar y proliferación del parásito liberado en el citoplasma (Tomado de De Araújo-Jorge, 1989).

Los componentes de tripomastigotes involucrados en el reconocimiento por los macrófagos incluyen glicoproteínas que tienen residuos de galactosa-N-acetilglucosamina (Gal-Nac) (Villalta y Kierszbaum, 1983, 1984, 1985; De Araújo-Jorge y De Souza, 1984 y 1986) y proteínas susceptibles a proteasas. Al agregar proteasas exógenamente a los cultivos de parásitos y macrófagos, se observó una mayor activación de los macrófagos (Nogueira y col., 1980; Kipnis y col., 1981; De Araújo-Jorge y De Souza, 1984).

En lo que respecta a los amastigotes, cuya función no es sólo la replicación intracelular, ya que se demostró que circulan en la sangre de mamíferos infectados durante la fase aguda (Ley y col., 1988), son resistentes a la lisis mediada por complemento (Iida, Whitlow y Nussenzweig, 1989) y tienen la capacidad de invadir a macrófagos *in vitro* e infectar a ratones (Hall, 1993). No obstante esto, el papel de los amastigotes extracelulares durante el ciclo de vida del parásito no está claro, sin embargo podrían contribuir a la diseminación del parásito en la célula hospedera. La interacción molecular en la invasión celular por amastigotes está poco definida. Se ha demostrado que la glicoproteína SA85-1 de amastigotes, interactúa con dos lectinas tipo-C (dependientes de Ca^{2+}), que reconocen específicamente carbohidratos, la proteína que une manosa (MBP, proteínas que circulan en la sangre de mamíferos) y el receptor para manosa de los macrófagos (M-R). Así, la adhesión de amastigotes a macrófagos está facilitada por el M-R (Kahn y col., 1995) y la gp85-1 de amastigotes es un ligando para MBP (Kahn y col., 1996).

II.10. Principales Moléculas de Superficie Celular de *T. cruzi* que Participan en la Infección de la Célula Hospedera.

T. cruzi presenta una superficie celular compleja, compuesta principalmente de glicoproteínas y glicolípidos. Su complejidad refleja las diversas funciones que debe llevar a cabo. Así, en la superficie celular se sitúan las moléculas que participan en la adhesión y penetración de las células hospederas y las moléculas que le confieren resistencia a ambientes hostiles, dentro del tracto digestivo del insecto y mamífero hospedero (Takle y Snary, 1993). Evidencias obtenidas de diversos trabajos han sugerido que existe una interacción molecular específica entre *T. cruzi* y la célula hospedera que parasita (Snary, 1985). De esta manera se revisarán diferentes moléculas que participan directamente en la interacción *T. cruzi*-célula hospedera.

Snary y Hudson (1979) identificaron un antígeno de superficie de 90 kDa en epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de la clona Y de *T. cruzi*, para ello se

marcaron los parásitos enteros con la técnica de lactoperoxidasa- I^{125} y las proteínas marcadas se extrajeron con el detergente no iónico Nonidet P40. Enseguida, éstas se sometieron a través de una columna de lectina (*Lens culinaris*, específica para manosa y glucosa) ligada a agarosa. En todos los casos se obtuvo la glicoproteína de 90 kDa. La gp 90, se presentó en diferentes cepas de *T. cruzi*, fue antigénica y en ensayos de protección en donde se inmunizaron a ratones con la proteína, ésta redujo el número de parásitos y protegió al 95% de los ratones infectados (Snary, 1980).

Por otro lado, se identificó una glicoproteína de 90 kDa (pI, 4.6) que participó en la interacción *T. cruzi*-célula hospedera y que no tiene relación con la que previamente identificó Snary. Esta molécula fue expresada en tripomastigotes metacíclicos y se identificó a través del anticuerpo monoclonal, 1G7 (Teixeira y Yoshida, 1986). La importancia del antígeno de 90 kDa en la infección a ratones (BALB/c), se evaluó preincubando el mAb 1G7 y sus fragmentos Fab con tripomastigotes de la cepa Tulahuén y luego los parásitos fueron inoculados a los ratones. El mAb completo y sus fragmentos Fab, bajaron la parasitemia en 80% de los ratones. Tales resultados fueron reproducibles, ya que al transferir al mAb 1G7 pasivamente a los ratones y luego infectarlos, bajó el número de parásitos en circulación. Para estudiar la molécula directamente, se purificó por cromatografía de afinidad y se inmunizaron ratones. La proteína también estimuló específicamente la proliferación de células T *in vitro*, fue reconocida por diferentes sueros de pacientes chagásicos y estuvo presente en diferentes cepas de *T. cruzi* (Mortara, Araguth y Yoshida, 1988). Estas características, permitieron proponer a la glicoproteína de 90 kDa como candidato para el establecimiento de una vacuna contra *T. cruzi* (Araguth, Rodrigues y Yoshida, 1988). En 1990, Yoshida y colaboradores observaron que el antígeno de 90 kDa fue sintetizado como un precursor molecular de 70 kDa, el cual rápidamente se glicosiló y generó a la glicoproteína de 90 kDa madura, que presentó oligosacáridos-N (en la parte amino terminal) principalmente del tipo manosa. En ensayos de infección *in vitro*, el mAb 1G7, inhibió la entrada de las cepas Tulahuén y G a fibroblastos de riñón de mono Verde (células Vero), en un 56 y 51 %, respectivamente.

Otra glicoproteína que se localizó en la superficie de los tripomastigotes fue la gp de 85 kDa (pI, 6.3-7.5), la cual funcionó como ligando, mediando el reconocimiento parásito-célula hospedera no fagocítica (Zingales y Colli, 1985). Los anticuerpos monoclonales, H1A10 y 6A2 (IgG2a) específicos contra esta proteína, así como los fragmentos Fab del anticuerpo H1A10, evitaron parcialmente la invasión de tripomastigotes a células epiteliales de riñón de mono Rhesus (células LLC-MK₂), pues la inhibición fue de entre el 50 y 70 %. Ambos anticuerpos mostraron que la glicoproteína gp 85 contiene N-acetil-D-glucosamina y/o ácido siálico (Alves y col., 1986).

También, se ha descrito la presencia de una proteína de 83 kDa (pI, 8.1-8.6) en tripomastigotes de cultivo, la cual se cree que interviene en la adhesión del parásito a células Vero (Boschetti y col., 1987).

En años subsecuentes, De Arruda, Colli y Zingales (1989), reportaron que anticuerpos de suero policlonal dirigidos en contra de las moléculas de 80-90 kDa y 50-60 kDa de tripomastigotes metacíclicos, inhibieron la internalización de tripomastigotes de la cepa Y a las células LLC-MK₂ en más del 70 %; mientras que con la clona CL-14, se inhibió la invasión en más del 50 % de las células. Además, se encontró que dichas moléculas son epitopos pertenecientes a β -D-galactofuranosil.

En 1990, Saborio y colaboradores, produjeron un anticuerpo monoclonal llamado mAb 20H1, el cual reconoció de cuatro a cinco moléculas diferentes de tripomastigotes de la cepa Perú, cuyo peso fue de entre 34 y 41 kDa. Estas moléculas fueron afines a concanavalina A, lo que indicó que son glicoproteínas. El mAb 20H1 identificó aparentemente a las mismas moléculas en diferentes cepas. En la cepa CL, Esmeraldo y Y, se reconoció una glicoproteína de entre 37 y 43 kDa y en la cepa Silvio una glicoproteína de entre 41 y 45 kDa. Este antígeno se localizó en la superficie del flagelo, cerca de la región en que hay contacto con el cuerpo celular. La localización del antígeno es importante, pues se ha sugerido que el flagelo está involucrado en la adhesión del parásito a diferentes

sustratos, incluyendo la superficie celular del tracto intestinal del vector y la superficie celular de mamíferos que son susceptibles a la invasión por *T. cruzi* (De Souza, 1984).

El antígeno Ssp-3 de tripomastigotes de *T. cruzi*, que pesa 160 kDa, también participó en la invasión a células de mamífero no fagocíticas, pues se observó que la adhesión y la invasión de tripomastigotes a fibroblastos 3T3, es inhibida en más del 70 % por los fragmentos Fab del mAb 87 dirigido contra el epitopo Ssp-3 y esta inhibición fue dependiente de la dosis usada (Schenkman, Díaz y Nussenzweig, 1991). También, se demostró que al incubar tripomastigotes con anticuerpos contra el antígeno Ssp3, la adhesión de éstos a células transfectadas con ADNc que codifica para el receptor Fc, fue aumentada. Este hecho indicó que el aumento en la adhesión estuvo mediada por el Fc de los anticuerpos, y esto se confirmó al abolir la adhesión de los parásitos a las células trasfectadas que se trataron con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los receptores Fc (Schenkman y col., 1992). Estos resultados sugirieron que el antígeno Ssp-3 participó en el proceso de internalización del parásito.

Siguiendo con el estudio de la participación de antígenos sialidados en la infección de *T. cruzi* a ratones, se evaluó la participación de los mAbs 3C9 (IgG1, dirigida contra el antígeno Ssp-3), 46 (IgG2a) y el mAb 39 (IgG2b, específica de la región repetida C-terminal de la trans-sialidasa). De éstos, únicamente el mAb 3C9 al ser transferido pasivamente a ratones de la cepa A/Sn (susceptibles a la infección por *T. cruzi*) redujo el número de parásitos de la circulación sanguínea, del corazón, músculo esquelético, bazo e hígado de los ratones infectados. Este resultado se obtuvo por la detección del ADN del parásito en los diferentes órganos, a través del uso de una secuencia repetida de 195 pb de ADN de *T. cruzi* (González y col., 1984) utilizada como sonda. Además, el mAb 3C9 al ser inyectado a ratones y luego al infectar a éstos con tripomastigotes metacíclicos, se observó la protección del 75 ó 100 % de los ratones. Tal variación dependió de la concentración de anticuerpo utilizada (Franchin y col., 1997).

Otro antígeno que intervino en la interacción de *T. cruzi* a la célula hospedera, fue la neuraminidasa, enzima que presentó patrones característicos de cada cepa, pues su peso varió de 120 a 222 kDa. La enzima fue identificada y caracterizada con los mAbs TCN-1 y TCN-2. Al utilizar al mAb TCN-1 en los ensayos de infección, éste aumentó la infección de los tripomastigotes a las células de cultivo, demostrando que la neuraminidasa modula la infección a través de un mecanismo de control negativo (Prioli, Mejía y Pereira, 1990).

Estudiando otro antígeno de superficie, Yoshida y colaboradores (1989) reportaron un glicoconjugado de aproximadamente 35/50 kDa, el cual fue identificado por el anticuerpo monoclonal 10D8. El mAb 10D8 y sus fragmentos Fab pre-incubados con el parásito, y su transferencia pasiva a ratones, bajaron los niveles de la parasitemia en 60% de los ratones. Este anticuerpo, también inhibió la invasión de las cepas Tulahuén y G a células Vero, entre un 50 y 67 %, respectivamente. Sugiriéndose con ello que el glicoconjugado de 35/50 kDa, está implicado en el reconocimiento de la célula hospedera por *T. cruzi*. Además, se encontró que la expresión del glicoconjugado de 35/50 kDa en la superficie del parásito es polimórfica, lo cual se dedujo de la reacción que tuvieron los anticuerpos monoclonales 10D8, 2B10 (IgG3) y 3F5 (IgA), contra extracto proteico de 11 cepas de *T. cruzi* mediante un inmunoblot. En la cepa MD, el mAb 2B10 sólo detectó una banda de 35 kDa a diferencia de los mAbs 10D8 y 3F5, que reconocieron al doblete de 35/50 kDa. El mAb 10D8, no identificó al glicoconjugado en las cepas Y y CL, aunque éstos si reconocieron a tripomastigotes metacíclicos vivos. El efecto lítico de los anticuerpos monoclonales se evaluó por la prueba de lisis mediada por complemento, los resultados fueron consistentes con la observación de polimorfismo, ya que hubo anticuerpos que lisaron a un porcentaje alto de tripomastigotes, anticuerpos que lisaron a un porcentaje bajo de parásitos y anticuerpos que no lisaron a los tripomastigotes (Mortara y col., 1992).

En 1993, De Cassia y colaboradores estudiando la gp de 90 kDa (Texeira y Yoshida, 1986) y el glicoconjugado de 30/50 kDa, ya antes descritos, encontraron que sólo este último es utilizado por el parásito para invadir a la célula hospedera, ya que al incubar

extracto del parásito con células Vero y luego hacer extracto de éstas, para evaluar el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales 10D8 y 1G7 por tal extracto, se observó que el anticuerpo monoclonal 10D8, sí reconoció a la gp de 30/50 kDa; mientras que el anticuerpo monoclonal 1G7, no reconoció a la gp de 90 kDa. Estos resultados indicaron que probablemente la gp de 90 kDa no está directamente relacionada con el proceso de invasión a las células de mamífero.

El estudio de la participación de la glicoproteína de 35/50 kDa parecida a la mucina en la interacción con la célula hospedera ha continuado, así se investigó si los residuos sializados de la gp 35/50 son requeridos por *T. cruzi* para invadir a la célula blanco. Para ello, se trataron los tripomastigotes metacíclicos, cepa G, con neuraminidasa bacteriana, que quita los residuos de ácido siálico y después éstos se enfrentaron al mAb 10D8 y al mAb 3C9 (anticuerpo dirigido contra el ácido siálico de la gp 35/50). Con el primer anticuerpo sí hubo reconocimiento; en tanto que con el segundo no y los parásitos entraron a las células cancerosas de humano (HeLa) en un número significativamente más alto, que los parásitos que no fueron tratados. La resialización de la gp 35/50 con la trans-sialidasa de *T. cruzi* y la lactosa sializada, restauró la reactividad con el mAb 3C9 y la afinidad de la lectina por el ácido siálico. La tasa de invasión de parásitos resializados, se redujo a niveles similares que los observados con los parásitos antes de la desialización. Una mayor cantidad de la gp 35/50 desializada pura, obtenida de la cepa G, se unió a las células HeLa a diferencia que su contraparte sializada. La señalización por Ca^{2+} , fenómeno asociado con la invasión celular, fue determinada al medir la concentración de Ca^{2+} citosólica ($[Ca^{2+}]_i$) en las células HeLa que interaccionaron con el extracto sonificado de parásitos no tratados y tratados con neuraminidasa o con la gp 35/50 pura en su forma sializada o desializada. Consistentemente con los resultados de invasión celular, los parásitos desializados, así como la gp 35/50 libre de ácido siálico indujeron una elevación en la $[Ca^{2+}]_i$ significativamente más alta, que aquella que fue disparada por los controles sin desialidar. Ninguno de estos efectos, principalmente el incremento en la infectividad y la actividad en la señalización del Ca^{2+} , fue observada en tripomastigotes metacíclicos de la cepa CL

tratada con neuraminidasa, esta cepa expresa una forma variante en el ácido siálico de la gp 35/50 que no es reconocida por el mAb 10D8 y aparentemente no participa en la invasión de la célula blanco (Yoshida y col., 1997).

También se ha descrito una molécula de 82 kDa en tripomastigotes metacíclicos, denominada 3F6, la cual fue detectada y purificada por el anticuerpo monoclonal que lleva el mismo nombre, 3F6. La importancia de esta molécula se observó al pre-incubar el mAb 3F6 y sus fragmentos Fab con tripomastigotes. El mAb inhibió la invasión de tripomastigotes metacíclicos de las cepas Tulahuén y CL a células Vero, entre un 70 y 90% respectivamente. El antígeno 3F6 puro, se unió a las células Vero de manera dosis dependiente, hasta alcanzar la saturación de los receptores y además, este antígeno redujo la infección de las células Vero por tripomastigotes de la cepa CL del 90 al 97 % y por la cepa Tulahuén en un 50%. Este trabajo confirmó que la glicoproteína de 35/50 kDa, la cual fue identificada por el mAb 10D8, también interviene en la invasión a la célula blanco, sin embargo una forma variante de este antígeno se presentó en tripomastigotes metacíclicos de la cepa CL (altamente invasiva) y es irrelevante para esta cepa (Ramírez y col., 1993).

Una vez que se estableció la importancia que tiene la gp de 82 kDa, se clonó y caracterizó el gen que codifica para esta glicoproteína. Para ello, se obtuvo el ADNc de la gp 82 y el inserto de 2140 pb, éste hibridizó fuertemente con 2.2-kb de ARNm de tripomastigotes metacíclicos, lo cual sugirió que los niveles constantes de ARNm para la gp 82, están regulados por el desarrollo del parásito, pues la glicoproteína no se presentó en epimastigotes, amastigotes, ni en tripomastigotes obtenidos de cultivo celular. También, se observó que esta glicoproteína está codificada por una familia multigenética cuyos miembros se distribuyen en varios cromosomas. Un análisis secuencial, entre la gp 82 y miembros de la familia de las sialidasas/gp 85 (TSA-1, Tt34cl, SA85-1.1) reveló una identidad de aminoácidos de entre el 40 y 56%. La gp 82 mostró varios motivos de aminoácidos que son característicos de la familia de sialidasas/gp 85, así tenemos a la caja Asp (SxDxGxTW), el motivo (VTVxNVFLYNR) y la secuencia de anclaje, GPI. En base a

estas características, el gen para la gp 82 puede incluirse en la familia de las sialidasas/gp 85 de *T. cruzi*, pero constituyendo un grupo distinto, el cual preferencialmente se expresa en tripomastigotes metacíclicos (Araya y col., 1994).

Por otro lado, se siguió con el estudio de la gp de 82 kDa, con la finalidad de establecer el dominio requerido por esta molécula para la interacción con su célula blanco. Para ello, se empleó la proteína recombinante y los péptidos sintéticos de la secuencia del antígeno de 82 kDa. Esta molécula y la construcción recombinante correspondiente, J18, inhibieron en un 80% la invasión de *T. cruzi* a células HeLa. Las proteínas recombinantes, J18a y J18b, que presentaron la porción N-terminal y C-terminal de la proteína de 82 kDa, inhibieron la infección celular en un 30 y 65%, respectivamente, y para determinar el dominio exacto que participa en la interacción *T. cruzi*-célula hospedera, se estudiaron diferentes fragmentos truncados de la gp 82. Al comparar el fragmento J18b (224-516 aa) con los fragmentos J18b1 (303-516 aa) y J18b2 (357-516 aa), éstos inhibieron la infección de las células de entre un 40 y 15%, respectivamente. Compatible a estas observaciones, se encontró que las proteínas recombinantes J18b, pero no las J18a o J18b2, se unen a las células HeLa de manera dosis dependiente, llegando a la saturación del receptor. Estudiando 10 péptidos sintéticos que representaban a la gp 82, en donde se incluía del amino ácido 221 al 333, se encontró que los péptidos cuatro (254-273 aa) y ocho (294-313 aa) inhibieron la invasión de *T. cruzi* a las células HeLa en un 55 y 60 %, respectivamente.. Estos resultados indicaron que la porción de la gp82 que participó en la adhesión e invasión, se localizó en el dominio central de la molécula (Santori y col., 1996).

Determinada la importancia de las glicoproteínas de 90, 35/50 y 82 kDa en la interacción con la célula blanco, se analizó la respuesta inmune generada por tales moléculas. La gp 82, se utilizó para inmunizar ratones, éstos produjeron anticuerpos que reaccionaron con la gp 82, la gp de 90 kDa y el glicoconjugado de 35/50 kDa; mientras que el suero anti la gp de 90 kDa, únicamente reaccionó con el mismo antígeno. Ambos antisueros lisaron del 90 al 100 % de las formas metacíclicas, propiedad asociada con protección. La gp 90, sí indujo

inmunidad protectora en contra de la infección aguda por *T. cruzi*; mientras que la gp 82, no fue protectora. Las células de nódulo linfático de ratones sensibilizados con la gp 82 o la gp 90, las cuales mostraron una identidad en la secuencia de aminoácidos del 40 % en el dominio carboxilo terminal, fueron fuertemente estimuladas *in vitro* por ambos antígenos. La proliferación de estas células fue inhibida por anticuerpos anti CD4, en tanto que con anticuerpos anti CD8 no hubo inhibición en la proliferación. El glicoconjugado de 35/50 kDa, extraído con fenol, no produjo anticuerpos detectables ni generó la respuesta de células T (Yoshida y col., 1993).

En 1995, Gomes y colaboradores reportaron el hallazgo de una glicoproteína de 72 kDa en tripomastigotes sanguíneos, la cual se identificó con el anticuerpo monoclonal, 16C11 (IgM). Al pre-incubar tripomastigotes sanguíneos y de cultivo con este anticuerpo, se encontró que el mAb 16C11 fue capaz de fijar proteínas del complemento, ya que lisó al 83 y 56% de los parásitos respectivamente. La molécula reconocida por el mAb parece estar relacionada con la internalización del parásito a células Vero (no fagocíticas) y a macrófagos (fagocíticas), pues al pre-incubar el anticuerpo monoclonal 16C11 con el parásito, se inhibió la infección de los macrófagos y las células Vero en un 83 y 76 %, respectivamente.

También en 1995, se reportó el hallazgo en tripomastigotes metacíclicos de una proteína de 64 kDa que es secretada cuando interacciona con células HeLa. Esta proteína parece actuar como una enzima permeabilizadora e induce la endocitosis, pues facilitó la penetración de partículas de bentonina a células no fagocíticas. Además, al pre-incubar suero inmune dirigido contra la proteína de 64 kDa con los parásitos, se observó una reducción en la tasa de penetración de las formas metacíclicas en macrófagos, es decir del 34 al 57 % y en las células no fagocíticas del 38 al 81%. No tiene actividad de proteasa o de neuraminidasa. Estos resultados sugieren que la proteína de 64 kDa secretada por el parásito juega un papel clave en la penetración de los tripomastigotes a la célula hospedera (Osuna y col., 1995).

En 1997, se identificó un nuevo epítipo antigénico de 60 kDa. Este se purificó a partir de extracto proteico de membranas de epimastigotes de la cepa Tuluahuén, mediante la técnica de electroelusión. La porción amino terminal de esta proteína se secuenció y se sintetizaron los péptidos correspondientes a esta secuencia. La secuencia resultante fue TAEDVLTIFEGEGTGE. Para seguir con el estudio de este epítipo, se produjeron anticuerpos en contra de los péptidos sintéticos. Estos anticuerpos inhibieron el poder infectivo de los tripomastigotes de cultivo a fibroblastos (LLC-MK), en un 50% (Martín y col., 1997).

II.11. Heterogeneidad en *T. cruzi*.

En la interacción *T. cruzi* y su célula hospedera como se ha visto participan diferentes moléculas del parásito y estas moléculas pueden variar debido a la heterogeneidad del parásito.

Las cepas o aislados de *T. cruzi*, han mostrado ser altamente heterogéneas, ya que tienen características biológicas distintas, como: tropismo celular, infectividad, patogenicidad (Giovanni-De-Simone y col., 1987) y crecimiento. También, los patrones isoenzimáticos de diferentes cepas provenientes de varios países, muestran claramente una gran variabilidad genética entre ellas (Tibayrec y col., 1986; Tibayrec y Ayala, 1988). Además, se observaron diferencias en el contenido de ADN total, en la digestión del ADN del cinetoplasto por enzimas de restricción, y en el reconocimiento por anticuerpos monoclonales (Snary, 1985; Mortara y col., 1992). Snary ha sugerido que la variabilidad podría extenderse a otras propiedades, como la interacción con los receptores del hospedero. También, hay variabilidad en la respuesta a la quimioterapia por diferentes cepas de *T. cruzi* tratadas con Benznidazole y Nifurtimox (Andrade, Magalhaes y Pontes, 1985). En 1987, Engman y colaboradores observaron heterogeneidad a nivel molecular de cariotipos; Dietrich y colaboradores (1990) encontraron variabilidad genética en su estudio de restricción de un

gran fragmento polimórfico de la secuencia espaciadora del ARN ribosomal. En 1980, Ortega y colaboradores determinaron patrones isoenzimáticos de 5 aislados mexicanos, encontrando una gran homogeneidad. Zavala-Castro, Velasco-Castrejón y Hernández (1992) contrario al estudio anterior, mostraron que 17 aislados mexicanos de *T. cruzi* eran heterogéneos a nivel genético, observación hecha a partir del estudio del ADN total y del cinetoplasto, relacionándose esta heterogeneidad con el origen geográfico de los parásitos estudiados. Recientes estudios, en donde se trabajo con los mismos aislados mexicanos, demostraron una gran variabilidad, ya que hubo diferencias entre los aislados a nivel de características biológicas, como: la metaciclogénesis (paso de epimastigote a tripomastigote), infectividad y virulencia *in vitro*. Por otro lado, estos aislados mostraron cada uno un único patrón isoenzimático, indicando que quizá estén cercanamente relacionados y se les clasificó de manera similar a la agrupación encontrada por Zavala-Castro, Velasco-Castrejón y Hernández (López-Olmos, 1994; López-Olmos y col., 1998). Además, al estudiar la virulencia *in vitro* de las cepas mexicanas Z10, QUE, Ninoa y H5, se observó variabilidad en los resultados, ya que hubo cepas que mataron a los ratones y otras que no fueron virulentas. La cepa Z10 fue la más virulenta, matando al 100% de los ratones, siguiendole la cepa QUE que ocasionó la muerte del 80 % de los ratones; mientras que la cepa, H5 causó niveles intermedios de muerte de los ratones. Finalmente, la cepa Ninoa no causó la muerte de los ratones (Caballero, 1996).

III. JUSTIFICACION.

Resulta evidente que la interacción de *T. cruzi* con su célula hospedera es un paso fundamental para que el parásito logre invadir al organismo y por consecuencia se disemine y se establezca la patología de la enfermedad. En este fenómeno de infección intervienen diferentes moléculas del parásito. El estudio y caracterización de estas moléculas proporcionaría información importante para el entendimiento y posible control de la enfermedad. Diferentes moléculas de superficie de cepas que circulan en sudamérica participan en la interacción con las células hospederas; sin embargo, se sugiere que la participación de una u otra molécula podrían depender de la cepa de *T. cruzi* con la que se trabaje, por ello es importante establecer qué moléculas de las cepas mexicanas intervienen en la infección *in vitro* e *in vivo*. Así, también las moléculas del parásito se podrían usar en el diagnóstico e inmunoprofilaxis de la enfermedad de Chagas.

IV. OBJETIVOS.

Objetivo General:

- Caracterizar bioquímica y biológicamente a epitopos de la cepa mexicana Querétaro de *T. cruzi* mediante el uso de anticuerpos monoclonales.

Objetivos Particulares:

- a) Producir anticuerpos monoclonales contra la cepa Querétaro de *T. cruzi*.
- b) Caracterización de los anticuerpos monoclonales en su especificidad y actividad lítica *in vitro*.
- c) Caracterizar la naturaleza química de los antígenos.
- d) Determinar el efecto protector de los anticuerpos monoclonales *in vitro* e *in vivo*.

V. METODOLOGÍA.

V.1. Parásitos.

Para el desarrollo del trabajo de investigación se utilizó la cepa Querétaro (QUE) de *T. cruzi* aislada de *Triatoma barberi* y obtenida del estado de Querétaro. La cepa fue donada por el Dr. Rubén del Muro, adscrito a la Facultad de Medicina, UNAM. También, se trabajó con las cepas mexicanas: JAL, JFA, JBE (Jalisco), donadas por el Dr. Héctor González de la Universidad de Guadalajara; Z10, H5 (Yucatán), NINOA (Oaxaca) y las clonas brasileñas: Esmeraldo y Silvio, donadas por el Dr. Roberto Hernández del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. El origen y procedencia de cada cepa se indican en la tabla I.

TABLA I. CEPAS DE *T. cruzi*, *T. rangeli* y *Leishmanis sp* CULTIVADAS *In vitro*.

Cepa	Procedencia	Origen
<i>T. cruzi</i> : QUE	Querétaro (Mex)	<i>Triatoma barberi</i>
JAL	Jalisco (Mex)	Humano
JFA	Jalisco (Mex)	Humano
JBE	Jalisco (Mex)	Humano
Z10	Yucatán (Mex)	<i>Didelphis marsupialis</i>
H5	Yucatán (Mex)	Humano
Esmeraldo CL 3	Brasil	Humano
Silvio X10 CL 1	Brasil	Humano
<i>T. rangeli</i> : AM1	Brasil	ND
<i>Leishmania sp</i> : Solis	(Mex)	Humano

Cepas de *T. cruzi*, *T. rangeli* y *Leishmania sp* empleadas en la realización del presente estudio. El origen de estas cepas fue a partir de reservorios, insectos y hospederos definitivos.

ND. Origen no determinado.

V.1.1. Cultivo de parásitos.

a. Estadio de epimastigote. Los epimastigotes de las cepas: QUE, JAL, JFA, JBE, Z10, H5, Ninoa y las clonas: Esmeraldo y Silvio de *T. cruzi*, se cultivaron en el medio Liver Infusion Triptose (LIT, Apéndice I. Chiari y Camargo, 1984.) a pH 7.2, suplementado con 25 µg/ml de hemina (SIGMA) y 10 % de suero fetal de bovino (SFB. GIBCO) previamente inactivado a 56° C por 30 min. Un total de 5×10^6 parásitos/ml de medio LIT, se incubaron a 28° C en botellas de cultivo (COSTAR) de 25 cm², y con 10 ml de medio.

b. Estadio de tripomastigote.

b.1. Tripomastigotes sanguíneos. Los tripomastigotes sanguíneos se obtuvieron de ratones hembras CD1 de 6 a 7 semanas de edad, que fueron infectados por 0.5×10^6 tripomastigotes de la cepa Querétaro y después de 18 días post-infección, los ratones fueron previamente anestesiados con etér (BAKER) y a partir del plexo axilar derecho se obtuvo la sangre con parásitos. Cada ml de sangre se colectó en tubos de 5 ml con 50 µl de heparina (100 U/ml. SIGMA). Inmediatamente, los ratones se sacrificaron por dislocación cerebral.

b.2. Tripomastigotes de cultivo. Los tripomastigotes de cultivo se obtuvieron a partir de la infección de células Vero con tripomastigotes sanguíneos. La sangre con tripomastigotes de dos ratones infectados, se diluyó 1:5 con solución de fosfatos glucosada (PSG, Apéndice II) y se realizó la purificación de los tripomastigotes a través de un gradiente de Ficoll-Paque (PHARMACIA). Por cada tubo cónico de 10 ml de capacidad, se agregaron 4 ml de Ficoll-Paque y 3 ml de sangre. Se centrifugó a 500 g, durante 30 min a 4° C. La interfase de células mononucleares y tripomastigotes se agregó a las células Vero cultivadas en botellas de plástico de 25 cm² (COSTAR). Se co-cultivaron en medio D-MEM con 5 % de SFB por 24 h a 37° C, con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95 % de humedad. Transcurrido el tiempo de infección, se retiraron los parásitos que se encontraban en el sobrenadante y las células infectadas se cultivaron hasta que emergieron los tripomastigotes metacíclicos. Estos

parásitos se purificaron por centrifugación diferencial. Para ello, primero se eliminaron las células Vero muertas centrifugando a 300 g por 10 min y luego se obtuvieron los tripomastigotes, centrifugando a 1500 g por 20 min. El botón de tripomastigotes se resuspendió en 1 ml de medio D-MEM suplementado con 5 % de SFB.

V.2. Cultivo de Líneas Celulares.

Se emplearon dos diferentes líneas celulares: fibroblastos de riñón, células Vero, obtenidos de *Cercopithecus aethiops* (mono africano Verde) y células de mieloma de ratón, SP2/0. Las primeras se utilizaron para el cultivo de tripomastigotes y con las segundas se realizó la fusión celular. Ambas líneas celulares se cultivaron en medio D-MEM (GIBCO) a pH 7.3, suplementado con L-glutamina (GIBCO) 0.2 mM, aminoácidos no esenciales-MEM (GIBCO) 0.01 mM, piruvato de sodio (SIGMA) 0.1 mM, una solución de vitaminas-MEM (dilución 1:100. GIBCO), penicilina-estreptomicina (SIGMA) a una concentración de 100 µg/ml y 5 % de SFB inactivado, para el cultivo de las células Vero y 10 % de SFB para el cultivo de células SP2/0. Las células se crecieron en botellas de cultivo (COSTAR) de 75 cm² de superficie. Se incubaron a 37° C, con una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

Los dos tipos de células fueron subcultivados al llegar a la confluencia. Las células SP2/0 se subcultivaron tomando 1 ml de la suspensión celular original y después las células se sembraron en una botella de cultivo nueva. Las células Vero adheridas al sustrato de plástico se despegaron mediante un lavado con 5 ml de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) 5 mM, por 10 min. Se retiró éste y se agregaron 500 µl de tripsina (SIGMA) a una concentración de 1 mg/ml de solución balanceada de fosfatos (PBS), durante 15 segundos. El despegado de las células fue total al darle a la botella de cultivo varios golpes firmes. El efecto de la tripsina se paró con 5 ml de medio D-MEM suplementado con 10% de SFB. El subcultivo de estas células se realizó de la misma manera que las células SP2/0.

V.3. Preparación de Extractos Antigénicos de Diferentes Parásitos.

Los extractos de proteína total, se obtuvieron a partir de epimastigotes de nueve días de cultivo de las cepas: QUE, JAL, JFA, JBE, Z10, H5 Nino y de las clonas: Esmeraldo y Silvio de *T. cruzi*. También, se obtuvo extracto de la cepa AM1 de *T. rangeli* (Tabla I) y extracto de tripomastigotes de cultivo de la cepa QUE. Los epimastigotes se centrifugaron a 800 g por 10 min (Andrews y Colli, 1982) y los tripomastigotes a 1500 g por 20 min, la velocidad y el tiempo de centrifugación fue diferente a los que utilizó Yoshida (1986), es decir a 2000 g por 5 min, pues se observó que con estas modificaciones se bajaron totalmente los tripomastigotes, no quedando en el sobrenadante. Después se lavó con 10 ml de PBS a 4 °C y se centrifugó a las mismas gravedades ya citadas. El botón formado se resuspendió en 1 ml de una solución de Tris-HCl pH 8 a 4°C y se agregaron cuatro diferentes inhibidores de proteasas, quedando a una concentración final de 5 mM de EDTA (inhibidor de metalo-proteasas), 1mM de fenilsulfonilfluoruro (PMSF, inhibidor de proteasas de serina), 100 µM de leupeptin (inhibidor de proteasas de serina/cisteína) y 1 µM de pestatina (inhibidor de proteasas de ácido aspartico). Después, los parásitos se lisaron por sonicación (Sonicador Vibra Cell), a 60 Herz con tres ciclos de 2 min. Finalmente, el extracto se centrifugó a 13 000 g por 30 min. Se eliminó el botón de restos celulares y las proteínas en solución se almacenaron a -20°C. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Por otro lado, se uso extracto proteico total de promastigotes de *Leishmania sp*, donada por la Dra. Ingel Becker de la Fac. de Medicina, UNAM; lisado total de taquizoitos del aislado Wiktor de *Toxoplasma gondii*, donada por el Dr. Pascal Herión del IIB, UNAM; extracto de fluido de cisticerco de *Taenia crassiceps*, donado por la Biól. Marisela Hernández del IIB, UNAM; y proteínas secretadas de *Mycobacterium tuberculosis*, donado por la Dra. Clara Espitia del IIB, UNAM.

V.4. Obtención de Proteínas Secretadas/Excretadas por Epimastigotes y Tripomastigotes.

Para obtener proteínas secretadas por *T. cruzi* en sobrenadante, se tomaron epimastigotes de nueve días y tripomastigotes metacíclicos (QUE). Los epimastigotes se centrifugaron a 800 g y los tripomastigotes a 1500 g, durante 10 min. Los epimastigotes se lavaron con medio LIT y los tripomastigotes con medio D-MEM, ambos medios sin SFB. Después, se centrifugaron a las mismas gravedades ya citadas. Enseguida, se contó la viabilidad y se ajustó a 20×10^6 parásitos/ml de medio sin SFB. Los parásitos se incubaron a 37° C, por 2 h. Se contó la viabilidad y se centrifugó a 1500g durante 3 min. Los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana de 0.22 μ m (MILLIPORE) y se concentraron 10 veces, usando un concentrador SAVANT. Finalmente, se almacenaron a -20° C, hasta su uso.

V.5. Producción de Anticuerpos Monoclonales.

V.5.1. Infección e inmunización de ratones. La producción de anticuerpos monoclonales se realizó siguiendo básicamente la metodología descrita por Espinoza y colaboradores (1995). Para inducir la producción de anticuerpos contra *T. cruzi*, se infectaron cinco ratones BALB/c de seis a siete semanas de edad con 1×10^6 tripomastigotes sanguíneos de la cepa QUE. De éstos, tres pasaron a la etapa crónica de la enfermedad, sobreviviendo durante 100 días. Después se tomó uno de estos ratones y se le dio un refuerzo intraperitoneal con 50 μ g de extracto de epimastigotes de la cepa QUE, por dos días. Se le dejó descansar al tercer y cuarto día.

V.5.2. Obtención de células de bazo. Al finalizar el periodo de descanso del ratón (quinto día), se le sacrificó por dislocación cerebral y se le bañó con alcohol al 70%. El ratón se introdujo a una campana de flujo laminar y se le fijó boca arriba a una tabla de disección. Se efectuó una incisión en el abdomen y se extrajo el bazo. Éste se colocó en una

caja de petrí de 60 X 15 mm (COSTAR), que contenía 7 ml de medio D-MEM (GIBCO) sin complementar y se lavó para quitarle el contenido de grasa. Enseguida, se transfirió a otra caja de petrí con medio y el tejido se desgarró con una pinza. Después, los 7 ml de medio con las células de bazo en suspensión se agregaron a un tubo de centrifuga de 15 ml (COSTAR). El tejido de bazo desgarrado, se lavó nuevamente con 5 ml de medio y este volumen de medio se agregó al tubo anterior. El tubo se incubó en hielo por 5 min, eliminándose con ello los fragmentos de tejido. El medio con células se transfirió a otro tubo de 15 ml y se centrifugó a 300 g, durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 10 ml de medio.

V.5.3. Fusión celular. Las células de bazo suspendidas en 10 ml de medio, se mezclaron con 20×10^6 células SP2/0 (lavadas con PBS) suspendidas en el mismo volumen y contenidas en un tubo cónico de 50 ml. Después, se centrifugaron a 300 g durante 5 min. El botón celular se deshizo con golpes suaves. Enseguida, se agregaron 1.5 ml de la solución de polietilenglicol (PEG, SERVA. Apéndice II) al 41 % (mantenida a 37°C) gota a gota, mientras que el tubo se iba girando. El tiempo de incorporación fue de 2 min y el tubo se siguió girando por otro minuto. Se dejó en reposo por 2 min. Transcurrido este tiempo, se agregó medio D-MEM (mantenido a 37° C) a intervalos de 5 min. El tubo se mantuvo en movimiento giratorio durante la incorporación del medio. Se agregaron 5 ml de medio en 5 min, 10 ml de medio en 5 min y 15 ml de medio en 5 min. Inmediatamente, se centrifugó por 3 min a 300 g y después se desechó el sobrenadante. El botón celular, se deshizo con golpes suaves y se resuspendió en 45 ml de medio D-MEM-Hipoxantina, Aminopterina, Timina (HAT, medio seleccionador de células fusionadas, Apéndice II), suplementado con 20% de suero de caballo. La suspensión celular se agregó a cajas de 96 pozos, usando pipetas volumétricas de 10 ml. Los pozos periféricos se llenaron con medio D-MEM. Las células se incubaron por tres días a 37 °C, con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Al cuarto, quinto y séptimo día se les agregó 100µl de D-MEM-HAT (37 °C) a cada pozo.

V.5.4. Selección y expansión de hibridomas productores de anticuerpos. Al décimo día se revisó si los hibridomas crecieron y se efectuó la selección hibridomas productores de anticuerpos mediante un ensayo inmunoenzimático de fase sólida (ELISA). Se utilizaron placas de 96 pozos (COSTAR). En cada pozo de las placas (dejando libres los pozos periféricos) se agregaron 100 μ l de solución amortiguadora de carbonatos, pH de 9.6, conteniendo 1 μ g de extracto proteico de epimastigotes de la cepa Querétaro. Se incubó a 37°C por 2 h en cámara húmeda. Después, se lavó tres veces con Tween 20 al 0.05%-PBS a intervalos de 5 min entre cada lavado. Enseguida, se agregaron 200 μ l/pozo de albúmina sérica bovina (BSA, SIGMA) al 1%-PBS y se incubó a 37°C por 1 h, en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo, se agregaron 100 μ l de sobrenadante de las clonas en cultivo. Como control positivo, se utilizó suero de ratón crónico que fue infectado con *T. cruzi* y como control negativo, suero de ratón no infectado. Se incubó toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se lavó como ya se mencionó e inmediatamente se agregaron 50 μ l/pozo de Tween 20 al 0.05%-PBS, con el anticuerpo contra IgG de ratón acoplado a peroxidasa (ZYMED) diluido 1:2000. Se incubó a 37°C por 2 h en cámara húmeda. Se lavó tres veces. Después, se agregaron 100 μ l/pozo de una solución constituida por 4 mg del sustrato ortofenildiamina (SIGMA) disuelto en 5 ml de una solución amortiguadora de citrato 0.1 M-fosfato 0.2 M a pH 5 y 5 ml de agua destilada, y 0.12 % de peróxido de hidrógeno. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente y se paró la reacción agregando 50 μ l/pozo de ácido sulfúrico 2.5 N (Apéndice III). La absorbancia se leyó a 490 nm en un espectrofotómetro BIO-RAD, Modelo 3550 (Microplate reader). Esta prueba se repitió hasta asegurar que las colonias de células continuaran positivas como en el primer ELISA, así como de no descartar a las colonias que no produjeran la concentración de anticuerpo suficiente en las primeras pruebas. Las colonias de células positivas se transfirieron a placas de 24 pozos (COSTAR) con 1 ml de medio D-MEM-HAT y una vez que crecieron, se tomaron los sobrenadante y se realizó un ELISA, si las clonas continuaban positivas, se transferían a cajas de cultivo de 25 cm² (COSTAR) con medio D-MEM-HAT suplementado con 15 % de suero de caballo. Una vez crecidas las células, se les cambió el medio paulatinamente a D-MEM-HT suplementado con 15 % de SFB, hasta llegar a cultivarlas con D-MEM-HT

suplementado con 10% de SFB.

V.5.5. Clonación de hibridomas productores de anticuerpos. Una vez que se expandieron los hibridomas, se inició la clonación por el método de dilución limitante descrito por Harlow y Lane (1988) con modificaciones ligeras. Para ésto, fue necesario obtener células que aportaran soporte y factores de crecimiento a las clonas. Dichas células nodrizas se obtuvieron a partir de un bazo de ratón, siguiéndose el mismo procedimiento señalado en el punto de fusión celular. Las células de bazo se resuspendieron en 4 ml de medio D-MEM suplementado con 10 % de SFB y después se tomaron 50 μ l para sembrarse en placas de 96 pozos e incubarse toda la noche a 37 °C con 5% de CO₂ y 95 % de humedad.

La clonación se realizó a partir de los hibridomas crecidos en las cajas de 25 cm². Se obtuvieron cuatro diferentes concentraciones celulares: 10, 3, 1 y 0.3 células. Estas se sembraron en las cajas que tenían a las células nodrizas y se incubaron a 37°C con 5 % de CO₂ y 95% de humedad. Una vez que las clonas crecieron se les sometió a un ELISA. Las clonas que crecieron en la dilución de 0.3 células y que presentaron densidades ópticas (D.O) altas en el ELISA, se expandieron primero en placas de 24 pozos y luego en cajas de 25 cm². Finalmente, las células así clonadas se volvieron a subclonar siguiendo la misma metodología.

V.5.6. Producción de ascitis en ratón. Se usaron ratones BALB/c (hembras) de 6 a 7 semanas de edad, a los cuales se les inyectó 0.5 ml de 2, 6, 10, 14-Tetrametilpentadecano (pristan, ALDRICH) por vía intraperitoneal. Después de 7 a 14 días, se les inyectó 5 X 10⁶ clonas productoras de anticuerpos monoclonales a través de la misma vía. A la semana, el abdomen aumentó de tamaño y se drenó el fluido de ascitis por medio de la introducción de una aguja de jeringa de 18 X 38 mm (YALE) en el área peritoneal. El fluido de ascitis se mantuvo 1 h a temperatura ambiente y toda la noche a 4° C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 13 000 g por 20 min y el sobrenadante se almacenó a -20° C (Harlow y Lane,

1988).

V.5.7. Congelación de clonas. Las clonas productoras de anticuerpos monoclonales cultivadas en botellas de 72 cm², se centrifugaron a 300 g por 10 min. El botón celular se resuspendió en 1 ml de SFB con 10 % de dimetil sulfóxido (DMSO, SIGMA). La suspensión celular, se agregó a un criotubo (NUNC) de 1.8 ml de capacidad. Inmediatamente, se congelaron a -72° C por 24 h. Después, se pasaron a nitrógeno líquido (-185° C) donde se mantuvieron hasta su uso.

V.5.8. Descongelación de clonas. Los viales con las clonas se sacaron del nitrógeno líquido y se transfirieron a un contenedor de hielo. Inmediatamente, se descongelaron a 37° C en baño María. Una vez que las células se descongelaron, el vial se limpio con alcohol al 70 %. Las células se transfirieron a un tubo con 10 ml de medio D-MEM suplementado con 10% de SFB a 37° C. Las células se centrifugaron a 300 g. El botón celular se resuspendió suavemente en 7 ml de medio D-MEM suplementado con 10% de SFB. Las células se agregaron a botellas de cultivo de 25 cm² (Harlow y Lane, 1988).

V.6. Determinación del Isotipo de los Anticuerpos Monoclonales.

La determinación del isotipo de cada anticuerpo monoclonal, se realizó por medio de un ELISA de captura. Primero, se sensibilizó una placa de 96 pozos para ELISA (COSTAR) con 1 µg/pozo de extracto proteico de epimastigotes. Se incubó a 37°C por 2 h en cámara húmeda. La placa se lavó tres veces con 200 µl/ pozo de tween 20 al 0.05 %-PBS. Después, cada pozo se bloqueó con 200 µl de albúmina al 1%-PBS, y se incubó por 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Inmediatamente se agregaron 100 µl de sobrenadante de las clonas productoras de los mAbs y se incubó a 4 °C por toda la noche, en cámara húmeda. Se lavó tres veces como ya se señaló. Enseguida, se agregaron 50 µl de anticuerpos (producidos en chivo) contra los siguientes isotipos de ratón: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA

(SIGMA), usando una dilución 1:1000. Se lavó tres veces y se agregó 50 µl/ pozo de anticuerpo contra chivo IgG, unido a peroxidasa (SIGMA), dilución 1:2000. Finalmente, se agregaron 100 µl/pozo del sustrato ortofenildiamina a una concentración de 0.5 mg/ml de amortiguador de citrato-fosfato pH 5. Se dejó reaccionar y se paró ésta con 50 µl de ácido sulfúrico al 2.5 N. Se leyó la D.O a 490 nm.

V.7. Precipitación de los Anticuerpos Monoclonales con Sulfato de Amonio.

Para realizar la precipitación de los anticuerpos monoclonales, primero se colectó sobrenadante de las clonas en cultivo o ascitis de ratones BALB/c y éstos se centrifugaron a 3000 g durante 30 min. Enseguida, el sobrenadante o el ascitis se agregó a un vaso de precipitado y con un magneto se le agitó lentamente sin formar espuma. La precipitación se logró agregándose gota a gota una solución saturada de sulfato de amonio $[(NH_4)_2SO_4]$ a la muestra, permitiendo que cada gota se dispersara antes de adicionar la próxima. Se dejó de agregar hasta que se llegó al 50 % de saturación (cuando se llegó al 20% de saturación, la muestra se tornó lechosa). La muestra se mezcló durante 2 h a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 10 000g durante 30 min. Se guardó el sobrenadante y el botón de anticuerpos se lavó tres veces con sulfato de amonio al 50%-PBS. Los anticuerpos se resuspendieron en 2 ml de PBS y se dializaron en contra de 1000 ml de PBS. Se realizaron cinco cambios. La muestra dializada se centrifugó a 1500 g por 30 min a 4°C. Finalmente, se almacenó a -20°C hasta su uso (Goding, 1986; Harlow y Lane, 1988).

V.8. Purificación de Anticuerpos Monoclonales.

Se usaron anticuerpos monoclonales específicos para *T. cruzi* denominados B106E, F14B, 1D5. El anticuerpo monoclonal (mAb 32.2, isotipo IgG1) no relacionado dirigido contra el

Fc humano y las inmunoglobulinas (IgGs) de suero de ratón no infectado fueron purificados por cromatografía de afinidad. Las condiciones y soluciones usadas para cada purificación variaron de acuerdo con el isotipo de cada anticuerpo monoclonal.

V.8.1. Purificación de B106E (IgG2a) y de IgGs de ratón BALB/c. Para la purificación del mAb B106E y de las IgGs de suero de ratón no infectado, se utilizaron 2 ml de proteína A-agarosa, depositados en una columna. Ésta se equilibró con 50 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.14 M, pH 8. Enseguida, se pasaron de 200 a 350 ml de sobrenadante con el mAb. El flujo de paso fue de 1.1 ml de sobrenadante/min. El suero de ratón (3.5 ml) se incubó con la columna a 4° C por toda la noche, en agitación constante. Después, cada columna se lavó con 100 y 300 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.14 M, pH 8, respectivamente. Inmediatamente, el mAb se eluyó con glicina 0.2 M, pH 2.8 y se colectaron 11 fracciones de 1 ml. El pH de las muestras se neutralizó con 200 µl de tris 1 M, pH 8.2 y se leyó la densidad óptica a 280 nm. Al terminar la elución la columna se lavó con 50 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.14 M, pH 8 (Apéndice IV).

V.8.2. Purificación de F14B (IgM). Para purificar al mAb F14B, se utilizaron 2 ml de anticuerpo contra IgM de ratón-agarosa agregados a una columna. Esta purificación se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del proveedor (SIGMA), como brevemente se explica a continuación. La columna se equilibró con 50 ml de amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 7.2, con NaCl 0.5 M (PB). Después, se incubaron 52 mg de mAb (3 ml) precipitado con sulfato de amonio o 6 ml de ascitis con la columna, por 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, en agitación lenta. El mAb F14B también se purificó a partir de 350 ml de sobrenadante. El flujo de paso de éste fue de 1.1 ml/ min. Enseguida, se lavó con 130 ml de PB, si la fuente de anticuerpos fue sobrenadante o con 300 ml de PB, si la columna se incubó con ascitis. El mAb se eluyó con glicina 0.1 M y NaCl 0.15M, pH 2.4 y se colectaron 11 fracciones, las cuales se neutralizaron de la misma manera que en la sección V.8.1. Finalmente la columna se lavó con 50 ml de PB (Apéndice IV).

V.8.3. Purificación de 1D5 y 32.2 (IgG1). Para la purificación de estos mAbs, se emplearon 2 ml de proteína G recombinante-agarosa (proteína Gr, GIBCO), depositada en una columna. Esta columna se equilibró con 50 ml de tris 0.1 M, NaCl 0.2 M, pH 8.2. Enseguida, la columna se incubó con 60 mg (3 ml) del mAb 1D5, precipitado con sulfato de amonio a partir de sobrenadante de cultivo celular o con 6 ml de ascitis con el mAb 32.2. Estos se incubaron a temperatura ambiente por 2 h o toda la noche a 4° C. Después se lavó con 130 ml de tris 0.1 M y NaCl 0.2 M, pH 8.2 (Apéndice IV) y se eluyó con glicina 0.2 M, pH 2.8. Se colectaron las mismas fracciones y se neutralizó de la misma manera que en la sección V.8.1. La columna se lavó con 50 ml de tris 0.1 M, NaCl 0.2 M, pH 8.2.

La concentración proteica de cada muestra purificada se determinó bajo la relación de que 1 D.O equivale a 0.8 mg de proteína.

V. 9. Caracterización de los Epitopos de *T. cruzi*.

V.9.1. Determinación del peso molecular de los epitopos de *T. cruzi* reconocidos por los anticuerpos monoclonales. El establecimiento del peso molecular de los epitopos reconocidos por los anticuerpos monoclonales se determinó por inmunoblot. Para ésto, se separaron 150 µg de extracto proteico de epimastigotes (cepa QUE) en condiciones reductoras (con mercaptoetanol) y no reductoras (sin mercaptoetanol). Esta separación proteica fue a través de una electroforesis en un gel preparativo al 12 ó 10 % de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio, respectivamente (SDS-PAGE, Apéndice V) (Laemmli, 1972), por 45 min a 200 volts. Después, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.2 µm (SCHELEICHER and SCHEELL), durante 1 h a 100 volts (Apéndice V), (Towbin y col., 1979). Enseguida, la membrana se cortó en tiras de 0.5 mm de diámetro y aproximadamente 11 µg de proteínas inmobilizadas y los espacios sin proteína se bloquearon con 10 % de leche descremada en PBS, incubando toda la noche a 4 °C. Pasado este periodo, las tiras se incubaron con 10 µg de anticuerpos monoclonales que fueron precipitados con sulfato de amonio y que estuvieron

dirigidos contra *T. cruzi*, suero de ratón crónico (dilución 1:100, control +) y 10 µg del anticuerpo monoclonal no relacionado, 3G10, dirigido contra el hapteno DNP (control -). Se incubó por 2 h a temperatura ambiente. Después, cada tira se lavó tres veces por espacio de 10 min, con Tween 20 al 0.1% en PBS. Posteriormente, se agregó el segundo anticuerpo dirigido contra la IgG (H+L) de ratón, unido a peroxidasa (ZYMED), diluido 1:2000 en 1 ml de Tween 20 al 1 % en PBS y se lavó tres veces. Finalmente, se reveló el reconocimiento del antígeno por el anticuerpo monoclonal, agregando 0.5 mg/ml del sustrato 3,3-Diaminobenzidina (SIGMA), disuelto en PBS y 0.2% de agua oxigenada. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y se paró con varios lavados de agua destilada. El peso molecular del antígeno, se determinó por el lugar que ocupaba la banda del complejo antígeno-anticuerpo con respecto a los marcadores de pesos moleculares (preteñidos, BIORAD) que se utilizaron como referencia.

V.9.2. Identificación de antígenos comunes en los tres estadios de *T. cruzi*. Para determinar si los anticuerpos monoclonales reconocían a los mismos epitopos que en epimastigotes, se utilizaron extractos proteicos de tripomastigotes y amastigotes. Estas proteínas se separaron por una electroforesis y se transfirieron a papel de nitrocelulosa y finalmente se realizó un inmunoblot como en la sección V.9.1.

V.9.3. Identificación de antígenos compartidos con diferentes cepas de *T. cruzi*, otros tripanosomátidos y agentes infecciosos. La identificación de proteínas compartidas con miembros de la misma familia y otros agentes infecciosos por los anticuerpos monoclonales, se realizó por medio de la técnica de inmunoblot, como ya se señaló en la sección V.9.1. En la prueba se utilizaron extractos proteicos totales de las cepas: Z10, JAL, JFA, JBE, QUE, H5 y Ninoa de *T. cruzi*, AM1 de *T. rangeli*; proteínas totales de *Leishmania sp*, *Toxoplasma gondii*; proteínas de fluido de cisticerco de *Taenia crassiceps* y antígenos secretados de *Mycobacterium tuberculosis*. También, a través de un ELISA

(sección V.5.4) se determinó si los mAbs B106E y 1D5 reconocían a los mismos antígenos que en *T. cruzi*, en extractos proteicos de *T. rangeli* y *Leishmania sp.* Para esta prueba se pegaron a la placa de 96 pozos diferentes concentraciones de antígeno: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 11, 22 y 44 µg/pozo y la reacción cruzada con estos antígenos se evaluó con 1.25 µg/pozo del mAb B106E y con 10 µg/pozo del mAb 1D5, concentraciones determinadas previamente por el mayor reconocimiento de los mAbs por el antígeno.

V.9.4. Localización de antígenos de superficie de *T. cruzi* por diferentes anticuerpos monoclonales.

V.9.4.1. La inmunofluorescencia indirecta (IFI), se empleó para determinar si los anticuerpos monoclonales B106E, F14B, C16D y 1D5 reconocían algún epitopo en la superficie de tripomastigotes de *T. cruzi*. Los tripomastigotes (QUE) de cultivo se lavaron una vez con albúmina al 0.5 %-PBS a 1500 g y se ajustaron a 0.2×10^6 parásitos/100 µl de albúmina al 0.5 %-PBS. Cada 100 µl de parásitos se colocaron en portaobjetos y se dejaron secar al aire. Después, se fijaron con metanol. Los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS y una vez con agua desionizada y se colocaron en una cámara húmeda. Se agregaron 20 y 50 µg de anticuerpos monoclonales y 0.1% de inmunoglobulinas de conejo, en un volumen de 100 µl. El control positivo fue suero de ratón (dilución 1:50) infectado con *T. cruzi* en fase crónica y los controles negativos fueron: un anticuerpo monoclonal no relacionado (3G10) y un suero de ratón no infectado (dilución 1:50). Estos se incubaron a 37°C, por 30 min. Luego, se lavó tres veces con PBS y una vez con agua destilada. Enseguida, se agregó el conjugado anti ratón IgG (producido en chivo) biotinilado (AMERSHAM) diluido 1:500 en PBS. Se incubó a 37° C, por 30 min. Se volvió a lavar como ya se señaló. Inmediatamente se agregó estreptavidina fluoresceínada (AMERSHAM) diluida 1:500 en PBS y se incubó a 37° C, durante 30 min. Se lavó y se dejó secar al aire. Finalmente, se revisaron las preparaciones con luz ultravioleta y a través de un objetivo 63 X de un microscopio óptico ZEISS GERMANY (modelo Axioskop).

V.9.4.2. Marcaje de proteínas de superficie de *T. cruzi* por el método de I¹²⁵-lactoperoxidasa. Tratando de confirmar por otra prueba si los anticuerpos monoclonales están dirigidos contra alguna proteína de superficie, se realizó el marcaje radioactivo de 100 X 10⁶ epimastigotes de la cepa QUE de 8 días de cultivo por el método de I¹²⁵-lactoperoxidasa (Marchalonis, 1969). Los parásitos se lavaron tres veces con PBS frío y se centrifugaron a 800 g. Después, se resuspendieron en 1 ml de PBS frío y se marcó con 1 mCi (10 µl) de I¹²⁵. Inmediatamente se agregaron 45 µl de una solución de lactoperoxidasa (0.5 mg/ml. SIGMA) y 10 µl de peróxido de hidrógeno al 0.03% a diferentes tiempos: 0, 4, 8, 12 y 16 min. Se dejó reposar por 4 min y los parásitos se lavaron cuatro veces con 10 ml de PBS a 800 g, durante 10 min. El botón de parásitos se solubilizó con 1 ml de amortiguador Nonidet P40 al 0.5% e inhibidores de proteasas (los mismos que se utilizaron al preparar los extractos proteicos), incubándose a 4° C por 30 min. Enseguida, se agregaron cuatro volúmenes de amortiguador sin detergente y con inhibidores de proteasas. El material no solubilizado fue removido por centrifugación a 10 000 g, por 30 min a 4° C y las proteínas en solución marcadas se pre-incubaron con 100 µl de sefarosa/ml, a 4° C por 4 h en agitación lenta. La sefarosa previamente fue lavada una vez con PBS y dos veces con el amortiguador NP 40 al 0.5%, el último de estos lavados se realizó agregando inhibidores de proteasas. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró la sefarosa centrifugando a 13 000 g por 1 min y las proteínas solubles se almacenaron a 4° C, hasta su uso.

V.9.4.3. Inmunoprecipitación de proteínas de superficie reconocidas por los diferentes anticuerpos monoclonales. Para realizar la inmunoprecipitación de las proteínas de superficie reconocidas por los diferentes anticuerpos monoclonales, se usaron los siguientes inmunoabsorbentes: proteína A-sefarosa, proteína Gr-agarosa y anti IgM de ratón-agarosa, de acuerdo con el isotipo de cada anticuepo monoclonal. Cada inmunoabsorbente se lavó una vez con PBS y dos veces con amortiguador NP40 0.5% por centrifugación. Después, se tomaron 20 µl de cada inmunoabsorbente y se incubó con los

anticuerpos monoclonales. La proteína A, se incubó con 10 µg de B106E, 20 µl de suero de ratón anti QUE y anti NINOA en fase crónica de la enfermedad (controles +) y con 10 µg de IgGs de ratón no infectado (control -); el anticuerpo anti IgM de ratón-agarosa se incubó con 10 µg del mAb C16D y 30 µg del mAb F14B; la proteína Gr-agarosa se incubó con 10 µg del mAb 1D5. Cada incubación fue a temperatura ambiente por 1 h y en agitación lenta. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron tres veces con PBS, dos veces con NP40 al 0.5%, el último de estos lavados se realizó con NP40 al 0.5% e inhibidores de proteasas. La velocidad de lavado fue a 13 000 g por 1 min. Enseguida, el sobrenadante se desechó y cada botón (con los mAbs y anticuerpos controles) se incubó con 25 µl de proteínas de superficie marcadas con el I^{125} (46,222 cpm). El mAb F14B, el suero de ratón anti NINOA y las IgGs de ratón no infectado (controles + y -, respectivamente), se incubaron con 54 µl de proteínas de superficie marcadas (100 000 cpm). Cada incubación fue a 4°C, por 2h o por toda la noche en agitación lenta. Después, las muestras se lavaron dos veces con amortiguador NP40 0.5%-inhibidores de proteasas, dos veces con NP40 al 0.5%-NaCl-inhibidores de proteasas, dos veces con NP40 0.5%-inhibidores de proteasas. Luego, se retiró el sobrenadante y a cada botón se le agregó amortiguador de muestra (50 µl, volumen final) y se hirvió por 5 min. Las muestras y los marcadores preteñidos (GIBCO) se separaron por electroforesis en un gel al 10% de poliacrilamida de 10 X 16 cm a 200 volts (Apéndice V). El gel con los anticuerpos y las proteínas precipitadas se fijaron por 30 min y se tiñeron con azul de Coomasie por 30 min. Después, se agregó la solución desteñidora (Apéndice V) hasta observar la banda pesada y ligera de los anticuerpos. Enseguida, el gel se secó en un secador para geles (HSI) y se expuso en un film para rayos X (KODAK) por 4 y 16 días a -72°C.

V.9.5. Identificación de proteínas secretadas/excretadas por los anticuerpos monoclonales. Para determinar si las proteínas secretadas al medio de cultivo por los tripomastigotes y epimastigotes eran reconocidas por los diferentes anticuerpos monoclonales, se realizó un inmunoblot, como ya se señaló en la sección V.9.1. Cada tira de

papel de nitrocelulosa con 1.2 µg de proteína de secreción de epimastigotes y tripomastigotes se enfrentó con los mAbs B106E, F14B, C16D y 1D5. El control positivo fue suero de ratón anti cruzipaina, una proteína secretada por *T. cruzi*.

V.9.6. Reconocimiento de carbohidratos por diferentes anticuerpos monoclonales.

Para evaluar si los anticuerpos monoclonales estaban dirigidos contra carbohidratos, se realizó el método de oxidación por peryodato de Woodward, Young y Bloodgood (1985), con ligeras modificaciones. Para ello, placas para ELISA de 96 pozos, se cubrieron con 1 µg de extracto proteico total de epimastigotes de la cepa QUE en 100 µl de amortiguador de carbonatos pH 9.6. Se incubó a 4°C por 18 h. Después, se lavó tres veces con 200 µl de PBS-Tween 0.05%/pozo (cada lavado en 5 min). Luego, se bloqueó con BSA al 1%-PBS a 37°C por 1 h. Se lavó tres veces más. Enseguida, se lavó rápidamente con amortiguador de acetatos de sodio 50 mM, pH 4.5 y se agregaron diferentes concentraciones de ácido peryódico: 0, 10, 20, 40 y 60 mM en 50 µl de amortiguador de acetatos de sodio/pozo. Se incubó a temperatura ambiente por 1 h en oscuridad. La reacción se paró lavando con 200 µl de amortiguador de acetatos de sodio. Inmediatamente, se agregaron 100 µl de glicina al 1%-PBS y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Después, se lavó tres veces con 200 µl de PBS-Tween 20 0.05%. Una vez que se lavó, se agregaron 10 µg de los anticuerpos monoclonales puros: B106E, F14B, C16D y 1D5 en cada pozo tratado con el ácido peryódico. Como control positivo se utilizó suero de ratón infectado con *T. cruzi* en fase crónica. Se dejaron incubando toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se volvió a lavar como ya se mencionó. Enseguida, se agregó el anticuerpo contra IgG de ratón acoplado a peroxidasa, utilizando la misma dilución y siguiendo la misma metodología que en la sección V.5.4.

V.9.7. Reconocimiento de proteínas por diferentes anticuerpos monoclonales. Para determinar si los anticuerpos monoclonales estaban dirigidos contra proteínas, se trató extracto proteico de epimastigotes (QUE) con proteinasa K (proteinasa *Tritirachium* alcalina; EC 3.4.21.14. SIGMA). La evaluación del efecto de esta proteasa fue mediante un ELISA. Una placa de 96 pozos, se cubrió con 1 µg de extracto proteico/pozo en 100 µl de amortiguador de carbonatos pH 9.6. Se incubó a 4°C por 18 h. Después, se lavó tres veces con 200 µl de tween 20 al 0.5%-PBS. Se bloqueó con albúmina al 1%-PBS a 37 °C, por 1h. Se lavó, como ya se señaló. Enseguida, cada pozo se trató con 50 µl de proteinasa K (10 µg), volumen tomado a partir de una solución madre preparada con 200 µg de proteinasa k/ml de una solución de Trizma-HCl, pH 7.7; NaCl, 50 mM; MgCl₂, 10 mM, SDS al 0.2% y EDTA, 10 mM. Se incubó a 37°C, por una hora treinta minutos. Después, se lavó tres veces con 200 µl de Tween 20 al 0.05%-PBS. Inmediatamente se agregaron 10 µg/pozo de cada anticuerpo monoclonal. El control positivo fue el mismo que se utilizó en la sección V.9.6. Se volvió a lavar y enseguida, se agregó el anticuerpo contra IgG de ratón acoplado a peroxidasa y se siguió la misma metodología que en la sección V.5.4.

V.9.8. Actividad lítica de los anticuerpos monoclonales sobre *T. cruzi*. Para determinar la actividad lítica de los anticuerpos monoclonales B106E, F14B, C16D y 1D5 contra tripomastigotes, se empleó el ensayo de lisis mediada por complemento. La obtención de fuente de complemento fue a partir de cobayos Hartley de 120 días de edad y con un peso de 450 g. Estos animales fueron sangrados en condiciones estériles por punción cardíaca, y la sangre obtenida se centrifugó dos veces a 800 g, durante 30 min para eliminar los constituyentes celulares y dejar solamente al suero, que se utilizó en el momento o se guardó en alícuotas a -70°C. Así, para evaluar el efecto lítico de los cuatro mAbs sobre los tripomastigotes de cultivo, primero se incubaron 1×10^6 tripomastigotes con dos concentraciones de anticuerpos: 50 y 100 µg a temperatura ambiente por 30 min. Después, se agregó el suero activo de cobayo (dilución 1:2) y se contó el número de parásitos viables al tiempo 0 (T0) y enseguida se incubó a 37° C, durante 18 h (T18). Transcurrido este

periodo, se volvió a contar la viabilidad. El porcentaje de lisis de los parásitos, se determinó por la siguiente fórmula: $T0-T18/T0 \times 100$ (Kipnis, Krettli y Da Silva, 1985). El control positivo fue suero de ratón infectado con *T. cruzi* en fase crónica y los controles negativos fueron suero de ratón sin infectar y el anticuerpo monoclonal no relacionado, 3G10.

V.9.9. Efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la infección *in vitro* de células Vero. El ensayo de inhibición de la infección de células Vero por tripomastigotes de la cepa Querétaro, se realizó pre-incubando los parásitos con 100 μ g de los anticuerpos monoclonales B106E, F14B, C16D, 1D5 y 3G10 (anticuerpo no relacionado) a 4° C, durante 2 h. Después, los parásitos se agregaron a un cultivo de 3×10^3 células Vero (10 parásitos por cada célula) cultivadas en portaobjetos cubiertos de teflón (CELL-LINE, Newfield, New Jersey, Apéndice VI) y con 18 pozos de 3 mm de diámetro (Wirth y Kierszenbaum, 1987), en 30 μ l de medio D-MEM suplementado con 5 % de SFB. Los parásitos y las células Vero, se co-cultivaron durante 18 h a 37° C, con una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de humedad (Souto-Padron y col., 1994). La infección celular, se evaluó a las 0, 24 y 48 h post-infección, mediante el conteo al microscopio óptico (objetivo 100 X) de células infectadas y amastigotes intracelulares, de un total de 100 células teñidas con May Grunwald-Giemsa (Apéndice VI).

V.9.10. Efecto de los anticuerpos monoclonales en la infección de parásitos *in vivo*.

V.9.10.1 Efecto de anticuerpos monoclonales en la cinética de parasitemia de ratones infectados. Para evaluar el papel que juegan los anticuerpos monoclonales: B106E, F14B, C16D, 1D5 y 3G10 (anticuerpo monoclonal no relacionado) sobre la infección de ratones BALB/c, se emplearon grupos de seis ratones hembras de 8 a 9 semanas de edad por cada anticuerpo a probar. Los ratones fueron infectados vía intraperitoneal con 10^5 tripomastigotes de cultivo pre-incubados con 0.5 mg de anticuerpos monoclonales

(concentración no aglutinante) precipitado con sulfato de amonio (primer experimento) y anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad en PBS con 1% de BSA (segundo experimento) a 4° C, por 2 h y 1 h, respectivamente. El grupo control de ratones se inoculó con parásitos sin anticuerpos. La evolución de la parasitemia de los ratones se cuantificó cada tercer día, durante 41 días post-infección, a partir de sangre periférica (dilución 1:500), obtenida de la región distal de la cola de cada ratón.

V.9.10.2. Efecto de anticuerpos monoclonales en la sobrevivencia de ratones infectados. Con la finalidad de evaluar el efecto protector de los anticuerpos monoclonales B106E, F14B, C16D, 1D5 y 3G10 en ratones infectados, se contó el número de ratones que sobrevivieron a la infección de tripomastigotes pre-incubados con los diferentes anticuerpos monoclonales por 41 días y el resultado se representó como % de sobrevivencia.

V.10. Análisis Estadístico.

Para el análisis estadístico de los resultados, se empleó la prueba de T-Student (Ostle, 1988).

VI. RESULTADOS.

VI.1. Producción y Caracterización de los Anticuerpos Monoclonales.

VI.1.1. Producción de anticuerpos monoclonales. Tratando de encontrar anticuerpos específicos contra antígenos de *T. cruzi*, se realizó la producción de anticuerpos monoclonales a partir de la fusión de células de mieloma, SP2/0 y de linfocitos B de bazo de ratón que fue infectado con tripomastigotes de cultivo de la cepa Querétaro. La producción de anticuerpos por los hibridomas fue medida en los sobrenadantes a través de diferentes ELISAS. En el primer ELISA resultaron positivos cuatro hibridomas con valores de D.O de entre 0.27 y 2.1; en el segundo ELISA fueron positivos los mismos hibridomas y cuatro más, con valores de D.O de entre 0.31 y 1.55; en el tercer ELISA continuaron positivos seis hibridomas y dos más iniciaron la producción de anticuerpos, presentando valores de D.O de 0.3 a 1.48 (Tabla II). Los hibridomas 17B, 42F y 15C, se seleccionaron por ser buenos productores de anticuerpos y se clonaron dos veces usando la técnica de dilución limitante. Las clonas denominadas: B106E, F14B y C16D que crecieron en la menor dilución y que produjeron los niveles más altos de anticuerpos, presentando valores de D.O de entre 0.7 y 1.5, fueron seleccionadas como fuente generadora de anticuerpos. En total tres líneas celulares se establecieron, además de la que previamente estableció Martínez (1995). A través de un inmunoblot se observó que los anticuerpos monoclonales de las tres clonas reaccionaron con diferentes antígenos de epimastigotes (Fig. 6A), mostrando la producciones de cuatro diferentes anticuerpos monoclonales, denominados B106E, F14B, C16D y 1D5.

TABLA II. HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS.

ELISA 1 DIA 17		ELISA 2 DIA 20		ELISA 3 DIA 27	
HIBRIDOMA	D.O	HIBRIDOMA	D.O	HIBRIDOMA	D.O
15C	0.32 *	15C	0.73	15C	0.69
17B	2.11 *	17B	1.55	17B	1.48
25E	0.27	25E	0.64	25E	0.12
33C	1.00	33C	0.74	33C	0.62
		24E	0.38	24E	0.93
		32D	0.31	32D	0.43
		38B	0.20	38B	0.16
		42F	1.07 *	42F	1.05
				211B	0.44
				35G	0.30
Control +	2.01	Control +	1.98	Control +	1.87
Control -	0.07	Control -	0.12	Control -	0.18

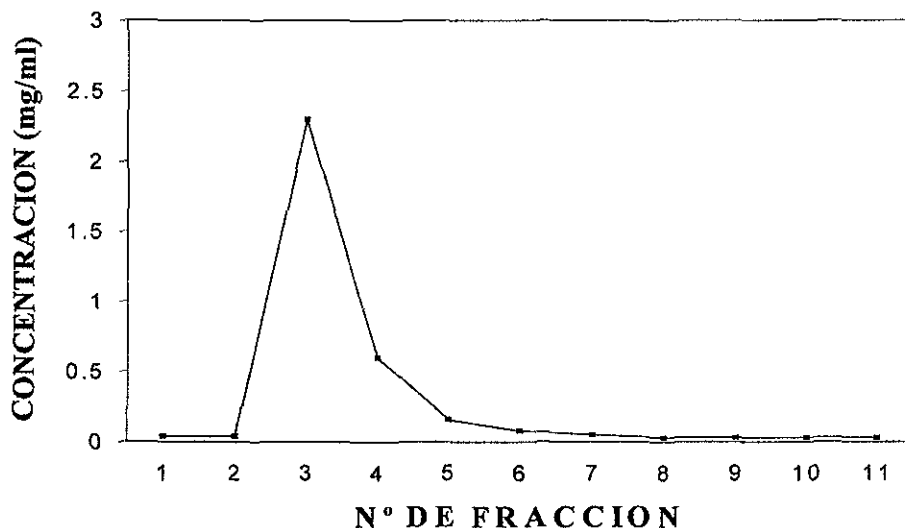
La tabla muestra los valores de D.O (405 nm) obtenidos a partir de la evaluación de la presencia de anticuerpos en los sobrenadantes de los diferentes hibridomas, a través de distintos ELISAS.

* Líneas celulares seleccionadas para realizar la clonación.

VI.1.2. Determinación del isotipo de cada anticuerpo monoclonal. Una vez obtenidos los diferentes anticuerpos monoclonales del sobrenadante de las clonas, se determinó el isotipo de cada anticuerpo mediante un ELISA de captura. El anticuerpo monoclonal B106E fue isotipo IgG2a; los mAbs F14B y C16D fueron isotipo IgM y el mAb 1D5 fue isotipo IgG1. El saber a que isotipo pertenecían los diferentes anticuerpos ayudó a su purificación, pues mediante esta característica se determinó el tipo de inmuoabsorbente que se usaría en cada caso.

VI.1.3. Purificación de los anticuerpos monoclonales. La purificación de los anticuerpos monoclonales se realizó por cromatografía de afinidad, utilizando diferentes inmuoabsorbentes. La proteína A-sefarosa purificó al mAb B106E y a las inmunoglobulinas de ratón no infectado; con la proteína Gr-agarosa se purificaron los mAbs 1D5 y 32.2 (no relacionado), y con el anticuerpo anti IgM de ratón-agarosa se purificó el mAb F14B. La mayor concentración de anticuerpos se obtuvo en la tercera o cuarta fracción, esto varió con respecto al origen e isotipo del anticuerpo. A partir de 280 ml de sobrenadante de cultivo celular con el mAb B106E, se purificaron aproximadamente 1.3 miligramos (mg) de anticuerpos; en tanto que con el mAb F14B obtenido de 350 ml de sobrenadante de cultivo o de 6 ml de ascitis, se purificaron 0.3 mg de anticuerpos. De 52 mg del mismo anticuerpo obtenido de ascitis y que se precipitó con sulfato de amonio, se purificaron 0.8 mg de anticuerpos puros. A partir de 60 mg del mAb 1D5, que se obtuvo de sobrenadante de cultivo celular y de la precipitación con sulfato de amonio, se purificaron 2.7 mg de anticuerpos. Con el mAb 32.2 obtenido de 6 ml de ascitis, se recuperaron 3.2 mg de anticuerpos puros. Finalmente, a partir de 3.5 ml de suero de ratón con las IgGs, se obtuvieron 2 mg de anticuerpos.

Para observar la pureza de los anticuerpos, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida. En cada gel se observó la cadena pesada de 50 kDa y la cadena ligera de 25 kDa de las inmunoglobulinas con isotipo IgG, y la cadena pesada de 80 kDa y la cadena ligera de 25 kDa de las inmunoglobulinas con isotipo IgM. También en el gel se observó el patrón característico de una curva de purificación, es decir se presentaron dos bandas intensas que representaban el pico de anticuerpos monoclonales en la tercera o tercera y cuarta fracción, hasta que el anticuerpo ya no fuera evidente. En la gráfica 1 y la figura 5, se muestran resultados representativos de la purificación y pureza del mAb B106E.



GRÁFICA 1. CURVA DE PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL B106E. El mAb B106E obtenido a partir de sobrenadante de hibridomas se purificó por cromatografía de afinidad, usando una columna con proteína A-sefarosa. En total 350 ml de sobrenadante se pasó a través de la columna y el anticuerpo no retenido fue lavado con amortiguador de fosfatos 0.14 M, pH 8. El anticuerpo retenido se eluyó con glicina 0.2 M, pH 2.8 y se colectaron fracciones de 1 ml. El pH de la solución con el mAb puro se neutralizó con tris 1M, pH 8.2. La mayor concentración de mAb se obtuvo en la fracción tres. Cada fracción se leyó a 280 nm y la concentración de proteínas se determinó bajo la relación de que una D.O equivale a 0.8 mg.

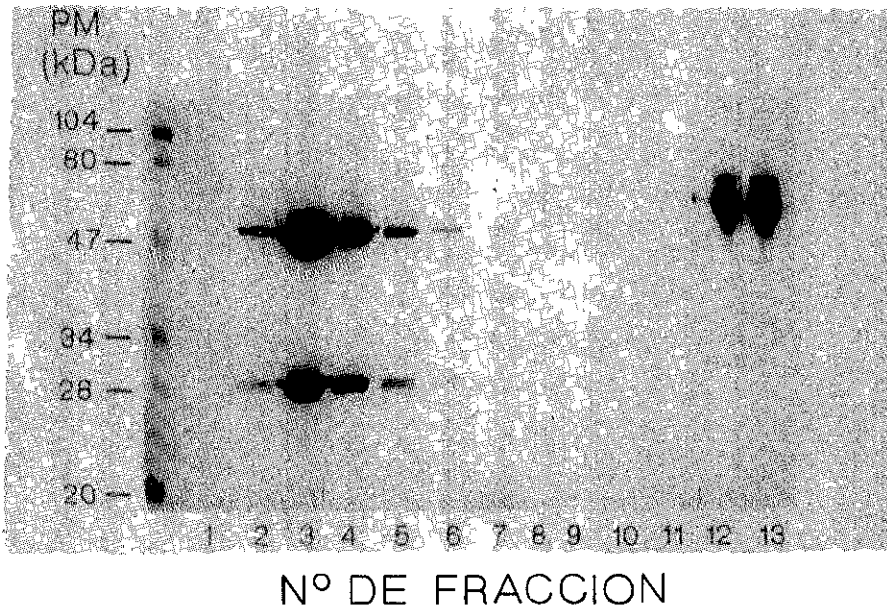


FIG. 5. DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DEL ANTICUERPO MONOCLONAL B106E. Para visualizar la pureza del mAb B106E se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con SDS y mercaptoetanol. Las proteínas se tificaron con azul de Coomassie. En cada carril se agregaron 10 μ l de cada fracción, de un total de 11. En el carril 12 y 13, se observan proteínas de sobrenadante antes y después de pasar a través de la columna. Del lado izquierdo se muestran los pesos moleculares.

VI.2. Caracterización de Epitopos de *T. cruzi* Mediante el Uso de Anticuerpos Monoclonales.

VI.2.1. Peso molecular de epitopos de *T. cruzi*. Para determinar el peso molecular de los epitopos de epimastigotes de *T. cruzi* que fueron reconocidos por los anticuerpos monoclonales, primero se separó el extracto proteico por electroforesis en un gel de poliacrilamida con y sin mercaptoetanol. Enseguida, las proteínas se transfirieron a un papel de nitrocelulosa y se realizó el inmunoblot. Los cuatro anticuerpos monoclonales identificaron cuatro diferentes proteínas en estado reductor. El anticuerpo monoclonal B106E reconoció un doblete proteico de 180 kDa (Fig. 6A), peso determinado por el uso de marcadores de alto peso molecular (foto no mostrada); el mAb F14B identificó una proteína de 35 kDa y dos más en el área de 40 kDa; el mAb C16D reconoció ligeramente dos antígenos, uno de 42 kDa y otro de 71 kDa. Finalmente, el mAb 1D5 identificó una proteína de 45 kDa (Fig. 6A). Las mismas proteínas fueron reconocidas en condiciones no reductoras por los diferentes mAbs (foto no mostrada).

VI.2.2. Reactividad de los anticuerpos monoclonales contra antígenos de tres estadios de *T. cruzi*. Con el fin de evaluar si los mismos epitopos de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes eran reconocidos por los mAbs B106E, F14B, C16D y 1D5, se efectuó un inmunoblot. Los resultados de esta prueba mostraron que el mAb B106E identificó un doblete de aproximadamente 180 kDa en epimastigotes (Fig. 6A), tripomastigotes y amastigotes; pero en estos dos últimos, las proteínas se observaron difusas (Fig. 6B y C); el mAb F14B reconoció una proteína de 35 kDa, dos más de 40 kDa y otro antígeno de 60 kDa en epimastigotes (Fig. 6A). Este mismo anticuerpo reaccionó ligeramente con dos proteínas de 35 y 40 kDa, un antígeno 60 kDa y uno más de 70 kDa en tripomastigotes (Fig. 6B); mientras que en los amastigotes identificó proteínas de 35 y 40 kDa (Fig. 6C). El mAb C16D identificó dos proteínas de 42 y 71 kDa en epimastigotes y no hubo reacción con proteínas de tripomastigotes y amastigotes (Fig. 6A, B y C). El mAb 1D5, reaccionó con un epitopo de 45 kDa en epimastigotes y no hubo reacción con

tripomastigotes y amastigotes (Fig. 6A, B y C). Tales resultados sugieren que los mAbs C16D y 1D5 son específicos de estadio; mientras que los anticuerpos monoclonales B10E⁶ y F14B reconocieron a antígenos de los tres estadios.

VI.2.3. Presencia de las proteínas B106E, F14B, C16D y 1D5 en diferentes cepas de *T. cruzi*. La presencia de las proteínas B106E, F14B, C16D y 1D5 (nombre asignado con base en el anticuerpo que las identificó) en extractos proteicos de epimastigotes de las cepas Z10, JAL, JFA, JBE, QUE, Ninoa (Mexicanas) y las clonas Silvio y Esmeraldo (Sudamericanas) de *T. cruzi*, se evaluó mediante un inmunoblot. Los resultados de esta prueba mostraron que los cuatro anticuerpos monoclonales identificaron aparentemente a las mismas proteínas que se detectaron con anterioridad en la cepa QUE, sin embargo, hubo ligeras variaciones en el peso, intensidad y número de bandas en algunas cepas. El mAb B106E mostró un patrón proteico difuso en la cepa QUE, observándose principalmente las proteínas de 180 kDa; en H5, Ninoa, JAL, Esmeraldo y Silvio, el reconocimiento fue similar; sin embargo, éstas dos últimas mostraron antígenos bien delimitados, con Esmeraldo se observó claramente el doblete proteico de 180 kDa y en Silvio un antígeno del mismo peso. El mAb F14B identificó principalmente un antígeno de 35 kDa y dos de 40 kDa en QUE; mientras que con Ninoa y H5 reaccionó con una proteína de 32 kDa y con dos más de 35 kDa; en JAL identificó un antígeno de 32 kDa y uno de 40 kDa, a diferencia de Esmeraldo, que sólo reconoció una proteína de 40 kDa y con Silvio se observaron dos antígenos, uno de 35 kDa y otro de 40 kDa. El mAb 1D5 identificó en todas las cepas a la proteína de 45 kDa. Finalmente, el mAb C16D reaccionó principalmente con los antígenos de 42 y 71 kDa en las diferentes cepas (Fig. 7).

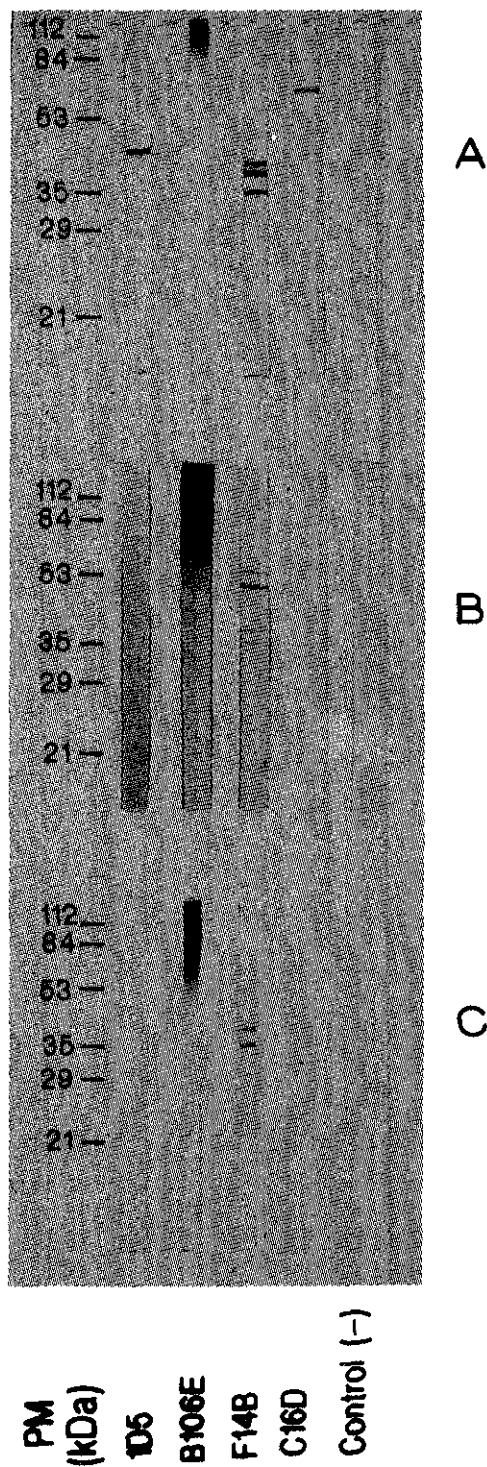


FIG. 6. REACTIVIDAD DE DIFERENTES ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA TRES ESTADIOS DE *T. cruzi*. Las proteínas de epimastigotes (A), tripomastigotes (B) y amastigotes (C) de la cepa Querétaro, se separaron en geles de poliacrilamida al 12% con SDS en condiciones reductoras (con mercaptoetanol). Las proteínas de los diferentes estadios se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Después, se evaluó la reactividad de cada mAb para los tres estadios de *T. cruzi* mediante un inmunoblot. Cada tira con proteínas de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes se incubó con los mAbs, B106E, F14B, C16D, 1D5 y con el 3G10 (control -). A la izquierda, se muestran los marcadores de peso molecular.

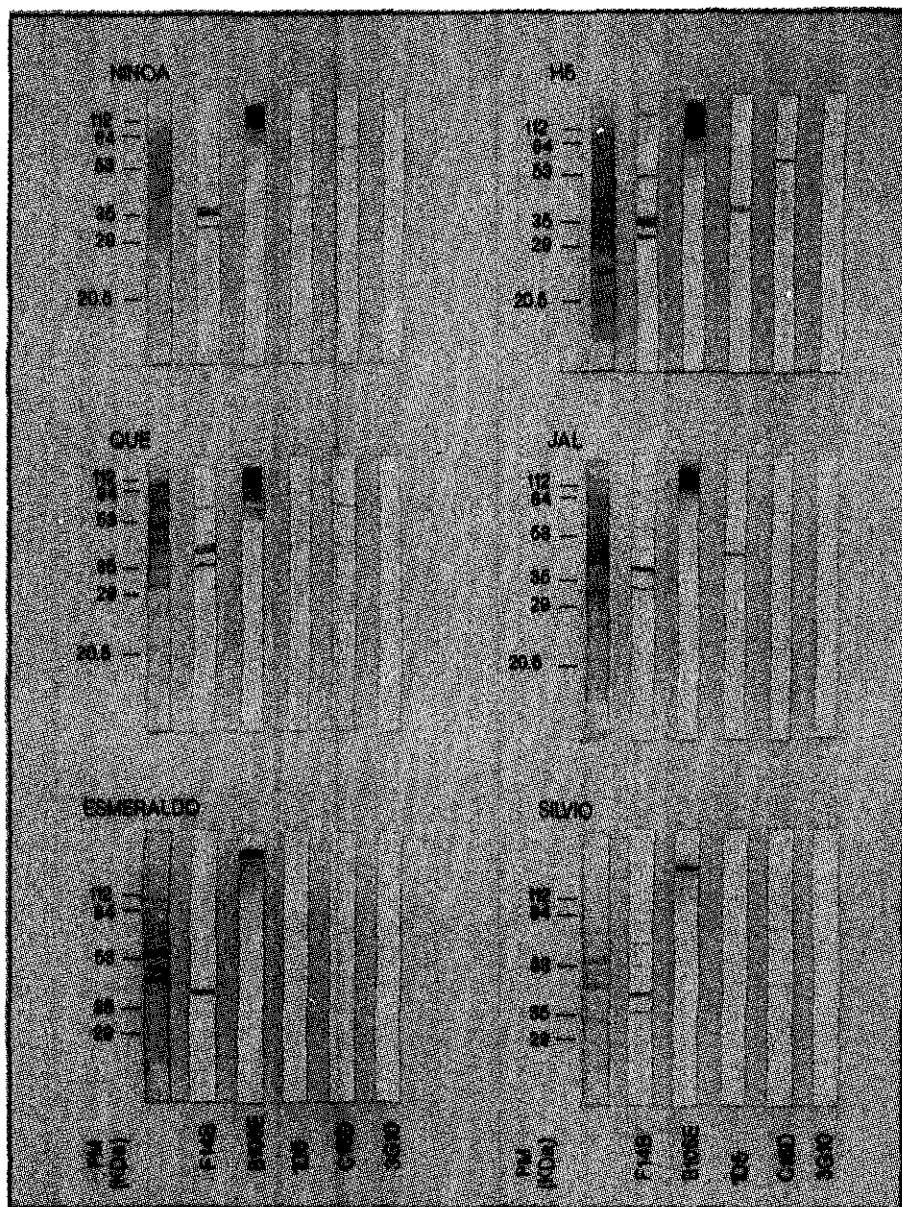


FIG. 7. REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA DIFERENTES CEPAS DE *T. cruzi*. En esta figura se observan las proteínas de epimastigotes de las cepas QUE, JAL, H5, Ninoa (mexicanas) y de las clonas Esmeraldo y Silvio (sudamericanas) que reaccionaron con los mAbs B106E, F14B, C16D, 1D5 y el 3G10 (control-) a través de un inmunoblot. En las primeras tiras, se muestran las proteínas totales de cada cepa teñidas con negro andino. Los marcadores de peso molecular se sitúan a la izquierda.

V1.2.4. Presencia de las proteínas B106E, F14B, C16D y 1D5 en diferentes agentes infecciosos. Para evaluar si las proteínas B106E, F14B, C16D y 1D5 estaban presentes en miembros de la familia Trypanosomatidae a la que también pertenece *T. cruzi*, se probó la cepa AM1 de *T. rangeli* y extracto de *Leishmania sp.*, y otros agentes infecciosos, *Toxoplasma gondii*, *Taenia crassiceps* y *Mycobacterium tuberculosis*. Para tal evaluación se emplearon los cuatro diferentes anticuerpos monoclonales y a través de un inmunoblot, se observó que en *T. rangeli* el mAb F14B reconoció un antígeno de 44 kDa y dos más de 68 kDa, el mAb C16D identificó ligeramente una proteína de 76 kDa, en tanto que los mAbs B106E y 1D5 no reaccionaron con proteínas del extracto (Fig. 8). Con *Leishmania sp.* el mAb F14B identificó principalmente dos antígenos de 50 y 75 kDa, y el mAb C16D reconoció una proteína de 53 kDa; mientras que B106E y 1D5 no cruzaron con ninguna proteína (Fig. 8). Al analizar los antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii* y *Taenia crassiceps*, únicamente el mAb F14B cruzó con todos los agentes patógenos y el mAb C16D sólo reaccionó ligeramente con *M. tuberculosis* (Fig. 9).

Por otro lado, se observó a través de un ELISA que los anticuerpos monoclonales B106E y 1D5 reconocieron únicamente a proteínas en estado nativo de epimastigotes de *T. cruzi*, alcanzando valores de D.O de 0.6 y 0.4, respectivamente y no cruzaron con proteínas de *T. rangeli* y *Leishmania sp.*, pues los valores de D.O fueron menores a 0.1, aun con mayores concentraciones de proteína (Gráfica 4).

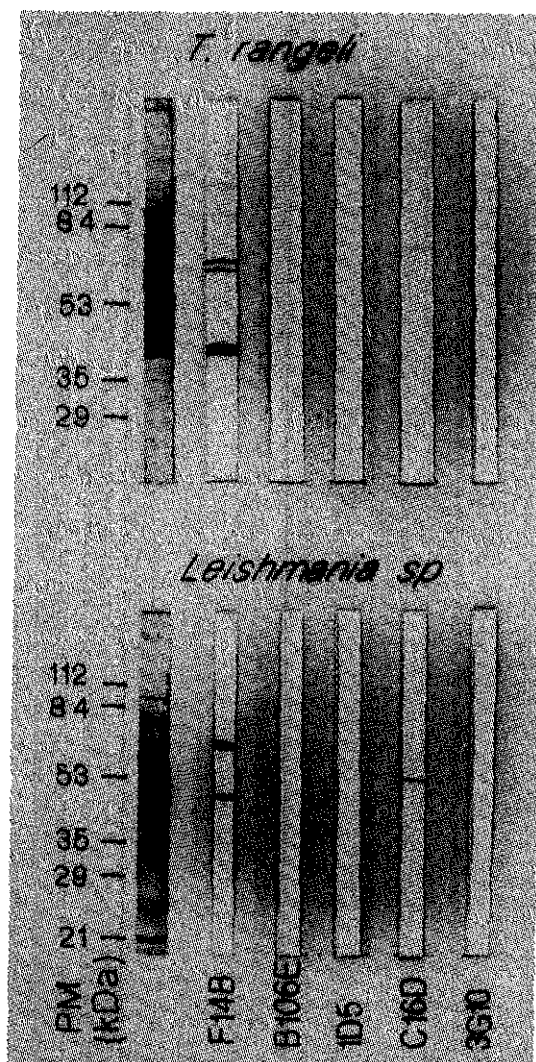
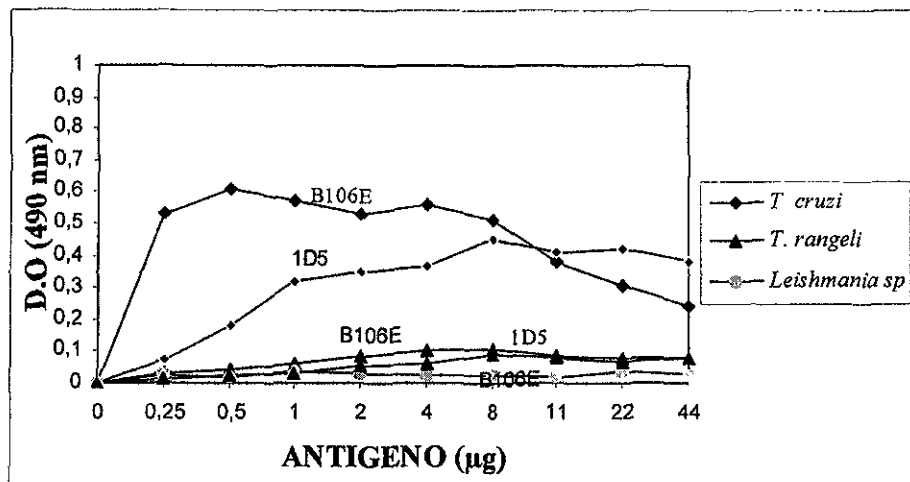


FIG. 8. REACCIÓN CRUZADA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CON *T. rangeli* y *Leishmania sp.* En esta figura, se muestran las proteínas de *T. rangeli* y *Leishmania sp.* identificadas por los mAbs B106E, F14B, C16D, 1D5 y 3G10 (control -), a través de un inmunoblot. Las primeras tiras muestran las proteínas totales de los parásitos teñidas con negro amido. Los marcadores de peso molecular se localizan a la izquierda.



GRÁFICA 2. CURVA DE ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES POR PROTEÍNAS DE *T. cruzi*. En la gráfica se observa una cinética de reacción de los mAbs B106E y 1D5 con diferentes concentraciones de proteínas en estado nativo de epimastigotes de *T. cruzi* y *T. rangeli*, y promastigotes de *Leishmania sp.* La reacción fue evaluada a través de un ELISA. Los valores de reacción dados en D.O son promedios de duplicados de un experimento.

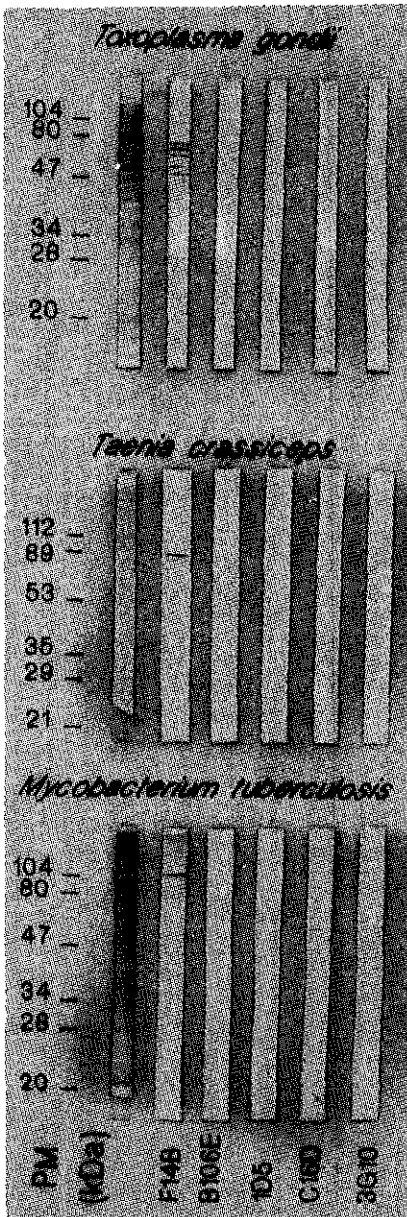


FIG. 9. REACCIÓN CRUZADA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA PROTEÍNAS DE DIFERENTES AGENTES INFECCIOSOS. En esta figura, se muestran las proteínas de *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis* y líquido de cisticerco de *Taenia crassiceps* que fueron identificadas por los mAbs B106E, F14B, C16D, 1D5 y 3G10 (control -), mediante un inmunoblot. Las primeras tiras muestran las proteínas totales de los diferentes parásitos teñidas con negro amido. Los marcadores de peso molecular se observan a la izquierda.

VI.2.5. Presencia de las proteínas B106E, F14B, C16D y 1D5 en sobrenadantes de epimastigotes y tripomastigotes de cultivo. Para evaluar si las proteínas identificadas por los anticuerpos monoclonales B106E, F14B, C16D y 1D5 eran secretadas por el parásito en cultivo, se realizó un inmunoblot. El mAb F14B reaccionó ligeramente con una proteína de 38 kDa que fue secretada por los tripomastigotes; mientras que los mAbs B106E, C16D y 1D5, no reconocieron ninguna de las proteínas de secreción (Fig. 10A). Por otro lado, al enfrentar los mismos anticuerpos con proteínas de secreción de epimastigotes, no hubo reacción (Fig. 10B). El control positivo, suero de ratón dirigido contra la proteína de secreción de *T. cruzi*, la cruzipaina, sí reaccionó con ambos estadios.

VI.2.6. Localización de antígenos de superficie de *T. cruzi* por los anticuerpos monoclonales.

Para determinar si los antígenos de *T. cruzi* se localizaban en la superficie celular, se utilizaron dos métodos diferentes: la inmunofluorescencia indirecta y la inmunoprecipitación de proteínas de superficie marcadas con I^{125} .

VI.2.6.1. Inmunofluorescencia indirecta de epitopos de superficie. Los resultados por inmunofluorescencia indirecta mostraron que únicamente el mAb B106E reconoció al antígeno que lleva su nombre en la superficie celular de los tripomastigotes (Fig. 11B). Los mAbs F14B, (Fig. 11C) C16D y 1D5 aparentemente no reaccionaron con antígenos de superficie de tripomastigotes (Fig. 11D y F). El control positivo de la prueba fue suero de ratón contra la cepa QUE en estado crónico de la enfermedad (Fig. 11H) y los controles negativos fueron suero de ratón no infectado y el mAb 32.2 (Fig. 11F y G).

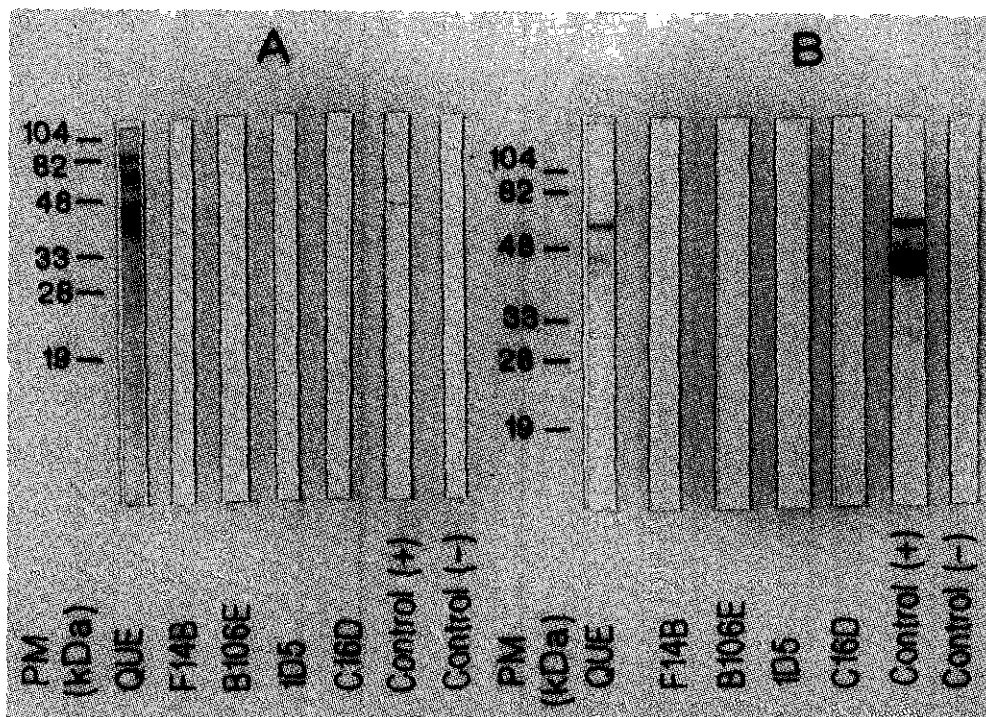


FIG 10. RECONOCIMIENTO DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR LOS DIFERENTES ANTICUERPOS MONOCLONALES. Las proteínas de secreción se obtuvieron a partir de sobrenadante de epimastigotes y tripomastigotes de cultivo. Estas proteínas de secreción, se separaron por electroforesis en geles de acrilamida al 12% con SDS y mercaptoetanol. Después, las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se realizó un inmunoblot. Las primeras tiras muestran las proteínas secretadas por el parásito teñidas con negro amido. Cada tira de proteínas secretadas por tripomastigotes (A) y epimastigotes (B), se incubaron con los mAbs B106E, F14B, C16D, ID5, 32.2 (control-) y suero de conejo anti-cruzipaina (dilución 1: 500. Control +). Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

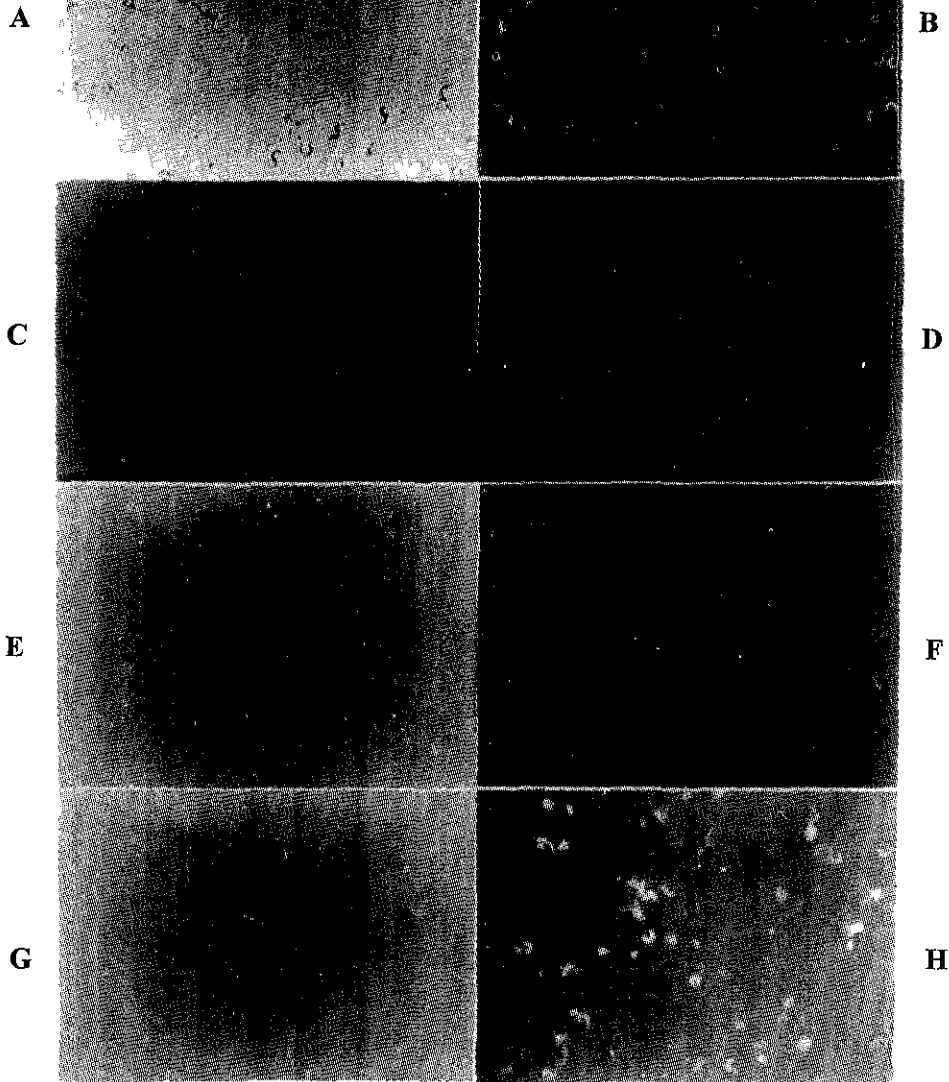


FIG. 11. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE EPITOPOS PROTEICOS DE SUPERFICIE. La localización de los antígenos de tripomastigotes de cultivo identificados por los mAbs B106E, F14B, C16D y 1D5, se evaluó por inmunofluorescencia indirecta. Para ello, se fijaron 2×10^5 tripomastigotes en portaobjetos y se pre-incubaron con los diferentes mAbs. Los controles fueron: suero de ratón no infectado (dilución 1:50), el mAb 32.2 (controles -) y suero de ratón crónico anti-QUE (dilución 1:50. Control +). Después, se incubaron con el conjugado anti ratón IgG biotinilado, dilución 1:500 y finalmente se incubó con estreptavidina fluoresceínada, dilución 1:500. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda a 37°C , por 30 min. Las muestras se revisaron con luz ultravioleta a través de un objetivo 63 X. **A)** tripomastigotes en campo claro, **B)** tripomastigotes + B106E en campo fluorescente, **C)** tripomastigotes + F14B en campo fluorescente, **D)** tripomastigotes + C16D en campo fluorescente, **E)** tripomastigotes + 1D5 en campo fluorescente, **F)** tripomastigotes + 32.2 en campo fluorescente, **G)** tripomastigotes + suero de ratón no infectado en campo fluorescente y **H)** tripomastigotes + suero de ratón crónico en campo fluorescente.

VI.2.6.2. Inmunoprecipitación de proteínas de superficie. Al inmunoprecipitar las proteínas de superficie de los epimastigotes con los diferentes anticuerpos monoclonales, se observó que el mAb B106E pre-incubado con 46, 222 cuentas por minuto (cpm) de extracto proteico, precipitó una proteína de 59 kDa (Fig. 12A, carril 4); mientras que los mAbs F14B, C16D y 1D5 pre-incubados con la misma cantidad de proteínas marcadas, no precipitaron ninguna proteína. Al pre-incubar con mayor cantidad de extracto proteico marcado, 100, 000 cpm, con los mAbs F14B, C16D y 1D5, únicamente el mAb F14B precipitó a diferentes proteínas de 177, 155, 129, 84, 76 y 54 kDa (Fig. 12B, carril 4); en tanto que los restantes anticuerpos siguieron sin precipitar proteínas.

VI.2.7. Identificación de la reactividad de los anticuerpos monoclonales por carbohidratos. Para determinar si los diferentes mAbs estaban dirigidos contra carbohidratos, el extracto proteico de epimastigotes se trató con 0, 5, 10 y 20 mM de ácido peryódico. El efecto de éste, se midió por variaciones en la reactividad de los mAbs B106E, F14B y C16D con respecto a extracto proteico no tratado, reflejadas en los valores de D.O obtenidos a partir de un ELISA. El reconocimiento del mAb B106E tratado con 20 mM de ácido peryódico, bajo ligeramente con respecto al extracto sin tratar, de 0.59 a 0.47. Este resultado fue semejante a lo que se observó con el suero de ratón crónico (control +), en donde también bajo la D.O de 0.85 a 0.75 (Gráfica 2). Los mAbs F14B y C16D, al enfrentarse con el extracto proteico de epimastigotes tratados con el ácido peryódico, no mostraron cambios en los valores de D.O.

VI.2.8. Identificación de la reactividad de los anticuerpos monoclonales por proteínas. Los resultados anteriores sugirieron que los anticuerpos monoclonales estaban dirigidos contra epitopos proteicos. Para evaluar ésto, se trató el extracto de proteínas totales de epimastigotes con 10 µg de proteinasa K. La variación en la reactividad de los anticuerpos monoclonales se evaluó mediante un ELISA. Los resultados obtenidos de esta prueba mostraron que el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales B106E, F14B, C16D y

1D5 por el extracto proteico se vio afectado después del tratamiento, ya que los valores de D.O bajaron con respecto a los valores con extracto no tratado. La D.O de la reactividad del mAb B106E disminuyó de 0.46 a 0.11; con el mAb F14B bajó de 0.85 a 0.04; con el mAb C16D disminuyó de 0.28 a 0.085; y con el mAb 1D5 bajó de 0.39 a 0.01 (Gráfica 3).

VI.2.9. Actividad lítica de los diferentes anticuerpos monoclonales sobre *T. cruzi*.

Para evaluar la actividad lítica de los anticuerpos monoclonales contra tripomastigotes, se empleó el ensayo de lisis mediada por complemento. Los tripomastigotes muertos por la fijación de las proteínas del complemento a la membrana celular a través de los diferentes anticuerpos monoclonales, se representó como % de lisis. El mAb 1D5 indujo la lisis del 55 ± 2 % de los tripomastigotes y el mAb F14B lisó al 38 ± 0 % de éstos. Al aplicar la prueba estadística de T-student, sí hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tales valores de lisis, con respecto a la lisis de los tripomastigotes obtenida con los controles negativos, el mAb 3G10 y el suero de ratón no infectado, es decir del 14 ± 7 y 28 ± 1 %, respectivamente. El mAb B106E lisó al 34 ± 16 % de los tripomastigotes y el mAb C16D lisó al 44 ± 13 % de los tripomastigotes, no mostrándose diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto a los controles negativos, el mAb 3G10 y el suero de ratón no infectado. El suero de ratón crónico (control +) lisó al 96 % de los tripomastigotes (Tabla III).

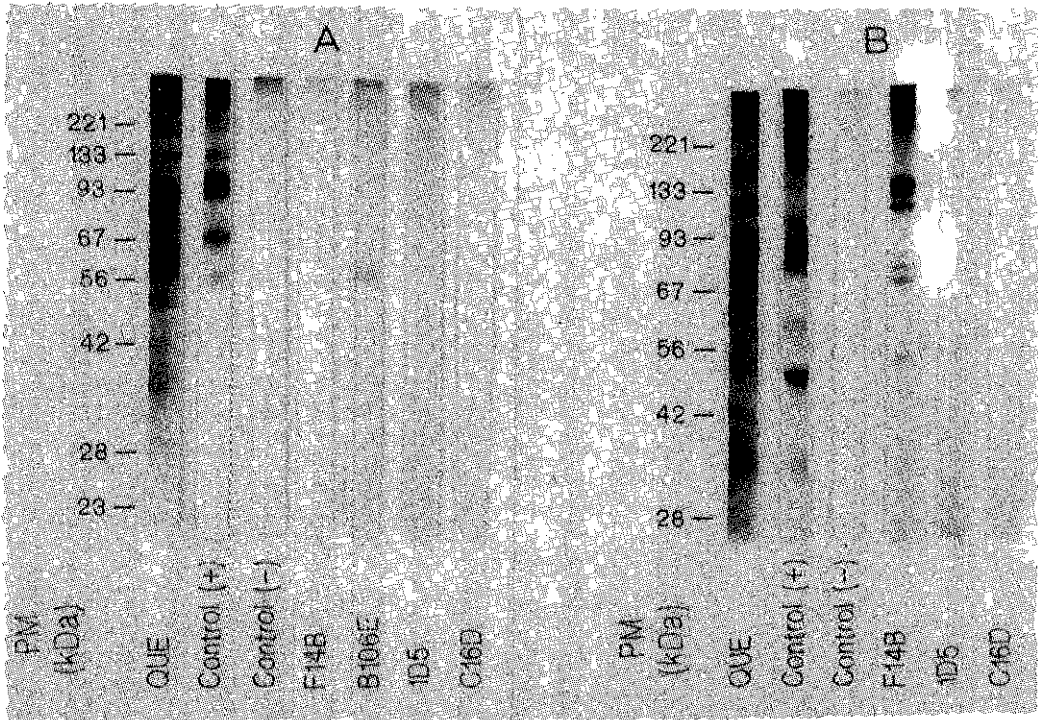
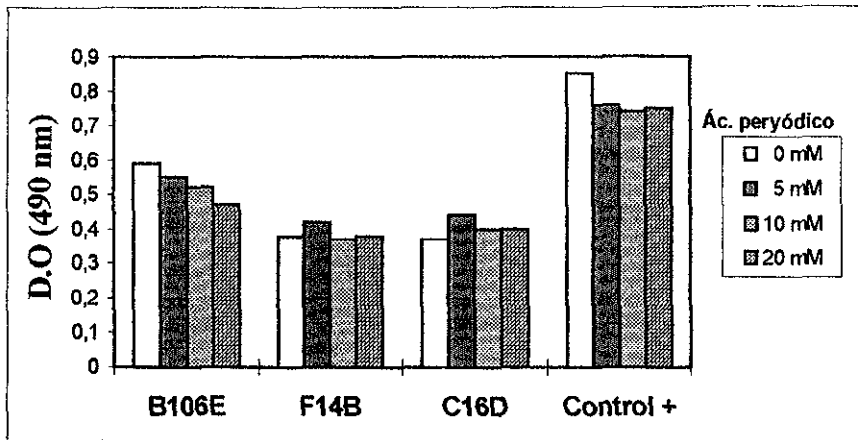
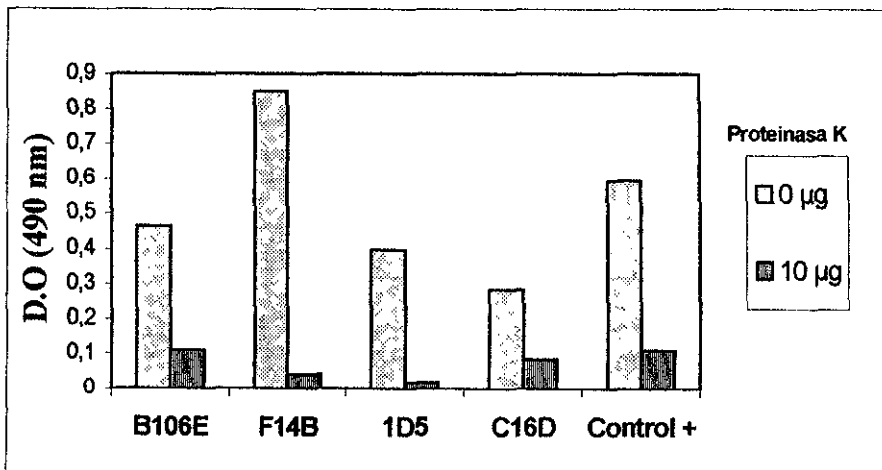


FIG. 12. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE. La inmunoprecipitación de proteínas de superficie de epimastigotes marcadas con I^{125} , se realizó con los mAbs B106E, F14B, C16D y 1D5, unidos a proteína A-sefarosa, anti IgM de ratón-agarosa y proteína Gr-agarosa, respectivamente. Las diferentes muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10% y se expusieron a una película para rayos X a -72°C por 4 y 16 días. En **(A)** extracto de la cepa QUE marcado con I^{125} (46, 222 cpm), carril 1; inmunoprecipitaciones realizadas con suero de ratón crónico anti-QUE (control +), carril 2; IgGs de ratón no infectado (control-), carril 3; mAb B106E, carril 4; mAb C16D, carril 5; mAb 1D5, carril 6. En **(B)** extracto de la cepa QUE marcado con I^{125} (100, 000 cpm), carril 1; inmunoprecipitaciones realizadas con suero de ratón crónico anti-Ninoa, carril 2; IgGs de ratón no infectado, carril 3; mAb F14B, carril 4. A la izquierda y derecha se muestran los marcadores de peso molecular.



GRÁFICA 3. REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS MONOCLONALES POR CARBOHIDRATOS. En esta gráfica, se muestra el reconocimiento de los mAbs B106E, F14B, C16D, y el suero de ratón crónico anti-QUE (control +) sobre extracto de epimastigotes tratado con 0, 5, 10 y 20 mM de ácido peryódico. Esta reacción se evaluó por un ELISA. La D.O se midió a 490 nm. Los valores son promedios de duplicados de un experimento.



GRÁFICA 4. REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS MONOCLONALES POR PROTEÍNAS. Se muestra la reactividad de los mAbs B106E, F14B, C16D, ID5 y el suero de ratón crónico anti-QUE (Control +) sobre extracto de epimastigotes tratado con 0 y 10 µg de proteinasa K. La reacción se evaluó por un ELISA. La D.O se midió a 490 nm. Los valores son promedios de duplicados de un experimento.

TABLA III. ACTIVIDAD LÍTICA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DIRIGIDOS CONTRA *T. cruzi*.

mAb	ISOTIPO	% DE LISIS
B106E	IgG2a	34 ± 16
F14B	IgM	38 ± 0 *
C16D	IgM	44 ± 13
1D5	IgG1	55 ± 2 *
3G10	IgG2a	14 ± 7
S.R. CRÓNICO	-	96 ± 3
S.R. NO INFECTADO	-	28 ± 1

La actividad lítica de los mAbs en contra de tripomastigotes de cultivo se evaluó por ensayo de lisis mediada por complemento. Los tripomastigotes se incubaron con 50 µg de los diferentes mAbs a temperatura ambiente por 30 min y con el suero de cobayo (fuente de complemento) a 37° C por 18 h. En la tabla se muestra los % de tripomastigotes lisados por los mAbs B106E, F14B, C16D, 1D5, 3G10, suero de ratón crónico anti-QUE y suero de ratón no infectado. Los valores son promedios de dos experimentos ± desviación estándar.

* Al realizar el análisis estadístico (T-Student), los valores de lisis observados con los mAbs F14B y 1D5 fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$), con respecto a los valores obtenidos con los anticuerpos controles (3G10 y suero de ratón no infectado).

VI.2.10. Efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la infección *in vitro* de células Vero. El efecto de los mAbs sobre la infección de los tripomastigotes a las células Vero, se evaluó contando el número de células infectadas a través de un microscopio óptico a las 0, 24 y 48 h post-infección de un total de 100 células (Tabla IV). A las 0 h, los tripomastigotes pre-incubados con los mAbs B106E, F14B y 1D5 infectaron al 35 % de las células, mientras que con el mAb C16D infectaron al 49 % de las células. Tales porcentajes de infección no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto a los valores de infección de las células infectadas sólo con los parásitos. Así, los porcentajes de inhibición de la infección observados en las células, no fueron significativos a este tiempo. A las 24 h, la infección de los tripomastigotes pre-incubados con los mAbs B106E, F14B y C16D fue

del 24 ± 4 , 30 ± 0.4 y 39 ± 0.29 %, respectivamente, valores de infección más bajos que los alcanzados por las células infectadas únicamente con los tripomastigotes, ya que infectaron al 54 ± 13 % de las células. Al someter tales valores a la prueba estadística, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) con referencia a los valores de infección observados con las células infectadas sólo con parásitos. Los parásitos pre-incubados con el mAb 1D5 que infectaron al 47 ± 12 % de las células, no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto a las células infectadas únicamente con los parásitos. Finalmente, a las 48 h, las células infectadas con parásitos pre-incubados con el mAb B106E, siguieron presentando porcentajes bajos de infección, pues infectaron al 28 ± 0.4 % de las células; con el mAb F14B aumentaron los niveles de infección, alcanzando el 52 ± 8 % de infección; los tripomastigotes pre-incubados con el mAb 1D5 infectaron al 36 ± 4 % de las células y con el mAb C16D se infectó al 45 ± 3 % de las células. Al realizar el análisis estadístico se observó que únicamente el valor de infección obtenido con los parásitos pre-incubados con el mAb B106E, con respecto al valor de infección de las células infectadas sólo con parásitos presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). La inhibición de la infección de los tripomastigotes pre-incubados con el mAb B106E fue del 35 % (Tabla IV).

El número de amastigotes intracelulares de las células infectadas con tripomastigotes pre-incubados con los diferentes mAbs aumentó conforme transcurrió el tiempo de infección. A las 0 h, los niveles de infección alcanzados con los tripomastigotes pre-incubados con los mAbs B106E, F14B, C16D y 1D5 fueron de entre 149 a 227 amastigotes. El número de amastigotes a las 24h, fue de entre 416 a 705 y a las 48 h, fue de entre 742 a 1063. Al comparar estadísticamente los resultados del efecto de los mAbs B106E, F14B, C16D y 1D5 con los obtenidos sólo con los parásitos, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$. Tabla IV).

TABLA IV. EFECTO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN LA INFECCION DE CELULAS VERO.

Mab	TIEMPO (h)								
	0			24			48		
	% DE INFECCION	PARASITOS/100 CELULAS	% DE INHIBICION	% DE INFECCION	PARASITOS/100 CELULAS	% DE INHIBICION	% DE INFECCION	PARASITOS/100 CELULAS	% DE INHIBICION
B106E	35 ± 2	149 ± 6	21	24 ± 4	462 ± 48	55	28 ± 0 *	1000 ± 100	35
F14B	35 ± 4	155 ± 17	22	30 ± 0	705 ± 45	44	52 ± 8	803 ± 103	0
C16D	49 ± 6	227 ± 20	0	39 ± 0	416 ± 24	27	45 ± 3	742 ± 7	0
1D5	35 ± 3	206 ± 11	22	47 ± 12	550 ± 39	13	36 ± 4	1063 ± 7	16
3G10	45 ± 6	155 ± 11	0	43 ± 1	435 ± 15	20	45 ± 3	1136 ± 76	0
No mAb	45 ± 8	189 ± 22		54 ± 13	449 ± 94		43 ± 1	1101 ± 6	

En esta tabla, se muestra el efecto de los mAbs B106E, F14B, C16D, 1D5, y el 3G10 (control -) sobre la infección de células Vero y el número de amastigotes/100 células. Los valores de infección se dan en porcentajes. Los tripomastigotes de cultivo se pre-incubaron con los diferentes mAbs a 4° C, por 2 h. Después, éstos se agregaron a las células Vero (10 parásitos por cada célula) y se co-cultivaron durante 18 h a 37° C. La infección se evaluó a las 0, 24 y 48 h post-infección, mediante el conteo de células infectadas y el número de parásitos intracelulares teñidos con May Grunwald-Giemsa.

- Los valores representan promedios ± desviación estándar de dos experimentos.
- Porcentajes de inhibición de la infección a partir de 100 células.

* El porcentaje de infección a células Vero por parásitos pre-incubados con el mAb B106E fue más bajo, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) con referencia a las células infectadas sólo con parásitos.

VI.2.11. Efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la cinética de parasitemia en sangre de ratones. La evaluación del papel que juegan los cuatro mAbs sobre la infección de tripomastigotes a ratones BALB/c, se realizó por medio de la observación de la parasitemia presente en la circulación sanguínea por 42 días, después que se infectaron los ratones. Para ello, se realizaron dos experimentos en donde se utilizaron anticuerpos monoclonales semipuros, precipitados con sulfato de amonio y anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad, experimento I y II, respectivamente.

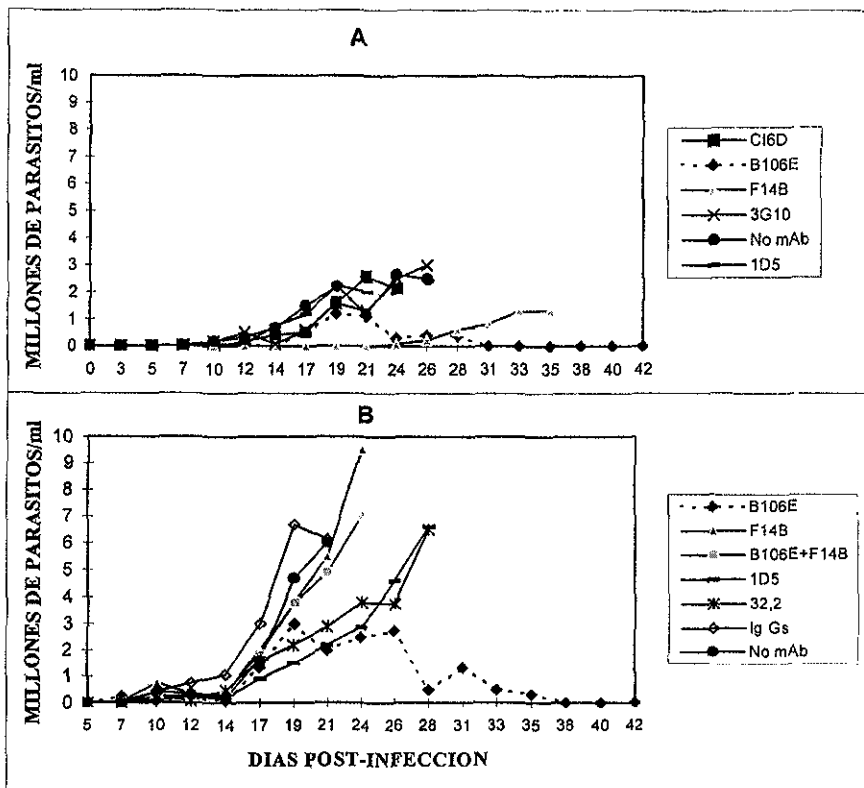
Los resultados obtenidos del primer experimento mostraron que los ratones infectados con parásitos pre-incubados con los mAbs 1D5 y C16D alcanzaron una parasitemia máxima de 2 ± 0 y $3 \pm 1 \times 10^6$ de parásitos/ml de sangre, respectivamente. Estos valores fueron similares a los observados en los ratones controles que se infectaron únicamente con parásitos y parásitos pre-incubados con el mAb 3G10. Por otra parte, la parasitemia máxima de los ratones infectados con parásitos pre-incubados con los mAbs B106E y F14B fue de $1 \pm 1 \times 10^6$ de parásitos. De esta manera se observó que los ratones alcanzaron la misma carga parasitaria, pues al aplicar la prueba estadística, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto a los ratones infectados sólo con parásitos. Siguiendo la evaluación del efecto del mAb B106E en la cinética de parasitemia, se observó que al final éste logró bajar el número de parásitos en circulación hasta no ser evidente (Gráfica 5A). Al analizar estadísticamente el efecto de este mAb, sí hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto a los ratones infectados únicamente con parásitos.

En el segundo experimento, la parasitemia máxima alcanzada por ratones infectados con parásitos pre-incubados con el mAb B106E fue de $3 \pm 3 \times 10^6$ de parásitos/ml de sangre, y al finalizar la cinética de parasitemia, no hubo parásitos en circulación en todos los ratones. La parasitemia máxima de los ratones infectados con parásitos pre-incubados con los mAbs, F14B, y B106E+F14B fue mayor con respecto a los valores del primer experimento, pues los ratones alcanzaron valores de infección de 7 ± 4 a $10 \pm 2 \times 10^6$ parásitos/ml de sangre (Gráfica 5B), pero los niveles de parásitos fueron semejantes a los obtenidos en los ratones controles infectados con parásitos pre-incubados con IgGs de suero de ratón no

infectado, los mAbs 3G10, 32.2 y únicamente con los parásitos. Al someter los valores de parasitemia al análisis estadístico, sólo hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los ratones infectados con parásitos pre-incubados con el mAb B106E y los ratones controles, pues la parasitemia desapareció de la circulación, efecto no observado con los mAbs F14B, C16D, 1D5, ni con la combinatoria de F14B+B106E.

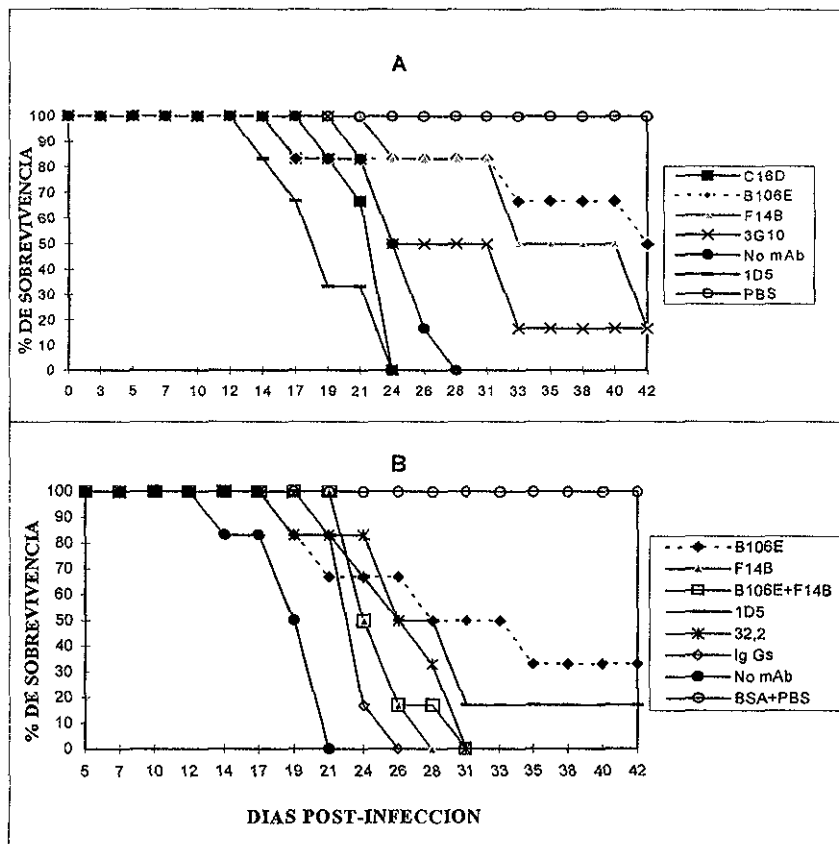
VI.2.12. Efecto de los anticuerpos monoclonales en la sobrevivencia de ratones infectados. Para evaluar el efecto de los diferentes anticuerpos monoclonales en la sobrevivencia de ratones infectados, se contó el número de ratones que sobrevivieron a la infección y los valores se representaron en porcentajes. La sobrevivencia se evaluó a lo largo de 42 días.

En el primer experimento, los ratones infectados con parásitos pre-incubados con el mAb B106E, logró proteger al 50% de los ratones. La sobrevivencia de los ratones infectados con parásitos pre-incubados con el mAb F14B fue del 17%, valor semejante al observado por los ratones infectados con parásitos pre-incubados con el mAb no relacionado (3G10); mientras que con los mAbs C16D y 1D5, los ratones no sobrevivieron a la infección, al igual que los ratones controles infectados únicamente con parásitos. En el segundo experimento, los ratones infectados con parásitos pre-incubados con el mAb B106E logró proteger al 33% de los ratones y con el mAb 1D5 sobrevivió el 17 % de los ratones; mientras que los ratones pre-incubados con los mAbs F14B y B106E+F14B, no sobrevivieron. Estos resultados fueron similares a los observados por los ratones infectados únicamente con parásitos o pre-incubados con los mAb no relacionados (3G10 y 32.2). Tales resultados mostraron que solamente el mAb B106E, es capaz de proteger parcialmente a los ratones infectados con *T. cruzi*.



GRÁFICA 5. EFECTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN LA CINÉTICA DE PARASITEMIA DE RATONES. En el experimento I, (A) se muestra el efecto de los mAbs (precipitados con sulfato de amonio al 50%-PBS): B106E, F14B, C16D, 1D5 y 3G10 (control -) sobre el número de parásitos presentes en la circulación sanguínea de los ratones. En el experimento II, (B) se muestra el efecto de los mAbs (purificados por cromatografía de afinidad): B106E, F14B, B106E+F14B, 1D5, 3G10, 32.2 e IgGs de suero de ratón sano (los tres últimos son los controles -) sobre el número de parásitos circulantes. Los ratones fueron infectados por vía intraperitoneal con 10^5 tripomastigotes pre-incubados con 0.5 mg de los diferentes mAbs. La parasitemia fue evaluada a partir de sangre periférica (dilución 1:500) bajo un microscopio óptico por 42 días. Los valores son promedios de parasitemia de ratones que sobrevivieron a la infección.

* El mAb B106E bajó los niveles de parasitemia, hasta no observar parásitos en circulación, mostrando tales resultados diferencias significativas ($p < 0.05$), con respecto a los controles.



GRÁFICA 6. EFECTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN LA SOBREVIVENCIA DE RATONES. En el experimento I, (A) se observan porcentajes de sobrevivencia de los ratones infectados con los parásitos pre-incubados con los mAbs (precipitados) B106E, F14B, C16D, 1D5 y 3G10. En el experimento II, (B) se observa la sobrevivencia de ratones que fueron infectados con parásitos pre-incubados con los mAbs (puros) B106E, F14B, B106E+F14B, 1D5, 3G10, 32.2 e IgGs de suero de ratón sano.

VII. DISCUSIÓN.

T. cruzi presenta una composición antigénica compleja, y de entre ésta, los antígenos situados en la superficie celular son de interés por ser los primeros en tener contacto con la célula hospedera. De ahí, la importancia de identificar antígenos que ayuden al entendimiento de el/los mecanismos involucrados en la infección de *T. cruzi* a las células hospederas. El uso de anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos de superficie han sido de gran ayuda para la caracterización de moléculas del parásito. No obstante, todos los trabajos se han enfocado en el estudio de antígenos de cepas de origen sudamericano, no evaluándose antígenos de cepas mexicanas, antígenos que pudieran ser diferentes a los descritos con anterioridad.

En el presente estudio se caracterizaron química y biológicamente a diferentes antígenos de la cepa Querétaro de *T. cruzi*, usando como herramienta diferentes anticuerpos monoclonales. Se produjeron cuatro anticuerpos monoclonales con isotipos diferentes y dirigidos contra distintos epitopos de antígenos de tripomastigotes de cultivo. Los mAbs fueron denominados: B106E (IgG2a), F14B y C16D (IgM) y 1D5 (IgG1, Martínez, 1995). Estos reconocieron a diferentes proteínas de epimastigotes, el mAb B106E identificó un doblete de 180 kDa, el mAb F14B reconoció una proteína de 35 kDa y un doblete de 40 kDa, el mAb C16D identificó dos antígenos de 42 y 71 kDa, y el mAb 1D5 reaccionó con un antígeno de 45 kDa (Fig. 6A). Con antígenos de tripomastigotes y amastigotes de cultivo, los mAb B106E y F14B (Fig. 6B y C) reaccionaron aparentemente con los mismos antígenos que se observaron en epimastigotes, aunque hubo ligeras variaciones en el peso, número e intensidad de las bandas, variaciones que pudieran deberse a modificaciones post-traduccionales, tales como la glicosilación o fosforilación de las cadenas polipeptídicas, lo que indica variabilidad estructural de estos antígenos según la metaciclologénesis del parásito; en lo que respecta a los mAbs C16D y 1D5, éstos no reaccionaron con tripomastigotes ni con amastigotes (Fig. 6B y C). Tal observación sugirió que a las concentraciones de antígenos utilizadas, los mAbs C16D y 1D5 podrían ser específicos de estadio, no obstante sería recomendable probar los anticuerpos con

concentraciones mayores de antígenos. Sin embargo, nuestros resultados sí sugieren una expresión diferencial de estos antígenos en los diferentes estadios del parásito. Los mAbs B106E y F14B no fueron específicos de estadio. La especificidad de los anticuerpos por uno u otro estadio se ha observado en diferentes trabajos. Así, hay anticuerpos específicos para antígenos de epimastigotes (Cooper, 1991) y anticuerpos monoclonales específicos para antígenos de tripomastigotes metacíclicos (Teixeira y Yoshida, 1986; Yoshida y col., 1990; Saborio y col., 1990; Ramírez y col., 1993). También, se han encontrado anticuerpos que reconocen a todos los estadios de *T. cruzi* (Araujo y col., 1982).

Por otro lado, se observó que los mismos antígenos identificados en la cepa QUE por los mAbs, se presentaron en las cepas mexicanas (JAL, JFA, JBE, Z10, H5, Ninoa) y sudamericanas (Esmeraldo y Silvio) de *T. cruzi*; sin embargo al igual que con los antígenos de los diferentes estadios del parásito, hubo variaciones en el peso, número e intensidad de las bandas (Fig. 7), resultado que sugiere la posibilidad de que estas proteínas fueran expresadas como componentes polimórficos o que fueran variaciones dadas a nivel post-traducciona. Resultados semejantes, se han observado con otros mAbs dirigidos contra el antígeno de 35/50 kDa de tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes de diferentes cepas de *T. cruzi*, pues se presentaron variaciones en la intensidad de las bandas proteicas y puede expresarse o no en las diferentes cepas (Mortara y col., 1992).

En nuestro caso, la variabilidad observada en la reacción de los mAbs con los antígenos de diferentes cepas de *T. cruzi* podría ser efecto de la heterogeneidad observada en las cepas mexicanas y sudamericanas (*in vitro*) a nivel biológico, metaciclogénesis, infectividad y virulencia; a nivel bioquímico, diferencias en los patrones isoenzimáticos (López-Olmos y col., 1998). También al estudiar el ADN de diferentes cepas con enzimas de restricción y luego ver su patrón de corrimiento, fue evidente la variabilidad, la cual se asoció con el origen geográfico de las cepas (Zavala-Castro, Velasco-Castrejón y Hernández, 1992). Estas razones, podrían influir en la exposición de los epitopos en la superficie de los parásitos y por ello darse la variabilidad del reconocimiento de los antígenos por los diferentes mAbs.

Continuando con la caracterización de los epitopos de *T. cruzi*, se demostró por inmunoblot que los mAbs B106E y 1D5, no cruzaron con proteínas de *T. rangeli* y *Leishmania sp*, parásitos que coexisten en la misma zona endémica que *T. cruzi*; en tanto que los mAbs F14B y C16D, sí cruzaron con ambos extractos (Fig. 8). Además, se observó por el ELISA que los mAbs B106E y 1D5 tampoco cruzaron con diferentes concentraciones de las proteínas en estado nativo de *T. rangeli* y *Leishmania sp* (Gráfica 2).

También, se observó que los antígenos identificados por los mAbs B106E y 1D5, no se presentaron en extractos proteicos de *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Taenia crassiceps*; mientras que el mAb F14B, sí cruzó con todos los extractos y el mAb C16D reaccionó ligeramente con *Mycobacterium tuberculosis* (Fig. 9). Tales resultados sugieren que los mAbs B106E y 1D5 son específicos de especie, ya que únicamente identificaron a *T. cruzi*, y no cruzaron con antígenos obtenidos de organismos pertenecientes a la misma familia, Trypanosomatidae, ni con antígenos de diferentes agentes infecciosos causantes de enfermedad en el ser humano. Los mAbs F14B y C16D, no son específicos de especie, sugiriéndose que las proteínas identificadas por dichos mAbs se tratan de proteínas que se han conservado a lo largo de la evolución, o a que los epitopos proteicos sean semejantes en los diferentes organismos y no se trate de las mismas proteínas.

Todos estos resultados señalan a el antígeno de 180 kDa como posibles candidatos para usarlos en la inmunopprofilaxis y para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Al estudiar la localización de los antígenos del parásito por medio de los mAbs a través de la IFI, se observó que el antígeno B106E se localiza en la superficie de los tripomastigotes (Fig 11B); en tanto que los antígenos F14B, C16D y 1D5, no se localizaron en la superficie de los parásitos (Fig. 11C, D y E). Tale resultados pueden atribuirse quizá a que los antígenos fueran de origen citoplasmático o que se tratará de epitopos que

estuvieran enmascarados, lo cual impediría el acceso de los anticuerpos, y para exponerlos se necesite solubilizar las proteínas membranales de los parásitos con detergente. Un resultado similar fue observado con el anticuerpo monoclonal 155D3, específico para el antígeno de 85 kDa, pues éste no reconoció a ningún epitopo de superficie por IFI; sin embargo al inmunoprecipitar las proteínas de superficie marcadas con Na I¹²⁵ y al solubilizarse con NP-40, se logró observar al antígeno de 85 kDa (Ouaissi y col., 1990). Debido a tales resultados, se realizó la inmunoprecipitación de las proteínas de superficie marcadas con I¹²⁵ de epimastigotes con los diferentes anticuerpos monoclonales para ver si se repetían los resultados por IFI, sólo se trabajó con epimastigotes por ser el estadio reconocido por todos los mAbs. Así, el mAb B106E precipitó una proteína de 59 kDa (Fig. 12A), proteína que no correspondió al peso observado por inmunoblot, es decir de 180 kDa (Fig. 6A), ésto indicó que posiblemente el antígeno se degradó por acción de proteasas. Tales resultados coincidieron con lo observado en otro trabajo con la glicoproteína de 90 kDa, presente en tripomastigotes, pues el peso fue diferente, sugiriendo que hubo proteólisis, debido a la velocidad de lavado de los parásitos (destrucción mecánica de los parásitos) o a que el extracto no se hubiera mantenido en hielo o congelación durante el experimento (Snary y Hudson, 1979). En el presente trabajo se utilizaron inhibidores de proteasas para la extracción de proteínas marcadas, hecho que evitaría la proteólisis; sin embargo la velocidad de lavado de los parásitos antes y después de marcar las proteínas fue a 800 g, velocidad que también emplearon Snary y Hudson, y que señalan que pudo inducir la lisis de los parásitos e inducir la proteólisis de la proteína, en nuestro caso pudo ocurrir lo mismo. Otro trabajo demostró que las variaciones en los pesos moleculares de las proteínas precipitadas y aún entre las proteínas ya descritas, dependen de la metodología empleada, es decir del tipo de radioiodinización (I¹²⁵ o I¹³¹, razón menos frecuente), velocidad (400 a 800 g) de lavado de los parásitos y la concentración de detergente (0.5%-2% de NP-40) (Schechter y Nogueira, 1988). Por otro lado, el mAb F14B, no precipitó a ninguna proteína a partir de 45 000 cpm de proteínas marcadas (Fig. 12A), pero al aumentar la concentración de proteínas marcadas a 100 000 cpm, se observó la precipitación de diferentes bandas de 54, 76, 84, 129, 155 y 177 kDa (Fig. 12B), mostrando que la solubilización del antígeno con el detergente quizá provocó que se expusieran sitios

de reconocimiento para el mAb y además que la expresión del antígeno en las subpoblaciones del parásito parece ser reducida. La variedad en el número de bandas puede deberse a que el anticuerpo reconoció diferentes epitopos de la misma molécula, o son epitopos compartidos por diferentes proteínas, o a las mismas razones observadas con el antígeno precipitado con el mAb B106E.

A pesar de las variaciones observadas en el peso molecular de los antígenos, se confirmó que el antígeno precipitado con el mAb B106E fue de superficie; mientras que el antígeno identificado por el mAb F14B, también se localizó en la superficie celular del parásito, no mostrando fluorescencia positiva debido a que como ya se mencionó, quizá el epitopo se encuentre enmascarado o que la expresión del antígeno en las subpoblaciones de *T. cruzi* es reducida. Otro prueba que podría utilizarse para evitar cualquier duda de la localización exacta de las moléculas identificadas por los cuatro mAbs, podría ser una microscopia electrónica, ya que esta prueba mostraría la localización en el parásito de cada molécula identificada por los anticuerpos monoclonales.

Un gran número de antígenos que intervienen en la interacción parásito-célula hospedera son carbohidratos, por tal motivo se determinó si los diferentes epitopos reconocidos por los cuatro anticuerpos monoclonales eran carbohidratos o proteínas. De esta manera, se trató el extracto proteico con diferentes concentraciones de ácido peryódico a pH ácido (4.5), reactivo que rompe grupos hidroxilos de los anillos de las hexosas, sin que se altere la estructura de las cadenas polipeptídicas (Woodward, Young y Bloodgood, 1985). Para determinar si los epitopos de epimastigotes identificados por los mAbs eran proteínas, el extracto se trató con proteinasa K, enzima que rompe proteínas en estado nativo. El reconocimiento de los mAbs B106E, F14B, C16D y 1D5 (Martínez, 1995) por el extracto tratado con el ácido peryódico, no mostró variación en los valores de D.O, con respecto al extracto sin tratar. Esto, sugirió que los epitopos identificados por los mAbs no son carbohidratos o son carbohidratos que están enmascarados, es decir el sitio de unión con el anticuerpo no es terminal (Kabat, 1976). Al tratar el extracto proteico con proteinasa K y enfrentarlo con los cuatro anticuerpos monoclonales, los valores de D.O se redujeron a diferencia del extracto sin tratar donde se presentaron valores de D.O más altos (Gráfica 4).

Tales resultados sugirieron que los mAbs B106E, F14B, C16D y 1D5 parecen estar dirigidos exclusivamente contra epitopos proteicos.

La función biológica de los diferentes anticuerpos monoclonales sobre *T. cruzi*, en cuanto a la capacidad que tienen estos de fijar proteínas del complemento en la superficie de los tripomastigotes y lísarlos, mostró que el mAb 1D5 a pesar de no reconocer a los tripomastigotes en las pruebas ya señaladas, sí ocasionó la muerte del 55 % de los parásitos a tiempos largos de pre-incubación, 18 h, pues a tiempos cortos de pre-incubación como reportaron Kipnis, Krettli y Da Silva en 1985, no hubo lisis celular. Efecto que indicaría que para que el mAb fije a las proteínas del complemento en la membrana del parásito, éste no debe sufrir ningún tratamiento previo, como sucedió en el inmunoblot e IFI o quizá a que se necesite mayor tiempo para que ocurra la fijación de las proteínas del complemento. Por otro lado, el mAb F14B lisó al 38 % de los tripomastigotes, efecto que también pudo ser dado por los tiempos largos de pre-incubación usados; mientras que los mAbs B106E y C16D mostraron porcentajes de lisis similares a los controles negativos (3G10 y suero de ratón no infectado) (Tabla III).

Se continuó con la evaluación de la participación de los antígenos del parásito en la interacción de éste con la célula hospedera, en especial la proteína de 180 kDa identificada por el mAb B106E y la proteína de 35-2/40 kDa identificada por el mAb F14B, debido a que ambas se localizan en la superficie y presentan características interesantes. Así, al pre-incubar los parásitos con los diferentes mAbs y evaluar la infección a células Vero, a diferentes tiempos post-infección, se encontró que a las 0 y 24 h post-infección no hubo inhibición de la infección, pues los valores fueron semejantes a los controles (Tabla IV). A las 48 h post-infección, únicamente el mAb B106E inhibió parcialmente la infección de los parásitos en el 35% de las células (Tabla IV). Tal resultado sugirió que la inhibición de la infección, se debe a que este mAb bloqueó estéricamente a la proteína de 180 kDa del parásito, proteína que parece estar involucrada en la interacción con la célula hospedera, este mismo efecto se ha observado con los mAbs 1G7, 10D8 (Texeira y Yoshida, 1987), 3F6 (Ramírez y col., 1993), 16C11 (Gomes y col., 1995) y 3C9 (Franchin y col., 1997).

También, se observó que una vez que el parásito entra a la célula, éste se reproduce normalmente, pues los valores de parásitos intracelulares no variaron con respecto a los controles. Así, en el estudio de la interacción *in vitro* de *T. cruzi* con la célula hospedera, se reportaron diferentes mAbs (Texeira y Yoshida, 1987; Yoshida y col., 1989; De Cassia y col., 1993; Gomes y col., 1995; Franchin y col., 1997) que bloquean parcialmente a diferentes antígenos que participan en este fenómeno, lo que indicaría que para que ocurra la invasión del parásito a la célula hospedera intervienen varios antígenos, y que el mayor o menor éxito en la inhibición también depende de la célula hospedera que se invada, la cepa utilizada, y la concentración de mAb y del antígeno. Resultados que apoyan estas ideas fueron aportados por Ramírez y colaboradores (1993), al estudiar el papel que juega el antígeno 3F6 (82 kDa) obtenido de tripomastigotes metacíclicos en la infección de células Vero por la cepa CL (altamente invasiva) y la cepa Tulahuén (menos invasiva), pues al bloquear los receptores de las células con diferentes concentraciones del antígeno reconocidos por los mAbs, impidieron la invasión de los parásitos con la cepa CL; mientras que los parásitos de la cepa Tulahuén, que también utilizaron al antígeno 3F6 para invadir a la célula hospedera, presentaron una vía alterna que facilitó la entrada de los parásitos a las células, pues no obstante que el receptor para este antígeno estaba ocupado, los parásitos reclutaron al antígeno 10D8 (35/50 kDa), logrando entrar a la célula hospedera.

Dada la participación del mAb B106E en los ensayos de infección *in vitro*, se evaluó su papel en la infección de *T. cruzi* *in vivo*. También se probaron los otros tres anticuerpos monoclonales. Los resultados obtenidos a partir de dos experimentos en donde se evaluó la cinética de parasitemia y la sobrevivencia de ratones infectados con parásitos pre-incubados con los diferentes mAbs, demostraron que únicamente el mAb B106E redujo la carga parasitaria de los ratones hasta no ser evidente en la circulación sanguínea. El mecanismo por el cual el mAb interfiere con la infectividad de los tripomastigotes puede ser el mismo que se sugirió en los ensayos de infección *in vitro*, es decir que la unión del mAb al antígeno de 180 kDa de los tripomastigotes bloqueó la entrada del parásito a las células. La sobrevivencia de los ratones infectados con los parásitos pre-incubados con el mAb B106E fue del 50% en el primer experimento (Gráfica 6A) y del 33% en el segundo

(Gráfica 6B). La diferencia en los porcentajes de sobrevivencia puede deberse a variaciones en las condiciones experimentales usadas. Otra razón de tal variabilidad en los resultados podría atribuirse a que la expresión del antígeno B106E en las subpoblaciones de los parásitos fuera diferente. De esta manera, podemos decir que se identificó una proteína de 180 kDa que está presente en los tres estadios de una cepa mexicana de *T. cruzi*, participa en la interacción con la célula hospedera y que al bloquearla con un anticuerpo específico se protege parcialmente a los ratones. También, se puede concluir que la interacción parásito célula hospedera se lleva a cabo por la participación de diferentes moléculas, como es el caso del glicoconjugado de 35/40 kDa, la gp de 82 kDa, y en el caso de la cepa QUE, la proteína de 180 kDa. Estos resultados estarían a favor de que la invasión de *T. cruzi* a la célula hospedera *in vitro* e *in vivo* se da por la participación de un gran número de moléculas y que la intervención de una u otra molécula, va a depender de la cepa utilizada y la célula infectada.

Antígenos de *T. cruzi* que pesen 180 kDa y que favorezcan la interacción con la célula hospedera no se han descrito, sin embargo existen antígenos con pesos muy cercanos, como el glicoconjugado Ssp-3, que pesa de 50 a 210 kDa y que se identificó con los mAbs 3C9 y 87. Este antígeno participó en la adhesión e invasión del parásito a células de mamífero no fagocíticas (Schenkman, Díaz y Nussenzweig, 1991), al igual que el mAb 3C9, favoreció la adhesión a células trasfectadas con el receptor Fc, demostrando que la interacción fue dependiente de éstos receptores (Schenkman y col., 1992). También, el antígeno Ssp-3 mostró ser blanco del mAb 3C9, pues al inyectar tal anticuerpo a los ratones (transferencia pasiva), y enseguida inocularlos con los parásitos, se evitó la infección (Franchin y col., 1997). Por otro lado, durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas, un exoantígeno de 160 kDa fue reconocido por sueros de enfermos crónicos. Este antígeno sólo se localizó en tripomastigotes. Interesantemente no se presentó en individuos que se curaron después de la inmunoterapia (Jazin y col., 1991). Otro antígeno que tiene un peso molecular alto, de 121 a 222 kDa, es la neuraminidasa. Esta enzima participó en la interacción *T. cruzi*-célula hospedera, actuando como modulador de la infección a través de un mecanismo de control negativo, pues al utilizar el mAb TCN-1 dirigido contra la

enzima del parásito, se observó un incremento en los niveles de infección de los parásitos a las células (Prioli, Mejía y Pereira, 1990).

Como se puede observar, la proteína B106E aquí caracterizada, sólo tiene en común con los antígenos Ssp-3, 160 y neuraminidasa, que se pueden agrupar en antígenos de alto peso molecular, y que participan en la interacción del parásito con la célula hospedera, pero no de la misma manera que la proteína B106E, pues la neuraminidasa aumentó los niveles de infección en las células (*in vitro*) y el antígeno de 160 kDa es de secreción, mientras que en nuestro caso parece no serlo. Tampoco parece tratarse del antígeno Ssp-3, que aunque interviene en la invasión del parásito a la célula hospedera como el antígeno B106E, este fue identificado por anticuerpos que reconocen ácido siálico y en nuestro caso el mAb B106E parece reconocer exclusivamente una región peptídica. No obstante estas observaciones, es necesario que una vez que se purifique el antígeno, se secuencie y se evalúe si existe homología con alguno de estos antígenos o con algún otro antígeno ya secuenciado.

Finalmente, es interesante señalar que establecida la importancia de los epitopos proteicos identificados con los diferentes anticuerpos monoclonales, es necesario purificarlos, como ya se mencionó y volver a evaluar su importancia en la inhibición de la infección *in vitro* y ver si generan una respuesta inmune protectora a ratones. Así, también encontrar el receptor del antígeno en la célula hospedera y estudiar su importancia en la interacción parásito-célula hospedera. Por otro lado, se puede investigar si los antígenos puros, sobre todo el antígeno de 180 kDa, y los mAbs sirven para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en sus diferentes fases.

VIII. CONCLUSIONES.

♦ Se produjeron y caracterizaron cuatro diferentes anticuerpos monoclonales: B106E, F14B, 1D5 y C16D dirigidos contra *T. cruzi*.

♦ El mAb B106E fue isotipo IgG2a, el mAb 1D5 fue isotipo IgG1 y los mAbs F14B y C16D pertenecieron al isotipo IgM.

♦ Los mAbs B106E y F14B reaccionaron con epitopos proteicos de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes; mientras que los mAbs 1D5 y C16D podrían ser específicos de estadio, pues aparentemente sólo identificaron a epimastigotes.

♦ Los anticuerpos monoclonales reaccionaron con antígenos de las cepas de *T. cruzi*: Z10, JAL, JFA, JBE, H5, Ninoa, Silvio y Esmeraldo, aunque hubo variaciones en el peso, número e intensidad de las proteínas reconocidas por éstos.

♦ Los mAbs B106E y 1D5, no reconocieron antígenos de lisados de *T. rangeli* y *Leishmania sp*, miembros de la familia trypanosomatidae a la que también pertenece *T. cruzi*, ni reconocieron antígenos de lisado de *Toxoplasma gondii*, de fluido de cisticerco de *Taenia crassiceps*, y tampoco reaccionaron con proteínas de secreción de *Mycobacterium tuberculosis*, lo cual hace a estos antígenos interesantes para estudios posteriores. Asimismo, el antígeno B106E y su anticuerpo correspondiente podrían emplearse en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

♦ Los mAbs B106E y F14B identificaron un epitopo localizado en la superficie celular de *T. cruzi*.

♦ Únicamente el mAb F14B identificó una proteína secretada por tripomastigotes.

- ◆ Los epitopos identificados por los cuatro mAbs fueron de naturaleza proteica.

- ◆ En ensayos de infección *in vitro*, el mAb B106E inhibió parcialmente la infección de las células Vero por el parásito. Señalando la participación de el antígeno B106E en la interacción con la célula hospedera.

- ◆ En los ensayos de infección *in vivo*, el mAb B106E logró bajar los niveles de parasitemia hasta no ser evidentes y logró proteger parcialmente a los ratones infectados.

IX. BIBLIOGRAFIA.

- Alves, M.J.M., Albuin, G., Kuwajima, V.Y. y Colli, W. 1986. Partial Inhibition of Trypomastigotes Entry and into Cultured Mammalian Cells by Monoclonal Antibodies Against a Surface Glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **21**: 75-82.
- Andrade, S.G., Magalhães, J.B. and Pontes, A.L. 1985. Evaluation of Chemotherapy with Benznidazole and Nifurtimox in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi* Strains of Different Types. *Bull. World Health Organ.* **63**: 721-726.
- Andrews, N.W. and Colli, W. 1982. Adhesion and Interiorization of *Trypanosoma cruzi* in Mammalian Cells. *J. Protozool.* **29**: 264-269.
- Araguth, M.F., Rodrigues, M.M. y Yoshida. 1988. *T. cruzi* Metacyclic Trypomastigotes: Neutralization by the Stage-Specific Monoclonal Antibody IG7 and Immunogenicity of 90 KD Surface Antigen. *Parasite Immunol.* **10**: 707-712.
- Araujo, F., Sharma, S.D., Tsai, V., Cox, P., Remington, J.S. 1982. Monoclonal Antibodies to Stages of *Trypanosoma cruzi*. Characterization and Use for Antigen Detection. *Infect. Immun.* **37**: 344-349.
- Araujo, F. 1986. Analysis of *Trypanosoma cruzi* Antigens Bound by Specific Antibodies and by Antibodies to Related Trypanosomatids. *Infect. Immun.* **53**: 179-185.
- Araya, J.E. Cano, M.I, Yoshida, N. and Da Silveira, J.F. Cloning and Characterization of a Gene for the Stage-Specific 82-kDa Surface Antigen of Metacyclic Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **65**: 161-169.
- Athias, A. y Neghme, A. 1984. Parasitología Clínica. Mediterráneo. Chile. pp 238-251.
- Bayona, C., Velasco, O., Ramirez, J., Gutierrez, M. y Guzman, C. 1983. Enfermedad de Chagas en Donadores de Sangre del Hospital Univesitario de Puebla, México. *Rev. Higiene.* **6**: 18-26.
- Ben Younes-Chennoufi, A., Said G., Eisen H., Duran A. and Hontebeyrie-Joskowicz, M. 1988. Cellular Immunity to *Trypanosoma cruzi* is Mediated by Helper T Cells (CD4+). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**: 84-89.
- Boschetti, M.A., Piras, M.N., Henriquez, D. y Piras, R. 1987. The Interaction of a *Trypanosoma cruzi* Protein with Vero Cells and its Relationship with Parasite Adhesion. *Mol. Biochem. Parasitol.* **24**: 175-184.
- Bouhdidi, A., Truyens, C., Rivera, M.T., Bazin, H. and Carlier, Y. 1994. *Trypanosoma*

cruzi Infection in Mice Induces a Polyisotypic Hypergammaglobulinemia and Parasite-Specific

Response Involving High IgG1 Antibodies. *Parasite. Immunol.* **16**: 69-76.

- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantization of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principles of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

- Brandariz, S., Schijman, A., Vigliano, C., Arteman, P., Viotti, R., Beldjord, C. and Levin, M.J. 1995. Detection of Parasite DNA in Chagas' Heart Disease. *Lancet.* **346**: 1370-1371.

- Brener, Z. 1980. Immunity to *T. cruzi*. *Adv. Parasitol.* **18**: 247-291.

- Burnet, F.M, 1957, A Modification of Jerne's Theory of Antibody Production Using The Concept of Clonal Selection. *Austral. J. Sci.* **20**: 67-69.

- Caballero, G.M.L. 1996. Estudio de la Respuesta Inmune Humoral Inducida por Cuatro Aislados Mexicanos de *Trypanosoma caruzi* En Modelo Murino. Tesis. Prof. Fac. Ciencias. 92 pp.

- Celentano, A.M. and González, C.S.M. 1993. *In Vivo* Macrophage Function in Experimental Infection with *T. cruzi* Subpopulations. *Acta trop.* **55**: 171-180.

- Cheng, T.C. 1986. General Parasitology. Academic Press College. New York. USA. 827 pp.

- Chiari, E. y Camargo, E.P. 1984. Culturing and Cloning of *T. cruzi*. En: Genes and Antigens of Parasites. Morel, M (Ed). Inst. Oswaldo Cruz. Río de Janeiro. Brasil. pp 23-26.

- Cooper, R., Inverso, J.A., Espinosa, M., Nogueira, N. and Cross, G.A.M. 1991. Characterization of Candidate Gene for GP 72, an Insect Stage-Specific Antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**: 45-60.

- Coosio, P.M; Leguens, R.P; Diéz, C; Szarfman, A; Segal, A. and Arana, R.M. 1974. Chagasic Cardiopathy: Antibodies Reacting with Plasma Membrane of Striated Muscle and Endothelial Cells. *Circulation.* **50**: 1252.

- De Araújo-Jorge, T.C. y De Souza, W. 1984. Effect of Carbohydrates, Periodate and Enzymes in the Process of Endocytosis of *T. cruzi* by Macrophages. *Acta Trop.* **41**: 17-28.

- De Araújo-Jorge, T.C. y De Souza, W. 1986. Interaction of *T. cruzi* with Macrophages: Effect of Previous Incubation of the Parasites or the Host Cells with Lectins. *Z. Parasitenkd.* **72**: 153-171.

- De Araújo-Jorge, T.C. 1989. The Biology of *T. cruzi*-Macrophage Infection. *Mem. Inst.*

Oswaldo Cruz. **84**: 441-462.

- De Arruda, M.V., Colli, W. y Zingales, B. 1989. Terminal β -D-Galacto Furanosyl Epitopes Recognized by Antibodies that Inhibit *Trypanosoma cruzi* Internalization into Mammalian Cells. *Eur. J. Biochem.* **182**: 413-421.
- De Cassia, R.R., Rigoni, V.L., González, J. y Yoshida, N. 1993. The 35/50 KDa Surface Antigen of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes, and Adhesion Molecule Involved in Host Cell Invasion. *Parasite Immunol.* **15**: 121-125.
- De Souza, W. 1984. Cell Biology of *T. cruzi*. *Intern. Rev. Cytology.* **86**: 197-283.
- Diario Oficial. 1992. Norma Técnica Núm. 348 Para la Prevención y Control de la Tripanosomiasis o Enfermedad de Chagas.
- Dietrich, P., Dussan, M.P., Floeter-Winter, L.M., Affonso, M.H.T., Camargo, E.P. And Soares, M.B. 1990. Restriction Fragment Polymorphisms in the Ribosomal Gene Spacers of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma conorhini*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **42**: 13-20.
- Domínguez, V.A., Ricárdez, E.J.R. and Espinoza, M.E. 1990. Estudio de Reservorios Silvestres del *Trypanosoma cruzi* en la Reserva Ecológica de "El Zapotal", Chiapas, México. *Bol. Chil. Parasitol.* **45**: 3-8.
- Engman, D.M., Reddy, L.V., Donelson, J.E. and Kirchho, L.V. 1987. *Trypanosoma cruzi* Exhibits Inter and Intra-Strain Heterogeneity in Molecular Karyotype and Chromosomal Gene Location. *Mol. Biochem. Parasitol.* **22**: 115-123.
- Espinoza, B., Parizade, M., Ortega, E., Tarrab-Hazdai, R., Zilberg, D. and Ruth, A. 1995. Monoclonal Antibodies Against Acetylcholinesterase of *Schistosoma mansoni*: Production and Characterization. *Hibridoma.* **14**: 577-585.
- Fernández, M.A., Muñoz-Fernández, M.A. and Fresno, M. 1993. Involvement of β 1 Integrins in the Binding and Entry of *T. cruzi* Into Human Macrophages. *Eur. J. Immunol.* **23**: 552-557.
- Franchin, G., Pereira-Chioccola, L., Schenkman, S. and Rodrigues, M.M. 1997. Passive Transfer of a Monoclonal Antibody Specific for Sialic Acid-Dependent Epitope on the Surface of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes Reduces Infection in Mice. *Infect. Immun.* **65**: 2548-2554.
- Giovanni-De-Simone, S., Pontes, C.L.C., Oliva, O.I.P., Andrade, S.G. and Galvao-Castro, B. 1987. *Trypanosoma cruzi* Strain-Specific Monoclonal: Identification of Colombian Strain Flagellates in the Insect Vector. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 750-754.
- Goding, J.W. 1986. Monoclonal Antibodies. Principles and Practice. Academic Press. San

Diego. USA. 315 pp.

- Goldsmith, R. S., Zárate, R.J., Kagan, Y., Cedeño-Ferreira, J., Galindo-Vasconcelos, M.G. y Paz, A.E. 1978. El Potencial de la Transmisión en la Enfermedad de Chagas por Transfusión Sanguínea: Hallazgo Serológico Entre Donadores en el Estado de Oaxaca. *Sal. Púb. Méx.*, **22**: 439-444.
- Goldsmith, R.S., Kagan, Y.G., Zárate, R., Reyes, G.M., Cedeño-Ferreira, J. 1979. Estudio Epidemiológico de la Enfermedad de Chagas en Oaxaca, México. *Bol. Of. Sanit. Panam.* **87**: 1-19.
- Goldsmith, R.S., Zárate, R.S., Zárate, L.G., Kagan, I.G., Jacobson, H., Morales, C. 1986. Estudios Clínicos y Epidemiológicos de la Enfermedad de Chagas en México y un Estudio Complementario de 7 años. Y. Cerro del Aire. *Bol. Of. Sanit. Panam.* **100**: 145-166.
- Gomes, Y.M., Abath, F.G. C., Furtano, A. F., Regis, L.N., Nakasawa, M., Montenegro, L.T., Vouldoukis Y., Alfred-Morin, C. y Monjour, L. 1995. A Monoclonal Antibody Against Blood Forms of *Trypanosoma cruzi* Lyses the Parasite In Vitro and Inhibits Host Cell Invasion. *Appl. Biochem. Biotech.* (50): 57-69.
- González, A., Prediger, E., Huecas, M.E., Nogueira, N. and Lizardi, P.M. 1984. Minichromosomal Repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: Its Use in a High-Sensitivity Parasite Detection Assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 3356-3360.
- Hall, B.F. 1993. *T. cruzi*: Mechanism for Entry into Host Cells. *Semin. Cell. Biol.* **4**: 323-333.
- Harlow, E. And Lane D. 1988. Antibodies A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. New York. USA. 726 pp.
- Higuchi, M.L., Matins, R.M., Demarchi, A.V., Benuenut, L.A., Sampaio, G.P., Bellotti, G. and Pileggi, F. 1997. Association of an Increase in CD8+ T Cells with the Presence of *Trypanosoma cruzi* Antigens in Chronic Human Chagasic Myocarditis. *Am. J. Trop. Med.* **56**: 485-489.
- Ho, J., Reed, S.G., Sobel, J., Arruela, S., He, S.H., Wick, H.A. and Grabstein, K.H. 1992. Interleukin 3 Induces Antimicrobial Activity Against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi* Infections. *Infect. Immun.* **60**: 1984.
- Hoffinan, C.C. 1928. Nota Acerca de un Probable Transmisor de la Tripanosomiasis Humana en el Estado de Veracruz. *Rev. Méx. Biol.* **8**: 12-18.
- Horibata, K. and Harris, A.W. 1970. Mouse Myelomas and Lymphomas in Culture. *Exp. Cell. Res.* **60**: 61-77.

- Hudson, L. and Britten, V. 1985. Immune Response to South American Tripanosomiasis and its Relationship to Chagas' Disease. *British. Med. Bull.* **41**: 175-180.
- Humphrey, J.S., Mc Cormick, T.S. and Rowland, E.C. 1997. Parasite Antigen-Induced IFN- γ and IL-4 Production by Cells from Pathopermissive and Pathoresistant Strains of Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* **83**: 533-536.
- Iida, K., Whitlow, M.B. and Nussenzweig, V. 1989. Amastigotes of *T. cruzi* Escape Destruction by the Terminal Complement Components. *J. Exp. Med.* **169**: 881-891.
- Jazin, E.E., Luquetti, A.O., Rassi, A. and Frasch, A.C.C. 1991. Shift of Excretory-Secretory Immunogens of *Trypanosoma cruzi* During human Chagas' Disease. *Infect. Immun.* **59**: 2189-2191.
- Kabat, E.A. 1976. Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry. Holt, Rinehart and Winston. New York. USA.
- Kahn, S.J., Wleklinski, M., Aruffo, A., Farr, A., Coder, D. and Kahn, M. 1995. *T. cruzi* Amastigotes Adhesion to Macrophages is Facilitated by the Mannose Receptor. *J. Exp. Med.* **182**: 1243-1258.
- Kahn, S.J., Wleklinski, M., Ezekowitz, R.A.B., Coder, D., Aruffo, A., Farr, A., Coder, D. and Farr, A. 1996. The Major Surface Glycoproteins of *T. cruzi* Amastigotes Are Ligands of the Human Serum Mannose-Binding Protein. *Infect. Immun.* **64**: 2649-2656.
- Katz, M., Despomnier, D.D. and Gwadz, R.W. 1988. Parasitic Diseases. Springer-Verlag. New York. USA. 301 pp.
- Kierszenbaum, F. 1985. Is there Autoimmunity in Chagas Disease?. *Parasitol. Today.* **1**: 4-6.
- Kipnis, T.L., David, J.R., Alper, C.A., Sher, A. and Da Silva, W.D. 1981. Enzymatic Treatment Transforms Trypomastigotes of *T. cruzi* into Activators of Alternative Complement Pathway and Potentiates their Uptake by Macrophages. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* **78**: 602-605.
- Kipnis, T. L., Krettli, A.U. and Da Silva, W.D. 1985. Transformation of Trypomastigotes Forms of *T. cruzi* into Activators of Alternative Complement Pathway by Immune IgG Fragments. *Scand. J. Immunol.* **22**: 217.
- Kofoid, C.A., Wood, F.D. and McNeil, E. 1935. The Cycle of *T. cruzi* in Tissue Culture of Embryonic Heart Muscle Cell. *Unit. Calif. Pebl. Zool.* **41**: 23-24.
- Köhler, G. and Milstein, C. 1975. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature.* **256**: 495-497.

- Kolb-Bachofen, V., Schlepper-Schafer, J., Roos, P., Hulsmann, D, and Kolb, H. 1984. Gal Nac/Gal-Specific Rat Liver Lectins: Their Role in Cellular Recognition. *Biol. Cell.* **51**: 219-226.
- Kumar, S. and Tarleton, R.L. 1998. The Relative Contribution of Antibody and CD8+ T Cell Function to Immune Control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite. Immunol.* **20**: 207-216.
- Kumate, J., Muñoz, O., Gutiérrez, G. y Santos, J.I. 1992. Manual de Infectología. Méndez Editores. México. 731 pp.
- Laemmli, O.K. 1972. Cleavage of Structural Proteins the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., deroux, G., Grain, J., Honingberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblinch, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, E.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. and Wallace, F.G., 1980. A Newly Revised Classification of the Protozoa. *J. Protozool.* **27**: 37-58.
- Ley, V., Andrews, N.W., Robbins, E.S. and Nussenzweig, V. 1988. Amastigotes of *T. cruzi* Sustain an Infective Cycle in Mammalian Cells. *J. Exp. Med.* **68**: 649-659.
- Liew, F.W., Cox, F.E.G. 1991. Nonspecific Defence Mechanisms: The Role of Nitric Oxide. *Immunoparasitol. Today* (Asch. C., Gallagher, R.B., eds) 17-22 pp, Elsevier Trends Journals, Cambridge.
- Littlefield, J.W. 1964. Selection of Hybrids From Matings of Fibroblasts in vitro and Their Presumed Recombinants. *Science.* **145**: 709-712.
- López-Olmos, V. 1994. Caracterización Biológica *In vitro* de 17 Cepas Mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Prof. Fac. Ciencias. UNAM. pp 96.
- López-Olmos, V., Pérez-Nasser, N., Piñero, D., Ortega, E., Hernández, R. And Espinoza, B. 1998. Biological Characterization and Genetic Diversity of Mexican Isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta. Trop.* **69**: 239-254.
- Marchalonis, J.J. 1969. An Enzymic Method for the Trace Iodination of Immunoglobulins and Other Proteins. *Biochem. J.* **113**: 299-305.
- Martín, F., Puertas, C., Thomas, M.C., Marañón, C., Patarroyo, M.E., Martín, J., Alonso, C. and López, M.C. 1997. Identification of a *T. cruzi* Antigenic Epitope Implicated in the Infectivity of Fibroblast LLC-MK2 Cells. *Parasitol. Res.* **83**: 226-232.
- Martínez, P.A.A. 1995. Producción de Anticuerpos Monoclonales contra el Aislado Ninoa de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Prof. Fac. Ciencias. UNAM. pp 76.

- Mazzotti, L. 1940. Dos Casos de Enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca. *Gac. Med Méx.* **70**: 417-420.
- Mazzotti, L. y Dias, E. 1949. Resumen de los Publicados Sobre Enfermedad de Chagas en México. *Rev. Soc. Mex., Hist. Nat.* **10**: 103-111.
- Minoprio, P., El Cheikh, M.C., Murphy, E., Honterbeyrie-Joskowicz, M., Coffman, R., Coutinho, A. and O'Garra, A. 1993. Xid-Associated Resistance to Experimental Chagas Disease is IFN- γ Dependent. *J. Immunol.* **151**: 4200-4208.
- Monteón, V.M., Linares, C., Amador, F.R., Rueysegger, G.L. and Reyes, P.A. 1987. Anticuerpos Séricos a *T. cruzi* en Donadores de Sangre en la Ciudad de México. *Rev. Bioquímica.* **69**: 6-9.
- Mortara, R.A., Araguth, M.F. y Yoshida, N. 1988. Reactivity of Stage-Specific Monoclonal Antibody 1G7 with Metacyclic Tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi* strains: Lytic Property and 90 000 mol. wt Surface Antigen Polymorphism. *Parasite. Immunol.* **10**: 369-378.
- Mortara, R.A., Da Silva, S., Araguth, M.F., Blanco, S.A. and Yoshida, N. 1992. Polymorphism of the 35 and 50-Kilodalton Surface Glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes. *Infection and Immunity.* **60**: 4673-4678.
- Mosman, T.R. and Sad, S. 1996. The Expanding Universe of T-cell Subsets: Th1, Th2 and More. *Immunol. Today.* **17**: 138-146.
- Neufeld, E.F. y Ashwell, G. 1979. Carbohydrate -Recognition Systems for Receptor-Mediated Pynocytosis. In: Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. Lennarz, W.J (Ed). Plenum Press, Nueva York. USA. pp 241-266.
- Nogueira, N. y Cohn, Z. 1976. *T. cruzi*: Mechanism of Entry and Intracellular Fate in Mammalian Cells. *J. Exp. Med.* **143**: 1402-1420.
- Nogueira, N., Chaplan, S. y Cohn, Z. 1980. *T. cruzi*: Factors Modifying Ingestion and Fate of Blood form Trypomastigotes. *J. Exp. Med.* **152**: 447-451.
- Norris, K., Hart, G., So, M. 1989. Purification of a *T. cruzi* Membrane Glycoprotein Which Elicits Lytic Antibodies. *Infect. Immun.* **57**: 2372-2377.
- Nossal, G.J.V. and Lederberg, J. 1958. Antibody Production by Single Cells. *Nature.* **181**: 1419-1420.
- Okada, Y. 1962. Analysis of Giant Polynuclear Cell Formation Caused by HVJ Virus from Ehrlichis Ascites Tumor Cell. I. Microscopic Observation of Giant Polynuclear Cell Formation. *Exp. Cell. Res.* **26**: 98-107.

- O'Daly, J.A., Carrasco, H., Fernández, V. and Rodríguez, M.B. 1994. Comparison of Chagasic and Non-Chagasic Myocardopathies by ELISA and Immunoblotting with Antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Acta. Trop.* **56**: 265-287.
- OMS, 1991. Control de la Enfermedad de Chagas. Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Serie Informes Técnicos No. 811. Ginebra. 101 pp.
- OPS. 1990. Las Condiciones de Salud en las Américas. Vol. I. OPS
- Ortega, C.J. 1980. Determinación Electroforética de Patrones Isoenzimáticos de Aislados Mexicanos de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Prof. Fac. Química, UNAM. 48 pp.
- Ostle, B. 1988. Statistics in Research. Lindac. Malone. Iowa State University Press/ AMES. USA. pp 664.
- Osuna, A., Rodríguez-Cabezas, M.N., Castanys, S., Mesa-Valle, M.C and Mascaró, M.C. 1995. A Protein Secreted by *Trypanosoma cruzi* Capable de Inducing the Entry of Inert Particles into HeLa Cells. *International Journal for Parasitology*. **25**: 1213-1225.
- Ouaiissi, M.A., Debremetz, J.F., Kusnierz, J. Cornette, J., Loyens, M., Taibi, A., Marty, B., Velge, P., Rizui, F. and Capron, A. 1990. *Trypanosoma cruzi*: Differential Expression and Distribution of an 85-kDa Polypeptide Epitope by *in Vitro* Developmental Stages. *Exp. Parasitol.* **75**: 207-217.
- Pinto, D.J.C. 1992. Epidemiology of Chagas Disease. In: Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinic Medicine. Wendel, S., Brener, M.E., Camargo, A. and Rassi, A (Eds). ISBT Brazil'92. Sao Paulo. Brazil. pp 49-80.
- Potter, M. and Boyce, C.R. 1962. Induction of Plasma Cell Neoplasms in Strain BALB/c Mice with Mineral Oil Adjuvants. *Nature*. **193**: 1086-1087.
- Primavera, K.S.C., Umezawa, E.S., Peres, B.A., Camargo, M.E. and Hoshino-Shimizu. 1990. Chagas' Disease: IgA, IgM and IgG Antibodies to *Trypanosoma cruzi* Amastigote, Trypomastigote and Epimastigote Antigens in Acute and Different Chronic Forms of the Disease. *Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. **32**: 172-180.
- Prioli, R.P., Mejía, J.S. and Pereira, M.E. 1990. Monoclonal Antibodies Against *Trypanosoma cruzi* Neuraminidase Reveal Enzyme Polymorphism, Recognize a Subset of Trypomastigotes, and Enhance Infection *In Vitro*. *J. Immunol.* **144**: 4384-4391.
- Pyrrho, A.S., Moraes, J.L.C., Pecanha, L.M.T. and Gattass, C.R. 1998. *Trypanosoma cruzi*: IgG1 and IgG2b Are the Main Immunoglobulins Produced by Vaccinated Mice. *Parasitol. Res.* **84**: 333-337.
- Ramirez, M.I., De Cassia, R.R., Araya, J.E., Da Silveira, J.F. and Yoshida, N. 1993.

Involvement of the Stage-Specific 82-Kilodalton Adhesion Molecule of *T. cruzi* Metacyclic Trypomastigotes in Host Cell Invasion. *Infect Immunity*. **61**: 3636-3641.

- Ramos, C., Lamoyi, E., Feoli, M., Rodríguez, M., Pérez, M. And Ortiz-Ortiz, L. 1978. *Trypanosoma cruzi*: Immunosuppressed Response to Different Antigens in the Infected Mouse. *Exp. Parasitol.* **45**: 190-199.

- Ramos, C., Schädler-Siwon, I. And Ortiz-Ortiz, L. 1979. Suppressor Cells Present in the Spleens of *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice. *J. Immunol.* **122**: 1243-1247.

- Reed, S.G., Nathan, C.F., Pihl, D.L., Rodricks, P., Sharebeck, K., Conlon, P.J. and Grabstein, K.H. 1987. Recombinant Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Activates Macrophages to Inhibit *Trypanosoma cruzi* and Release Hydrogen Peroxide: Comparison to Interferon γ . *J. Exp. Med.* **166**: 1734.

- Reed, S.G., Grabstein, K.H., Pihl, D.L. and Morrissey. 1990. Recombinant Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Restores Deficient Immune Responses in Mice with Chronic *Trypanosoma cruzi* Infections. *J. Immunol.* **145**: 1564-1570.

- Reed, S.G., Brownell C.E., Russo, D.M., Silva, J.S., Grabstein, K.H. and Morrissey P.J. 1994. IL-10 Mediates Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Immunol.* **153**: 3135-3140.

- Ribeiro-dos-Santos, R., Pirmez A., Savino, W. 1991. Role of Autoreactive Immunological Mechanisms in Chagasic Carditis. *Res Immunol.* **142**: 134-136.

- Rosenbaum, M.B. 1964. Chagasic Myocardiopathy. *Progt Cardiovasc. Dis.* **7**: 199.

- Saborio, J.L., Wrightsman, R.A., Kazuko, S.G., Granger, B.S. and Manning, J.E. 1990. *T. cruzi*: Identification of a Surface Antigen Restricted to the Parasite. *Exp. Parasitol.* **70**: 411-418.

- Salazar, S.P.M., De Haro, A.I. y Uñibarren, B.T. 1988. Chagas Disease in México. *Parasitol. Today.* **4**: 348-351.

- Santori, F.R., Dorta, M.L., Juliano, L., Juliano, M.A., Da Silveira, J.F., Ruiz, R.C. and Yoshida, N. 1996. Identification of a Domain of *T. cruzi* Metacyclic Trypomastigote Surface Molecule gp 82 Required for Attachment and Invasion of Mammalian Cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **78**:209-216.

- Sato, M.N., Yamashiro-Kanashiro, E.H., Tanji, M.M., Kaneno, R., Higuchi, M.L., Duarte, A.J.S. 1992. CD8+ Cells and Natural Cytotoxic Activity Among Spleen, Blood and Heart Lymphocytes During the Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* Infections in Rats. *Infect Immun.* **60**: 1024-1030.

- Schechter, M and Nogueira, N. 1988. Variations Induced by Different Methodologies in *Trypanosoma cruzi* Surface Antigen Profiles. *Mol. Biochem. Parasitol.* **29**: 37-46.
- Schenkman, S., Díaz, C. and Nussenzweig, V. 1991. Attachment of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes to Receptors at Restricted Cell Surface Domains. *Exp. Parasitol.* **72**: 76-86.
- Schenkman, S., Kurosaki, T., Ravetch, J.V. and Nussenzweig, V. 1992. Evidence for the Participation of the Ssp-3 Antigen in the Invasion of Non-Phagocytic Mammalian Cells by *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* **175**: 1635-1641.
- Schenone, H. y Rojas, A. 1989. Algunos Datos y Observaciones Pragmáticas en Relación a la Epidemiología de la Enfermedad de Chagas. *Bol. Chi. Parasitology.* **44**: 66-86.
- Schmidt, G.D. y Roberts, L.S. 1984. Fundamentos de Parasitología. CECSA. México. 655 pp.
- Schofield, C. J. 1985. Control of Chagas Disease Vectors. *Brit. Med. Bulb.* **41**: 187-194.
- Segura, E.L y Cappa, G.S.M. 1985. Relación Huesped-Parásito en *T. cruzi*. En: Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas. Carvallo, R.V., Rabinovich, J.E. y Tonn, R.J (Eds). Tomo II. Ecol. SNCH. Buenos Aires. Argentina. pp 263-267.
- Silva, J.S., Morrissey, P.J., Grabstein, H., Nohler, K.M., Anderson, D., Reed, S.G. 1992. Interleukin 10 and Interferon Regulation of Experimental *T. cruzi* Infection. *J. Exp. Med.* **175**: 169-174.
- Silva, J.S., Aliberti, J.C., Martins, G.A., Souza, M.A., Souto, J.T. and Padua, M.A. 1998. The Role of IL-12 In Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**: 111-115.
- Sleight, M.A. 1989. Protozoa and Other Protists. Cambridge University Press. New York. 342pp.
- Snary, D. and Hudson, L. 1979. *Trypanosoma cruzi* Cell Surface Proteins: Identification of One Major Glycoprotein. *FEBS. Lett.* **100**: 166-170.
- Snary, D. 1980. *Trypanosoma cruzi*: Antigenic Invariance of the Cell Surface Glycoprotein. *Exp. Parasitol.* **49**: 68-77.
- Snary, D; Flint, J.E; Wood, J.N; Scott, M.T; Chapman, M.D; Dodd, J; Jessell, T.M. and Miles, M.A. 1983. A monoclonal Antibody with Specificity for *Trypanosoma cruzi*, Central and Peripheral Neurones and Glia. *Clin. Exp. Immunol.* **54**: 617.
- Snary, D. 1985. The Cell Surface of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Top. Microbiol. Immuno.* **117**: 75-92.

- Spinella, S., Liegeard, P. and Hontebeyrie-Joskowicz, M. 1992. *T. cruzi*: Predominance of IgG2a in Nonspecific Humoral Response During Experimental Chagas' Disease. *Exp. Parasitol.* **74**: 46-56.
- Stahl, D., Wilkeman, T.E., Diment, S. and Shepherd, V.L. 1984. Mannose-Specific Oligosaccharide Recognition by Mononuclear Phagocytes. *Biol. Cell.* **51**: 215-218.
- Szein, M.B., Cuna, W.R. y Kierszenbaum, F. 1990. *Trypanosoma cruzi*. Inhibits the Expression of CD3, CD4, CD8 and IL-2R by Mitogen-Activated Helper and Cytotoxic Human Lymphocytes. *J. Immunol.* **144**: 3558-3562.
- Sun, J., Tarleton, R.L. 1993. Predominance of CD8+ T lymphocytes in the Inflammatory Lesions of Mice with Acute *Trypanosoma cruzi* Infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48**: 161-169.
- Szein, M.B. and Kierszenbaum, F. 1992. Suppression by *Trypanosoma cruzi* of T-Cell Receptor Expression by Activated Human Lymphocytes. *Immunology.* **77**: 277-283.
- Takle, G.B. and Snary, D. 1993. South American Trypanosomiasis (Chagas' disease). En: Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections. Warren, K.S (De). Blackwell Scientific Publications. USA. pp 213-236.
- Tarleton, R.L. and Kuhn, R.E. 1984. Restoration of In vitro Human Responses of Spleen Cells from Mice Infected with *T. cruzi* by Supernatants Containing Interleukin 2. *J. Immunol.* **133**: 1570.
- Tarleton, R.L. 1988. Tumour Necrosis Factor (Cachetin) Production During Experimental Chagas' Disease. *Clin. Exp. Immunol.* **73**: 186..
- Tarleton, R.L., Sun, J., Zhang, L. and Postan, M. 1994. Depletion of the T-Cell Subpopulations Results in Exacerbation of Myocarditis and Parasitism in Experimental Chagas' Disease. *Infect. Immun.* **62**: 1820-1829.
- Tay, J., Aguilera, R.L., Castrejón-Velasco, O y Quiroz, G.M. 1984. Parasitología Médica. Francisco Méndez Cervantes. México. 105-127 pp.
- Tay, J., Schenone, H., Sánchez, J. y Robert, L. 1992. Estado Actual de los Conocimientos Sobre la Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Bol. Chil. Parasitol.* **47**: 43-53.
- Ternyck, T., Bleox, C. Gregoire J., Auraneas, S. and Kanellopoulos-Langenium, C. 1990. Comparison Between Autoantibodies Ariseng During *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice and Natural Autoantibodies. *J. Immunol.* **144**: 1504-1511.
- Teixeira, M.M.G. y Yoshida, N. 1986. Stage-Specific Surface Antigens of Metacyclic

Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* Identified by Monoclonal Antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* **18**: 271-282.

- Tibayrec, M., Ward, P., Moya, A. and Ayala, F.J. 1986. Natural Populations of *Trypanosoma cruzi*, the Agent of Chagas Disease, Have a Complex Multiclonal Structure. *Evolution.* **83**: 115-117.
- Tibayrec, M. And Ayala, F.J. 1988. Chagas Disease: Genetical, Taxonomical, and Epidemiological Significance. *Evolution.* **42**: 277-292.
- Torrico, F., Heremans, H., Rivera, M.T., Van Marck, E., Billian, A., Calier, y. 1991. Endogenous IFN- γ is Required for Resistance to Acute *T. cruzi* Infection in Mice. *J. Immunol.* **146**: 3626-3632.
- Towbin, H; Staehelin, T. and Gordon. 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrilamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4350-4354.
- Towbin, H; Rosenfelder, G; Weislander, J; Avila, J.L; Rojas, M; Szarfman, A; Esser, K; Nowack, H, and Timpl, R. 1987. Circulating Antibodies to Mouse Laminin in Chagas' Disease, American Cutaneous Leishmaniasis an Normal Individuals Reconize Terminal Galactosy-(α 1-3)-Galactose Epitopes. *J. Exp. Med.* **166**: 419.
- Trischman, T.M. 1983. Non-Antibody-Mediated Control of Parasitemia in Acute Experimental Chagas Disease. *J. Immunol.* **130**: 1953-1957.
- Velasco-Castrejón, O., Valdespino, J.L., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Guzmán-Bracho, C., Magos, C., Llausas, A., Gutiérrez, G. y Sepúlveda, J. 1992. Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. *Sal. Púb. Méx.* **34**: 186-196.
- Velasco, O., Guzman, E., Cruz, J., López O. y González, F. 1991. La Enfermedad de Chagas. Una revisión Histórica Suscinta y Parcial de lo que Ocurre en México y el Mundo. Publicación Técnica del INDRE Núm 8. México.
- Velmelho, A.B. and Leal, M.M.N. 1994. Sialoglycoconjugates in *T. cruzi*-Host Cell Interaction: Possible Biological Model- A Review. *Mem. Inst Oswaldo Cruz.* **89**: 69-79.
- Villalta, F., Kierszenbaum, F. 1983. Role of Cell Surface Mannose Residues in Host Cell Invasion by *T. cruzi*. *Biochem. Biophys. Acta.* **736**: 39-44.
- Villalta, F., Kierszenbaum, F. 1984. Host Cell Invasion by *T. cruzi*: Role of Cell Surface Galactose Residues. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **119**: 228-22.
- Villalta, F., Kierszenbaum, F. 1985. Role of N-Acetyl-Glucosamine Residues on Host Cells Infection by *T. cruzi*. *Biochem. Biophys. Acta.* **834**: 216-222.

- Wyler, D.J. 1990. Modern Parasite Biology. Freeman. New York. USA. pp 64-78.
- W.H.O. 1986. Research Activities of Scientific Working Group (SWG) on Chagas Disease 1982-1985. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **81**: 179-244.
- Wirth, J.J. and Kierszenbaum, F. 1987. Inhibition of Mammalian Host Cell Infection by Insect-Derived, Metacyclic Forms of *T. cruzi* Antibodies. *International Journal for Parasitology*. **17**: 841-845.
- Woodward, M.P., Young, W.W. Jr. and Bloodgood, R.A. 1985. Detection of Monoclonal Antibodies Specific for Carbohydrate Epitopes Using Periodate Oxidation. *J. Immunol. Methods*. **78**:143-153.
- Yoshida, N., Mortara, R.A., Araguth, M.F., González, J.C. and Russo, M. 1989. Metacyclic Neutralizing Effect of Monoclonal Antibody 10D8 Directed to the 35 and 50 Kilodalton Surface Glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* **57**: 1663-1667.
- Yoshida, N., Blanco, S.A., Araguth, M.F., Russo, M. and González, J. 1990. The Stage-Specific 90-Kilodalton Surface Antigen of Metacyclic Tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem.* **39**: 39-46.
- Yoshida, N., Araya, J.E., Da Silveira, J.F. and Giorgio, S. 1993. *Trypanosoma cruzi*: Antibody Production and T Cell Response Induced by Stage-Specific Glycoproteins Purified from Metacyclic Trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* **77**: 405-413.
- Yoshida, N., Dorta, M.L., Ferreira, A.T., Oshiro M.E.M., Mortara, R.A., Acosta-Serrano, A. and Favoreto Jr, S. 1997. Removal of Sialic Acid from Mucin-Like Surface Molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic Trypomastigotes Enhances Parasite-Host Cell Interaction. *Molec. Biochem. Parasitol.* **84**: 57-67.
- Zavala-Castro, J.E., Velasco-Castrejón, O. and Hernández, R. 1992. Molecular Characterization of Mexican Stock of *Trypanosoma cruzi* Using Total DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**: 201-209.
- Zenian, A., Kierszenbaum, F. 1983. Inhibition of Macrophage-*T. cruzi* Interaction by Concanavalina A and Differential Binding of Bloodstream and Culture Forms to the Macrophage Surface. *J. Parasitol.* **68**: 408-415.
- Zhang, L. and Tarleton R.L. 1996. Characterization of Cytokine Production in Murine *Trypanosoma cruzi* Infection by *In situ* Immunocytochemistry: Lack of Association Between Susceptibility and Type 2 Cytokine Production. *Eur. J. Immunol.* **26**: 102-109.
- Zingales, B. y Colli, W. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with Host Cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **117**: 129-1

APÉNDICE TEÓRICO I

Prevalencia e Incidencia de la enfermedad de Chagas.

Los países endémicos para la enfermedad de Chagas, se muestran a continuación:

Argentina. Todas las provincias del noreste son endémicas, principalmente Chaco, Santiago del Estero, Salta y Jujui. *T. infestan* es prácticamente el único vector, presentándose en más del 55% del territorio nacional. Más de dos millones de individuos están infectados con *T. cruzi* y de ellos, del 20 al 30% presentan manifestaciones clínicas, especialmente cardiopatías. Las alteraciones digestivas se presentan en bajas proporciones. La tasa de incidencia es alta, probablemente alrededor de 50 000 nuevos casos al año. El número de casos anuales disminuyó, después que se implementó a nivel nacional el programa de control de vectores a nivel nacional.

Bolivia. Bolivia es probablemente el país más endémico, están afectados siete de nueve departamentos, comprendiendo un área endémica de aproximadamente 1, 000 000 km². *T. infestan* es el principal vector, siguiéndole *T. sordida*. De 500, 000 individuos infectados, más del 25% presentaron cardiopatía y del 5 al 10% presentaron alteraciones digestivas (principalmente megacolon). La incidencia es muy alta, reportándose 20, 000 nuevos casos al año. En algunas provincias, se han iniciado programas de control de los vectores, tales como Cochabamba, Tupiza y Tarija.

Brasil. El área endémica comprende más de 3,500,000 km², abarcando 17 estados y 2, 400 municipios situados al noreste, sureste, sur y las regiones centrales del oeste. Cerca de 5,000,000 individuos están infectados, estimándose 20,000 nuevos casos al año. *T. infestan* es el principal vector en el país, especialmente en el sudeste y las regiones central-oeste. *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* y *Rhodnius nasutus* son otros vectores, que se dispersan en la región noreste. Estas especies fueron drásticamente

afectadas por el programa de control del vector efectuado a nivel nacional, erradicándose cerca del 85% de su área original de distribución. La cardiopatía crónica que afecta de entre el 20 y el 30% de la gente chagásica, y las alteraciones digestivas que son prevalentes en más del 10% de las personas, parecen ser más severas en la región central que en los estados del sudeste. Se realizó un programa de control del vector que cubrió todas las áreas endémicas, hasta 1988. Por esta instancia, la serología positiva entre niños de edad escolar disminuyó de 25% a casi el 0% en varias áreas de Sao Paulo y Minas Gerais entre 1978 y 1989.

Chile. La mitad del país (la mayoría de la parte noreste) es endémica para la enfermedad de Chagas, abarcando 350,000 km². Se estima que la prevalencia es de 370,000 casos, con aproximadamente 8,800 nuevos casos al año. El principal vector es *T. infestans*. Las alteraciones cardíacas y digestivas son detectadas en Chile, pero aparentemente son menos frecuentes que en los países vecinos.

Colombia. Las áreas estudiadas tienen las más altas incidencias, se sitúan en el Valle del Río Magdalena, en la región este (Macarena) y en la cuenca del Río Catacumbo, con una población de tres millones en riesgo de infección, y una prevalencia estimada de 900,000 individuos infectados y una tasa de incidencia en el país que se estima en 24,000 nuevos casos al año. El principal vector es *R. prolixus* y *T. dimidiata*. En el Departamento de Santander, la cardiopatía chagásica prevaleció en 9% de los individuos infectados.

Ecuador. Las tasas de prevalencia más altas se presentaron en Guayaquil y las regiones costeras, en donde existe alrededor del 11% de seropositividad en la población general. Se estima que la incidencia es de 930 nuevos casos al año. *T. dimidiata* y *R. Prolixus*, son los principales vectores domiciliarios, y *R. ecuadoriensis* es la segunda especie vectora.

Guyana Francesa, Guyana y Suriname. La enfermedad de Chagas parece tener poca importancia en estos países, pues pocos vectores salvajes y reservorios infectados se han reportado. Las tasas de incidencia y los casos de infección humana son aislados. El

principal vector es *R. Prolixus*. Se estima que la incidencia podría enriquecerse a 29,300 y 160 nuevos casos al año para la Guayana Francesa, Guyana y Suriname, respectivamente. No hay datos clínicos disponibles.

Paraguay. *T. infestans* es el principal vector, presentándose en la mayoría de los países. La prevalencia se estima en un 16% de la población, con una tasa de incidencia de cerca de 14,000 nuevos casos al año. La tasa de mortalidad no esta disponible, y el programa de control del vector se realizará próximamente.

Perú. El área endémica esta situada en la parte central-sudeste del país, donde la tasa de prevalencia varía de 5.7% al 12% (Departamentos de Arequina, Montegua y Tacha). La población en riesgo es de aproximadamente 6.7 millones de habitantes, mientras que la incidencia se estima en 19,000 nuevos casos al año. *T. infestans*, es el principal vector en las regiones endémicas del sureste. En el norte del país, *Panstrongylus lingnarius* es una especie selvática que eventualmente invade habitaciones del hombre. Los datos clínicos de la enfermedad no se encuentran disponibles (Citado de Pinto, 1992).

Uruguay. Tiene un área endémica de 125,000 km², la cual representa el 67% del país, principalmente en las regiones noreste y noroeste. Cerca de 130,000 individuos están infectados, y la tasa de incidencia se estima en 700 nuevos casos al año. *T. infestans* es el principal vector. Más del 20% de los individuos infectados presentan cardiopatía crónica. Las alteraciones digestivas están presentes, pero su número no se sabe.

Venezuela. El principal vector es *R. prolixus* y *T. maculata* es la segunda especie vectora. El área endémica comprende 700,000 Km² en la región no-amazónica, con 12,5 millones de gente en riesgo de infectarse, 1,2 millones de personas infectadas por *T. cruzi* y una incidencia estimada en 27 000 nuevos casos al año. Cerca del 20% de la población adulta infectada presenta enfermedad del corazón crónica, pero las alteraciones digestivas no son detectadas en el país. Durante los últimos 25 años, Venezuela llevó a cabo un programa nacional en contra del vector, consistiendo en el mejoramiento de las casas

(400,000 casas rurales construidas) y esparciendo insecticidas. El índice de infestación en las casas disminuyó de 17.9% a 5% y el índice de infección de triatóminos por *T. cruzi* disminuyó del 11.5% al 2.5%.

Costa Rica. El principal vector es *T. dimidiata*, con la más alta tasa de infestación en el plano central del país (34%) con una tasa de infestación natural por *T. cruzi* de más del 30%. Cerca de 130,000 personas están infectadas y las tasas de incidencia se estima en 3,600 nuevos casos al año. En algunos enfermos se ha presentado cardiopatía chagásica y las alteraciones digestivas son escasas.

Guatemala. La mitad de la población esta en riesgo, 730,000 individuos están infectados por *T. cruzi* y la tasa de incidencia anual podría ganar 29,000 casos al año. *T. dimidiata* es el principal vector, con una tasa de infestación de las casas del 34% (Distrito de Chiquimula). *R. prolixus* puede también ser detectado en habitaciones rurales. Recientes datos clínicos no se han reportado.

Honduras. Los mismos vectores que se reportan en Guatemala son encontrados en Honduras, con similar infestación y tasas de infección. El área endémica comprende las regiones del oeste, este y sureste del país, con 47% de la población en riesgo de infectarse con *T. cruzi*. Se estiman 300,00 individuos chagásicos y una incidencia de 11,000 nuevos casos al año. La cardiopatía chagásica es detectada frecuentemente en los hospitales de Tegucigalpa. Las alteraciones digestivas no se han reportado.

Panamá. Cerca de 900,000 personas están bajo riesgo de infectarse en casi la mitad del país y principalmente en la zona central (Chorrera). Se estima que más de 200,000 individuos son chagásicos y la incidencia es de 5,800 nuevos casos al año. Parece que algunos enfermos presentan alteraciones del corazón, mientras que las alteraciones digestivas no se han detectado. Los vectores pueden ser capturados en varias provincias, de las cuales *T. dimidiata* se ha detectado en 16.42% de las casas, con una tasa de infección con *T. cruzi* del 3.1% (Gualaca) y *R. pallecens* tiene una tasa de infestación del 3.2% y una

tasa de infección por *T. cruzi* del 10.6%.

México. Más de 1,300 000 personas están infectadas, con una tasa de incidencia de 2,400 nuevos casos. *T. longipennis*, *T. dimidiata*, *T. phyllosoma*, *T. pallidipennis*, *T. picturara*, *T. rubida* y *R. prolixus* son los principales vectores (particularmente los tres primeros). Estos pueden encontrarse a lo largo de la costa del Pacífico y en la parte sur y central del país. Las tasas de prevalencia van del 3 al 21% en poblaciones rurales y la incidencia es de 39,000 nuevos casos al año. La cardiopatía chagásica ha sido reconocida en la ciudad de México y en el estado de Jalisco, así como casos esporádicos de alteraciones cardíacas.

Otros países de América. En Cuba y Jamaica, no se han detectado humanos con enfermedad de Chagas autóctonos, pero sí se han encontrado triatomas (*T. bruneri*, *T. obscura*, *T. flavida*, *Bolboderia sabrosa*) y mamíferos salvajes infectados. En Belice, *T. dimidiata* es el vector domiciliario principal. Las tasas de prevalencia humana fueron del 2.7% en áreas rurales. En el Salvador, de entre el 30 al 80% de las casas están infestadas con *T. dimidiata*, con una tasa de infección natural del 25%. Se estima que existen 300,000 individuos chagásicos. En Nicaragua, *T. dimidiata* y *R. prolixus* se detectaron a nivel doméstico, distribuyéndose principalmente a lo largo de la Costa del Pacífico. Aproximadamente, 60,000 personas están infectadas. En Estados Unidos se han reportado tres casos humanos autóctonos, vectores salvajes (*T. protracta*, *T. neolomae*, *T. rubida*, *T. recurva*, *T. sanguisuga*, etc.) y reservorios selváticos infectados (*Urocyon cythereoargenteus*, *Mephitis mephitis*). En este país, existe una inmigración intensa de personas de América Latina, lo cual incrementa el riesgo de contraer la infección y la enfermedad de Chagas a través de la transfusión sanguínea (Citado de Pinto, 1992).

APÉNDICE TEÓRICO II

Anticuerpos Monoclonales.

El desarrollo de la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales fue importante para entender problemas biológicos. La combinación del núcleo de células normales productoras de anticuerpos con su contra parte, células malignas, fue realizada por Köller y Milstein (1975), con ello se logró analizar y purificar moléculas individuales dentro de una enorme y compleja mezcla contenida en el material biológico. Estos investigadores fueron galardonados en 1984 con el Premio Nobel de Fisiología y medicina, debido al desarrollo de dicha técnica.

Es importante apreciar que el monumental descubrimiento de Köller y Milstein fue la culminación de otros descubrimientos llevados a cabo por diferentes investigadores. De importancia particular fue: la comprobación de la teoría de la selección clonal en donde Burnet (1957) proponía que los linfocitos presentaban en su superficie receptores específicos para un antígeno determinado, que conducía a la proliferación y diferenciación de clonas que secretaban anticuerpos de la misma especificidad que el receptor (Nossal y Lederberg, 1958), el desarrollo de la técnica de fusión celular (Okada, 1962; Littlefield, 1964), la inducción artificial de plasmocitomas (Potter y Boyce, 1962), y su adaptación a crecer en cultivos de tejido (Horibata y Harris, 1970).

De esta manera los anticuerpos monoclonales se produjeron a partir de una célula que resultó de la fusión de células secretoras de anticuerpos (obtenidas de ratones inmunizados) y de células inmortales (mielomas). La fusión de las membranas celulares de ambas células, se realizó al tratar las células con el virus Sendai o con concentraciones altas de polietileno glicol (PEG), resultando con ello células multinucleadas (heterocariontas). Al dividirse estas células, los núcleos de los heterocariontes se fusionaron, y las células hijas presentaron más o menos la misma cantidad de material genético. Las células híbridas no son genéticamente estables, y hay una fuerte tendencia a perder cromosomas. Esta tendencia no es completamente al azar, depende de la especie y del tipo celular individual

con que se trabaje (Goding, 1986). Las células híbridas resultantes fueron llamadas hibridomas, fusión A-B, y para aislar éstas de otras fusiones que se pudieran presentar como A-A, B-B o de los mielomas sin fusionar, fue necesario contar con un método de selección, el cual consistió en lo siguiente: los mielomas presentan una mutación en la enzima de la ruta alterna "salvaje" de la biosíntesis de purinas, el gen de la hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). Tomando en cuenta esta característica, se bloqueó la vía principal "de novo" de biosíntesis de guanosina por un antagonista del ácido fólico, la aminopterina y se obligó a utilizar la vía alterna de síntesis de nucleótidos, en donde los metabolitos hipoxantina o guanina son convertidos a guanosina monofosfatada mediante la enzima HGPRT. Las células carentes de HGPRT mueren en un medio que contenga hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), debido a que tanto la vía principal como la alterna están bloqueadas. Los hibridomas pueden crecer en el medio HAT, ya que la deficiencia de HGPRT en los mielomas se ve compensada con la presencia de HGPRT en las células productoras de anticuerpos (células B), sintetizando nucleótidos a través de la vía alterna. La ruta principal de síntesis de nucleótidos en los hibridomas se restablece al suprimir la aminopterina del medio. La hipoxantina y la timina, se agregan debido a que la síntesis de purinas y pirimidinas se bloquea por la aminopterina (Littlefield, 1964).

APÉNDICE EXPERIMENTAL I.

Medio de cultivo para el crecimiento de epimastigotes.

Medio LIT.

Composición:

Cloruro de Sodio (NaCl)	4.0 g
Cloruro de Potasio (KCl)	0.4 g
Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ HPO ₄)	8.0 g
Glucosa (o dextrosa)	2.0 g
Triptosa (DIFCO, núm de cat. 0124-01-0)	5.0 g
Infusión de Caldo de Hígado (DIFCO, núm de cat. 0269-17-7)	5.0 g
Hemina* (SIGMA, núm de cat. H-2250)	0.025 g
Suero Fetal de Bovino (GIBCO, núm de cat. 200-614A)	100 ml

* Se pesan 0.25 g de hemina y se disuelven en 5 ml de trietanol amina (SIGMA, num de cat. T-1377). Esta solución se mantiene en oscuridad a 4° C.

Modo de preparación:

Todos los componentes del medio, excepto el SFB y la hemina se disuelven en 1000 ml de agua bidestilada, ajustando el pH a 7.2. Se esteriliza en autoclave a 120 °C y con presión de 1 atmósfera por 20 min. El medio se somete a una prueba de esterilidad, dejándose a temperatura ambiente y en oscuridad durante tres días. Finalizando la prueba de esterilidad, el medio se complementa con 50 µl de hemina por cada 100 ml de medio a complementar (quedando a una concentración de 25 µg de hemina/ml) y con 10 % de SFB inactivado. Previo a su uso se realiza la misma prueba de esterilidad ya mencionada.

APÉNDICE EXPERIMENTAL II.

Preparación de soluciones.

a) Soluciones utilizados en la producción de anticuerpos monoclonales.

a.1. Polietilenglicol al 41% (PEG. SERVA)). Pesar 3 g de PEG y disolverlos en 4.2 ml de medio D-MEM (GIBCO) a 56° C. Esta solución se esteriliza por filtración, empleando una membrana de 0.22 μm .

a.2. Hipoxantina, timidina (HT. SIGMA) 100 X. Preparar una solución madre de hipoxantina 10 mM y de timidina 1.6 mM. Para ésto, disolver 0.136 g de hipoxantina y 0.038 g de timidina en agua bidestilada y aforar a 100 ml. Si los reactivos no se disuelven completamente, calentar a 70 ó 80°C. La solución se esteriliza a través de un filtro de 0.22 μm .

a.3. Aminopterina (A. SIGMA) 100X. Preparar una solución madre 0.04 mM. Para ésto, disolver 0.00176 g de aminopterina en agua bidestilada y aforar a 100 ml. La solución se esteriliza por filtración a través de un filtro de 0.22 μm .

Las soluciones HT y A, se usaron para preparar el medio HAT y HT.

b) Soluciones amortiguadoras.

b.1. PBS, pH 7.2.

Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.36 g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	1.10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	9.0 g

b.2. PSG, pH 7.5

Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.78 g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	13.48 g
Cloruro de sodio (NaCl)	4.25 g
Glucosa	5.0 g

Los reactivos se disuelven en 900 ml de agua destilada, se ajusta el pH y se afora con 1000 ml de agua destilada.

APÉNDICE EXPERIMENTAL III.

a) Reactivos para ELISA.

a.1. Solución amortiguadora de carbonatos.

Na_2CO_3	0.59 g
NaHCO_3	0.293 g
NaN_3	0.02 g

a.2. Albúmina al 1%-PBS.

Albúmina 1 g,
 aforar a 100ml con PBS pH 7.2

a.3. Tween 20 al 0.05%-PBS.

Tween 20 50 μl ,
 disolver en 100 ml de PBS.

a.4. Sustrato OPD.

OPD	0.004 g
Agua destilada	5 ml
Amortiguador citrato-fosfato a pH 5 [ác. cítrico ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, H_2O) 0.1 M y fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 0.2 M]	
	5 ml
H_2O_2	0.004 μl

a.5. Solución para detener la reacción.

H_2SO_4 (2.5N) 3.3 ml
 Aforar con 50 ml de agua destilada.

APÉNDICE IV.**a) Preparación de soluciones para purificar anticuerpos.****a.1. Purificación Ig G2a.****a.1.1. Solución de equilibrio.**

Solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.14 M, pH 8.

Na₂HPO₄ anhidro 17.03 g

NaH₂PO₄ H₂O 2.75 g

a.1.2. Solución de elución.

Glicina 0.2M 15.04 g

pH 2.8

a.2. Purificación Ig G1.**a.2.1. Solución de equilibrio.**

Tris-Base 0.1M 12.11 g

NaCl 0.2 M 11.68 g

pH 8.2

a.2.2. Solución de elución.

Glicina 0.2M 15.04 g

pH 2.8.

a.3. Purificación Ig M.**a.3.1. Solución de equilibrio.**

Solución amortiguadora de fosfato de sodio (PB) 0.01 M, pH 7.2.

Na ₂ HPO ₄ anhidro	0.708 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.688 g
NaCl (0.5 M)	29.22 g

a.3.2. Solución de elución.

Glicina 0.1M	7.50 g
NaCl 0.15M	8.76 g
pH	2.4

Todos los reactivos se disuelven y aforan con 1000 ml de agua destilada.

a.4. Solución neutralizante.

Tris 1 M, pH 8.2	60.5 g
------------------	--------

Disolver y aforar en 200 ml de agua destilada.

APÉNDICE EXPERIMENTAL V.

a) Electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida.

La separación de proteínas de extractos de *T. cruzi* y otros parásitos; así como de sobrenadantes y anticuerpos, se realizó en una cámara Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad). Las proteínas inmunoprecipitadas, se corrieron en una cámara grande (Bio-Rad).

Preparación de geles:	chicos (5.5 X 8 cm)		grandes (10 X 15.6 cm)
	10%	12%	10%.
Acrilamida al 30%-bisacrilamida al 0.8%	1.66 ml	2.00 ml	7.50 ml
4X de Tris-HCl 1.5 M-SDS 0.4%, pH 8.8	1.25 ml	1.25 ml	5.62 ml
Agua bidestilada	2.08 ml	1.75 ml	9.37 ml

Estas, se agregan a un kitasato de 25 ml y se degasifican al vacío, manteniéndose en agitación constante por 10 min; enseguida se agregan los siguientes reactivos:

Persulfato de Amonio al 10% (100 mg/	0.016 ml	0.075 ml
TEMED	0.003 ml	0.015 ml

Inmediatamente se agrega la solución entre los cristales de la cámara y se deja polimerizar.

a.2. Gel concentrador al 4%.

Acrilamida al 30%-bisacrilamida al 1%	0.210 ml	0.960 ml
4X de Tris-HCl 0.5M-SDS 0.4%, pH 6.8	0.417 ml	1.875 ml
Agua bidestilada	1.017 ml	4.570 ml

Estas se agregan a un kitasato y se degasifican al vacío manteniéndose en agitación por 10 min. Después, se agregan las siguientes soluciones:

Persulfato de amonio al 10%	0.0083 ml	0.0370 ml
TEMED	0.0016 ml	0.0075 ml

Enseguida, esta solución se agrega sobre el gel separador y se pone un peine preparativo de 0.75 mm de ancho para los geles chicos y para el gel grande se pone un peine de 15 carriles. Se deja polimerizar.

Preparación de muestra proteica y condiciones de corrida.

Para correr la muestra proteína, ésta se mezcla con amortiguador de muestra con o sin mercaptoetanol dependiendo el caso, proporción 1:1. Después, la muestra se hierve por 5 min y se agrega al carril del gel concentrador, junto con los marcadores preteñidos de peso molecular (BIO-RAD). Enseguida se agrega el amortiguador de electroforesis. La separación de proteínas se realiza a 200 volts por 45 min aproximadamente. Una vez que concluye la corrida, se fija el gel por 1h con solución fijadora y después se tinte con azul de Coomasie por 1h. Finalmente, se agrega solución desteñidora hasta visualizar las bandas proteicas.

a. 3. Soluciones para efectuar la electroforesis y tinción de geles.**a.3.1. Amortiguador de muestra.**

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

a.3.2. Amortiguador de electroforesis.

Tris-HCl	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.1%

a.3.3. Solución Fijadora.

Isopropanol	50%
Ácido acético	7%

a.3.4. Colorante Azul de Coomasie.

Metanol	50%
Acido acético	10%
Azul de Coomasie	0.05%

a.3.5. Solución desteñidora.

Metanol	20%
Acido acético	7%

Todas las soluciones se disuelven con agua bidestilada.

b) Transferencia proteica a papel de nitrocelulosa.

Para efectuar la prueba de Inmunoblot (o Western blot), se inmovilizan las proteínas en un papel de nitrocelulosa. Esto se realiza separando las proteínas mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida, como ya se explicó. Después, el gel, un par de esponjas, un par de hojas de papel filtro y un pedazo de papel de nitrocelulosa de 6 X 8 cm, se humedecen con amortiguador de transferencia por 10 min. Transcurrido este periodo de tiempo, los implementos se colocan en un cassette en forma de emparedado. En uno de los extremos se pone una esponja, enseguida un papel filtro, luego el gel con las proteínas, siguiendole el papel de nitrocelulosa y un papel filtro. Finalmente se pone una esponja y se cierra el cassette. La colocación de todos los implementos se hace evitando que se formen burbujas en el papel de nitrocelulosa, ya que no habría transferencia de las proteínas. El cassette se pone dentro de una cámara Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad, junto con una unidad de enfriamiento y el amortiguador de transferencia en agitación. La transferencia de las proteínas se efectúa del polo (-) donde está el gel, al polo (+) donde está el papel de nitrocelulosa a 100 volts por 1h.

Para comprobar que se han transferido las proteínas, se corta una tira de papel de nitrocelulosa y se tinte con colorante negro amido por 5 min y para visualizar las proteínas se dan varios lavados con solución destefidora.

b.1. Soluciones para realizar la transferencia.

b.1.1. Amortiguador de transferencia.

Trizma base	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20% a pH 8.3

b.1.2. Colorante Amido Negro.

Colorante Negro Amido	0.1%
Isopropanol	25%
Acido acético	10%

b.1.3. Solución desteñidora.

Isopropanol	25%
Acido acético	10%

Todas estas soluciones se disuelven en agua destilada.

APÉNDICE EXPERIMENTAL VI.

Experimentos de infección *in vitro*.

a) Lavado de portaobjetos.

Los portaobjetos se sumergen 18 h en alcohol al 70%. Enseguida, se lavan 10 veces con agua corriente, después se les agrega HCl 1N y se ponen en agitación por 30 min. Pasado este periodo de tiempo, se lavan 10 veces con agua corriente y se dejan en PBS por 30 min en agitación, luego se vuelve a lavar 10 veces con agua corriente. Finalmente se hace un lavado con agua destilada libre de pirogéno (estéril). Lavados los portaobjetos, cada uno de ellos se colocan dentro de una caja petri de 100 X 15 mm sobre un papel filtro del número 1 y se esteriliza a 120° C, a 1 atmósfera de presión, durante 30 min. Antes de usar los portaobjetos para cultivar las células, se agregan 5 ml de agua destilada sobre el papel filtro.

b) Fijación y tinción de células infectadas.

Las células infectadas que están adheridas en los portaobjetos, primero se dejan secar al aire y enseguida se fijan con unas gotas de metanol. Una vez que se fijaron las células, se tiñen con la técnica de May Grunwald Giemsa, utilizando el colorante azul de metileno (MERCK, núm de cat 4003T09204), por 15 min. El colorante de azul de metileno se prepara diluyendo 10 gotas del colorante (frasco original) en 10 ml agua destilada, pH 7. Teñidas las células, se lavan varias veces con agua destilada, hasta quitar el exceso de colorante.

APÉNDICE EXPERIMENTAL VII.**Preparación de Alsever (anticoagulante).****Composición.**

- Cloruro de Sodio (NaCl)	0.42 g
- Citrato de Sodio dihidratado ($C_6H_5 Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	0.8 g
- Glucosa (o dextrosa)	2.05 g
- Acido cítrico monohidratado ($H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$)	0.055 g

Modo de Preparación.

Todos los componentes se disuelven en 100 ml de agua bidestilada, ajustando el pH a 6.1. La solución se esteriliza por filtración a través de un filtro de 45 μ M.