

11261  
2es  
17-A

CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LA SUPERFICIE DE  
TRYPANOSOMA CRUZI.

Tesis presentada ante los miembros del jurado determinados por la Comisión Académica del Proyecto de Licenciatura, Maestría y Doctorado en Investigación Biomédica Básica de la UACP y P del CCH., para satisfacer en parte los requisitos necesarios para la obtención del Grado de:

Maestría en Ciencias  
(Inmunología)

Por

Cecilia Parra Muñoz

FALLA DE ORIGEN

México, D.F., Junio de 1987.



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.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

La presencia de globulinas séricas sobre la superficie de Trypanosoma cruzi ha sido reportada en varias ocasiones; sin embargo, éste aspecto no ha sido suficientemente estudiado y no se ha determinado si las inmunoglobulinas plasmáticas del huésped observadas en la superficie del parásito representan una interacción Ag-Ac específica o se trata solamente de una adsorción inespecífica por carga o si está mediada por el reconocimiento de un receptor Fc. También el significado biológico de la presencia de las inmunoglobulinas humanas sobre el Trypanosoma cruzi ha sido poco estudiado.

Mediante la técnica de radioinmunoensayo, se encontró que los epimastigotes de T. cruzi fijan IgG humana de manera inespecífica. Adicionalmente se determinó que la presencia de éste componente plasmático sobre la superficie de los epimastigotes del Trypanosoma cruzi no le confiere protección a la lisis mediada por complemento.

Los resultados de lisis en los epimastigotes sugieren que dichos parásitos son capaces de activar la vía alterna del complemento. En presencia de suero fresco extraído de diferentes especies (humano, conejo, cobayo, carnero, ratón) usado como fuente de complemento se determinó que la lisis de los epimastigotes es independiente de la presencia o ausencia de IgG humana normal o de anticuerpos específicos contra el parásito.

## CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN DE LA TESIS	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ABREVIATURAS EMPLEADAS	VI
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	30
RESULTADOS	40
DISCUSION	84
BIBLIOGRAFIA	95

## LISTA DE ABREVIATURAS.

ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
BCG	Bacilo Calmette Gúérin
BSA	Albúmina sérica bovina
Cel. NK	Células asesinas naturales (Natural Killer)
CFA	Células formadoras de anticuerpos
DID	Doble inmunodifusión
EDTA	Ac. etilendiamintetracético
EGTA	Ac. etilenglicoltetracético
IL-1	Interleucina-1 ó Factor activador de linfocitos
IL-2	Interleucina-2 ó Factor de crecimiento de linfocitos
PBS	Buffer salino de fosfatos
RIA	Radioinmunoensayo
RNA	Ac.ribonucleico
SCAF	Factor anticomplemento sérico
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SIRS	Sustancia responsable de la inducción de supresión
SSA	Solución salina amortiguada
SSI	Solución salina isotónica

INTRODUCCION

GENERALIDADES.

- Taxonomía del Trypanosoma cruzi.
- Reino: Animalia
- Subreino: Protozoa
- Clase: Flagelada
- Orden: Cinetoplastidea
- Familia: Trypanosomatidae
- Género: Trypanosoma
- Subgénero: Schizotrypanum
- Especie: Cruzi

HISTORIA.

A principios de este siglo, apareció publicado en las memorias del Instituto Oswaldo Cruz de Brasil, un trabajo realizado por el Dr. Carlos Chagas en el cual reportaba la morfología y el ciclo biológico del Schizotrypanum cruzi, agente causal de una nueva entidad patológica en el hombre que se conoce actualmente como enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana (1).

MORFOLOGIA.

El Trypanosoma cruzi existe en tres formas morfológicamente distintas, que se relacionan con los diferentes ambientes donde se desarrolla (Fig. 1).

Amastigotes : Conocidos también como Leishmanias, son or-

ganismos redondos u ovalados, sin flagelo, de 2 a 5 u de diámetro que tienen núcleo y cinetoplasto. Su forma de multiplicación es intracelular en los mamíferos hospederos. Los amastigotes se diferencian en epimastigotes y posteriormente en tripomastigotes, los cuales son liberados al torrente sanguíneo.

Epimastigotes: Se conocen como Critidia, y son organismos fusiformes, flagelados, de 15 a 20 u de longitud, presentan una membrana corta ondulante que se genera en el cinetoplasto, órgano que se localiza cerca del núcleo el cual es redondo y de localización central. Representan la forma multiplicativa no infectante del Trypanosoma cruzi.

La multiplicación del epimastigote es extracelular cuando se localiza en el tubo digestivo del vector, sin embargo, cuando un individuo ha sido infectado con tripomastigotes el ciclo intracelular de reproducción incluye las formas de amastigotes y epimastigotes. En el vector los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. Ambas formas pueden ser cultivadas in vitro en medios que contienen extractos de bilis de buey y peptona. Los tripomastigotes metacíclicos poseen un núcleo más elongado y el cinetoplasto se localiza ligeramente posterior al núcleo. El tripomastigote metacíclico se aloja en la porción terminal del tracto digestivo del vector (2), y también puede ser cultivado in vitro infectando diferentes líneas celulares establecidas.

Tripomastigotes: Son organismos fusiformes, flagelados de 15 a 20 u de longitud, de cuerpo más alargado que los epimasti-

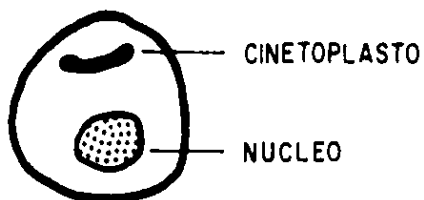
gotes, con núcleo central elongado en forma de huevo y con una membrana ondulante que abarca toda la longitud del cuerpo, esta membrana se genera en el cinetoplasto que se localiza en la parte posterior al núcleo, representan la forma infecciosa no multiplicativa de la especie. Se localiza en la luz del recto de los vectores en forma de tripomastigote metacíclico.

Una vez que los tripomastigotes se localizan en los huéspedes vertebrados, penetran fácilmente a las células donde se van a multiplicar, es decir, a los macrófagos, monocitos, células endoteliales y células musculares. En cuanto el ciclo de multiplicación se ha completado en estas células, se liberan tripomastigotes al torrente sanguíneo de donde pueden volver al vector si es que el reduvido pica o ingiere sangre de un huésped infectado, o bien infectan a nuevas células (3-7). Cuando el tripomastigote es ingerido por el vector, se localiza en las células epiteliales del tracto digestivo del reduvido y ahí se diferencian a amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos (3-10).

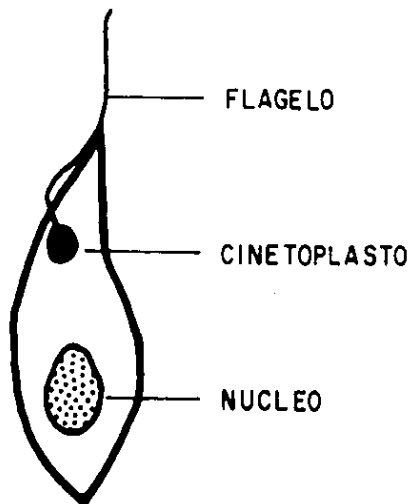


Figura 1

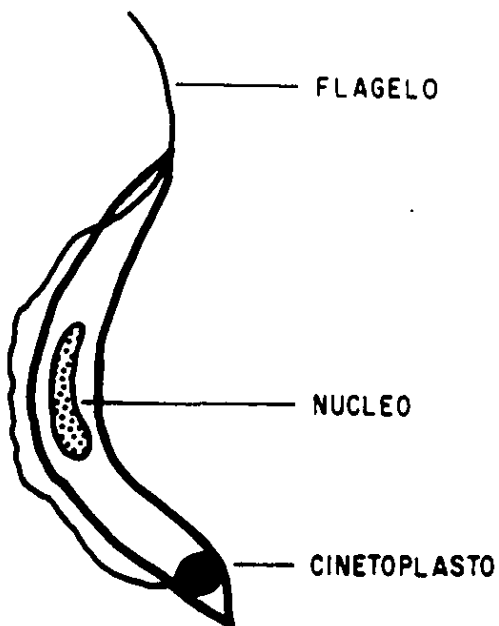
Estadios morfológicos del Trypanosoma cruzi.



**AMASTIGOTE  
(LEISHMANIA)**



**EPIMASTIGOTE  
(CRITHIDIA)**



**TRIPOMASTIGOTE  
(TRIPANOSOMICO)**

## CICLO BIOLÓGICO

El Trypanosoma cruzi es un parásito transmitido por los reduvidos, que son insectos hematófagos de la Familia Triatomidae, conocidos comúnmente como triatomas o "chinchas holiconas". Estos insectos habitan en las madrigueras de los armadillos y en los diferentes tipos de construcciones y puerquerizas, o en lugares donde hay mucha madera. Durante el día permanecen en las grietas y huecos o entre la paja, y por la noche salen a alimentarse (7,8).

El reservorio natural de T. cruzi es el armadillo, en el cual el parásito se mantiene en forma latente pero infectiva; la transmisión de los tripomastigotes o formas infectivas se inicia cuando un triatoma pica y succiona sangre del armadillo, o bien, cuando el triatoma ingiere sangre de un individuo infectado, especialmente en la fase aguda de la enfermedad de Chagas que es cuando hay una mayor cantidad de formas infectivas circulantes en la sangre periférica de los enfermos.

Una vez que el triatoma ha ingerido tripomastigotes, la forma infectante del parásito se localiza en el mesogastrio del insecto reduvido donde los tripomastigotes pasan al estadio de epimastigotes y unos pocos se vuelven amastigotes; en el intestino del triatoma la mayor parte de la población son epimastigotes reproduciéndose activamente (4). Después de 15 a 30 días, durante los cuales el parásito se reproduce en su forma no infectante que son los epimastigotes, se transforman a formas infectantes intermedias denominadas tripomastigotes metacliclicos que se localizan en el recto del insecto. Cuando el tria

toma defeca sobre un huésped vertebrado, los tripomastigotes inician la infección al penetrar por las abrasiones de la piel o por las membranas de las mucosas oral, nasal, rectal, etc. (11) al llegar a la sangre son transportados a diferentes órganos tales como corazón, pulmón, hígado y bazo donde penetran a fibras musculares y endotelios vasculares gracias a que han sido transportados a estos órganos por células mononucleares circulantes que son las células por las cuales los tripomastigotes tienen preferencia al iniciar la infección.

Recientemente se ha determinado que la actividad de neuraminidasa presente en T. cruzi es la responsable del histotropismo observado en las diferentes cepas y clonas aisladas del parásito. Se ha sugerido que los tripomastigotes entran al macrófago a través de receptores específicos sobre la membrana del macrófago para el flagelo del parásito, aunque también el tripomastigote es fagocitado o pinocitado (12,13,198,199). Una vez que el tripomastigote se ha introducido en una célula huésped, pierde su flagelo, se redondea y se convierte en amastigote el cual se empieza a multiplicar formando los llamados pseudoquistes, que no son más que células repletas de amastigotes, estos parásitos se reproducen por fisión binaria en aproximadamente 12 horas dando lugar a nuevos tripomastigotes que son liberados a la circulación cuando la célula en la que se reprodujeron los amastigotes, se destruye. En cultivo de tejidos infectados el número de parásitos al final de un ciclo que normalmente dura 4 ó 5 días, varía de 50 a 300 dependiendo del tamaño de la célula (3,14-17).

## ENFERMEDAD DE CHAGAS

Esta enfermedad constituye uno de los problemas más importantes de salud en Latinoamérica por su amplia distribución y su elevada morbilidad (18). Es una enfermedad crónica, debilitante e incurable que afecta de 12 a 20 millones de individuos (9,17,19 y 27). Se encuentra distribuída en centro y sudamérica extendiéndose hasta México donde afecta principalmente a individuos de poblaciones rurales cuyas viviendas están construídas con materiales rústicos (7,8,28).

En la República Mexicana, hasta 1961 solamente se había informado de 6 casos humanos comprobados anatomopatológicamente, sin embargo, en los siguientes 20 años se han registrado 142 casos más, la mayoría de estos se dieron en regiones que se localizan en la vertiente del Océano Pacífico, desde Zacatecas hasta Chiapas, siendo éste último estado el que más casos ha tenido con un número de 42, seguido de Jalisco con 32 y Oaxaca con 11 (29,30). La prevalencia de la enfermedad es difícil de determinar debido a la escasa información estadística, sin embargo, no deja de considerarse como una entidad clínicamente importante ya que además del relativo elevado número de casos, la enfermedad es prácticamente incurable pues aún no se ha descubierto un agente quimioterapéutico efectivo (4,7,8,35).

En la enfermedad de Chagas, tanto en el hombre como en los animales de experimentación se presentan dos fases importantes que son la fase aguda y la fase crónica. En general, mientras más joven es el individuo infectado más severo es el daño aunque la infección inicial puede ser fatal, la mayoría de la gente sobrevive a la fase aguda (27,33).

Entre los adultos es más común encontrar la fase crónica (3,5,6,15,34,36,37). En la fase aguda de la enfermedad suele aparecer una lesión cutánea nodular en el sitio de la entrada del parásito que se conoce como Chagoma y se caracteriza por inflamación, eritema, edema e infiltrado mononuclear. Es frecuente encontrar una lesión edematosa en el párpado y conjuntivitis cuando la vía de entrada es la conjuntiva ocular (26, 36). Esta fase dura de dos a tres semanas y se caracteriza por un pronunciado aumento en el número de parásitos con localización en sangre, hígado, bazo, corazón, ganglios linfáticos y meninges. El cuadro clínico resultante consiste en fiebre, malestar general, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, miocarditis y en ocasiones meningoencefalitis. Las lesiones cardiacas y meningeas con frecuencia llevan a la muerte (15, 24,26, 28,36,37).

Ocasionalmente la fase aguda se prolonga por varios meses, aunque también hay casos en que esta fase es asintomática (15), el 20% de los individuos infectados eventualmente desarrollan las severas patologías de la enfermedad crónica: cardiomiopatía y neuropatía del tracto digestivo (200).

La fase crónica algunas veces se presenta con el antecedente de la fase aguda, en otros casos cursa clínicamente asintomática y solo se descubre accidentalmente por hallazgos electrocardiográficos secundarios a miocarditis. En algunos pacientes sin embargo, hay un daño severo a órganos principales como corazón, esófago y colon, lo cual con frecuencia lleva a la muerte. Los mecanismos responsables del daño tisular durante la etapa crónica de la enfermedad aún no se han dilu-

cionado (23,28). La fase crónica por lo general se presenta a los diez o más años después de la infección inicial; hay miocarditis progresiva y/o dilatación de visceras huecas así como dificultad para demostrar la presencia de parásitos en la circulación sanguínea (26,34,36,38,39-41).

Durante la infección con Trypanosoma cruzi puede haber un severo daño al sistema nervioso autónomo en el 20-40% de los enfermos y es fatal en el 5-10% de los pacientes clínicamente enfermos (16), hay una degeneración masiva de las células de Purkinje, de las neuronas entéricas, simpáticas y parasimpáticas tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad (26).

Se ha sugerido que el mecanismo de destrucción neuronal y del tejido cardíaco en la enfermedad de Chagas implica ya sea la generación de células T citotóxicas o de anticuerpos dirigidos contra antígenos compartidos entre el parásito y su huésped (26).

## RESPUESTA INMUNOLOGICA EN LA INFECCION POR TRYPANOSOMA CRUZI

Numerosos estudios reportados en la literatura sugieren que la enfermedad de Chagas se acompaña de una respuesta inmunitológica. Los animales de laboratorio inoculados con varias cepas de Trypanosoma cruzi de baja virulencia desarrollan resistencia a un segundo reto antigénico con cepas virulentas del parásito (42,44,167), lo cual indica que son capaces de presentar una respuesta inmune defensiva contra la infección (1,45,52,166).

En un estudio sobre la resistencia con las cepas Perú y Brasil de T. cruzi en cepas singénicas de ratones se encontró que las cepas C3H/an, A, C3H/HeJ, Balb/c, CBA/N y A/J son altamente susceptibles, mientras que las cepas de ratones DBA/2J, C57BL/10, C57BL/6J y SJL/J son relativamente resistentes (25, 27,37,33,54). Dicha resistencia no está ligada al H-2. Sin embargo, Bradley ha determinado que un gene ligado al H-2 ejerce una influencia secundaria en la resistencia a la infección por T. cruzi (21).

El uso de drogas inmunosupresoras tales como ciclofosfamida en animales infectados incrementa la severidad de la enfermedad; esta misma observación se ha hecho en animales timectomizados al nacimiento, en ratones tratados con suero antitímocito y en ratones expuestos a radiaciones. Lo anterior sugiere que la respuesta inmune celular participa en la resistencia a la infección (28, 45, 48-52, 56,57, 166).

Parece haber dos fases en el control de la parasitemia durante la enfermedad de Chagas en el ratón. La primera fase ocurre durante las primeras semanas después de la infección



y el control se consigue a través de un mecanismo dependiente del timo (33). La segunda fase comienza varias semanas después con un incremento en el título de anticuerpos y el control es ejercido a través de un mecanismo mediado por la respuesta inmune humoral; sin embargo, no ha sido posible establecer ninguna correlación entre el título de anticuerpos específicos y el nivel de la parasitemia(58).

La inmunidad mediada por células puede participar en la infección a tres niveles (45).

- 1) Localización del parásito en el sitio de la inoculación.
- 2) Eliminación o inactivación de los parásitos antes de que puedan invadir los tejidos y multiplicarse.
- 3) Participación en la destrucción de células somáticas infectadas con T. cruzi. Se ha observado que las lesiones tisulares están asociadas con infiltrados de células mononucleares en ausencia de parásitos enquistados (36,101,102).

La protección obtenida con células transferidas de animales inmunes (71,72,93) y la resistencia de macrófagos a ser parasitados in vitro (69,71,94-100) apoyan la participación de mecanismos celulares en la resistencia a la infección (71).

Las infecciones causadas por parásitos intracelulares provocan una respuesta de hipersensibilidad tardía en la que los linfocitos derivados de timo son sensibilizados mientras que macrófagos circulantes son activados por los mediadores solubles liberados por los linfocitos (103,105), estos macrófagos son capaces de destruir de modo inespecífico una variedad de antígenos relacionados o no con el parásito (106,107).

Los individuos infectados con T. cruzi presentan reaccio-

nes de hipersensibilidad tardía (25,28,71) y la presencia de un factor inhibitor de la migración de macrófagos (45,48,49, 50-52, 55,57,69,73,92).

La infección aguda en ratones resulta en una severa inmunodepresión y la aparición de síntomas autoinmunes, se sugiere que durante esta fase se liberan muchos antígenos del parásito después de la destrucción de las células infectadas o por lisis inmune del parásito, éstos antígenos pueden unirse a otras células huéspedes y así se hacen susceptibles a la destrucción por células inmunes propias del huésped y que han sido sensibilizadas por la infección con T. cruzi. La liberación crónica de los antígenos del parásito podría originar una respuesta autoinmune. Aproximadamente el 60% de los pacientes son asintomáticos o no presentan procesos autoinmunes, esto sugiere de la necesidad de una predisposición genética para el desarrollo de una respuesta autoinmune que perpetúe el daño al tejido (39). La pérdida de actividad en las células supresoras también se ha implicado en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes (61,62).

Las células T derivadas del bazo de ratones infectados con T. cruzi al ser estimuladas in vitro con Concanavalina A no producen IL-2 ni aún en presencia de IL-1. La adición exógena de IL-2 no restablece la respuesta de dichas células a la IL-2 (60), esto significa que la infección por T. cruzi conduce al huésped a mostrar una alteración muy importante en la inmunorregulación y con el tiempo los individuos son incapaces de controlar sus respuestas (201). Recientemente' Choromansky y Kuhn determinaron que la administración de IL-2

a ratones infectados con T. cruzi revierte el estado de inmunosupresión a los antígenos del parásito (202).

Se ha postulado que la marcada deficiencia inmunológica observada en la fase aguda de la enfermedad de Chagas beneficia al parásito durante su periodo de establecimiento en los tejidos del huésped, varios mecanismos han sido propuestos para explicar la inmunosupresión inducida por T. cruzi.

- a) Inducción de linfocitos T supresores
- b) Disminución en el número de linfocitos
- c) Presencia de una sustancia soluble supresora en el suero de animales e individuos infectados con T. cruzi.
- d) Actividad de macrófagos supresores o de una sustancia soluble supresora derivada de estas células (66).
- e) Alteración directa por el parásito de los linfocitos T y B. La fracción flagelar del parásito induce supresión in vitro de los linfocitos normales cuando ésta presente en cultivos a las concentraciones apropiadas, afecta la respuesta proliferativa de linfocitos T y B (67). También se ha reportado que una fracción antigénica derivada de epimastigotes afecta la respuesta inmune humoral y celular; tal vez interfiriendo con la división celular de linfocitos T y B en alguna etapa del ciclo celular (18).

Se ha demostrado que la respuesta linfoproliferativa mínima o no detectable durante la fase aguda y crónica de la infección por T. cruzi se debe en parte a la ausencia o disminución de células T respondedoras o accesorias y no al papel activo de células T supresoras (68).

Aunque la inmunidad celular tiene una función protectora

evidencias recientes sugieren que la hipersensibilidad tardía puede ser la responsable de alguna o varias de las manifestaciones patológicas de la enfermedad. Santos-Buch y Cols. (102) han encontrado que linfocitos sensibilizados a T. cruzi obtenidos de conejos inmunizados con preparaciones homogenizadas del parásito, son capaces de destruir in vitro, células cardiacas parasitadas o no parasitadas. La destrucción de células no parasitadas por los linfocitos sensibilizados a T. cruzi, pueden ser un modelo in vitro de la miocarditis crónica observada durante la enfermedad de Chagas.

También durante la fase aguda, la resistencia a la infección puede ser muy aumentada con una droga estimuladora de la producción de interferón; se ha sugerido que ésto facilita la actividad de células NK y macrófagos (37). La respuesta de las células NK no es función de la infectividad de los parásitos ya que aún T. cruzi muerto induce la respuesta de células NK (39, 63, 64). Se sabe que el B-interferón inhibe la capacidad de los tripomastigotes para asociarse e infectar a macrófagos peritoneales de ratón o mioblastos de corazón de rata. Se produce interferón relativamente pronto después de la infección con T. cruzi y además, la administración de interferón en animales infectados tiene marcado efecto protector (65).

La presencia de anticuerpos circulantes contra el parásito no solo se ha observado en animales de experimentación (168) sino también en humanos infectados, utilizando técnicas tan diversas como fijación de complemento, inmunofluorescencia directa e indirecta y hemaglutinación pasiva (28, 78, 81). El análisis del suero de pacientes ha demostrado invariablemente la presen

cia de hipergammaglobulinemia (28,60) a expensas de la IgM e IgG, estando elevada la primera en las fases iniciales de la infección y la IgG durante el curso de la misma tal como era de esperarse (82-85). En ratones infectados con T. cruzi aparecen anticuerpos de la clase IgM a los cuatro días de la infección, IgG2 a los 12 días, IgG3 a los 20 días e IgG1 a los 28 días postinfección (86). Esto ocurre al parecer por una activación policlonal (87), a través de la inducción de células T cooperadoras (88). Se ha demostrado una sobreproducción de células B secretoras de IgG y se alcanza un nivel sérico de ésta inmunoglobulina entre 10 y 100 veces más que la normal (91).

También se ha demostrado que algunos protozoarios parásitos son capaces de inducir la activación policlonal de células B, caracterizada por la aparición espontánea de células formadoras de anticuerpos (CFA) y anticuerpos circulantes contra un gran número de antígenos no relacionados con el parásito. Estas observaciones son interesantes en virtud de las alteraciones en la producción de inmunoglobulinas que se han demostrado en algunas enfermedades causadas por protozoarios tales como la leishmaniasis, esquistosomiasis, malarias y tripanosomiasis africana (82-85, 89,90).

Se ha podido comprobar que aquellos animales que se recuperan de la fase aguda de la enfermedad presentan anticuerpos circulantes contra el parásito (58), el suero de pacientes infectados reconocen un amplio espectro de antígenos en los diferentes estadios del T. cruzi (200). Por estudios de transferencia pasiva, se sabe, que el suero o células de bazo de animales infectados proporciona protección (23,69,70); sin embargo, y a

pesar de estos hallazgos el papel protector que pudiesen tener los anticuerpos aún sigue siendo motivo de controversia (1,46,70-72).

Además de los hallazgos anteriores, estudios in vitro indican que en condiciones apropiadas el suero inmune en presencia de complemento puede producir la destrucción del tripomastigote de T. cruzi, ésto sugiere que el complemento está involucrado en la resistencia a la infección (73-75).

El Trypanosoma cruzi libera un factor anticomplemento sérico (SCAF) que descomplementa suero normal de ratones, cobayos y suero humano. Esta descomplementación podría ser un mecanismo por el cual los parásitos evaden la respuesta inmune humoral (76). Este mismo resultado se ha observado en la infección por T. lewisi y T. congolense (77).

Goble en 1962 y Kierszbaum en 1974 mencionaron la participación del sistema reticuloendotelial en la resistencia contra la infección de las formas virulentas de T. cruzi, posiblemente a través de la activación de los macrófagos para destruir al parásito (95,96).

Las formas infectivas del parásito penetran activamente a los macrófagos mientras que los epimastigotes son fagocitados (108). Los macrófagos activados in vivo expuestos a linfocinas in vitro son capaces de destruir a las formas metaclicacas de diferentes cepas de T. cruzi que son resistentes a la ingestión por macrófagos, cuando éstos parásitos son expuestos a tripsina u opsonizados con anticuerpos se promueve su ingestión pero no se modifica su destino intracelular en los macrófagos residentes o activados (109).

También se ha demostrado que T. cruzi infecta y se multiplica en monocitos humanos (110).

En estudios acerca de la interacción entre T. cruzi y los macrófagos murinos normales o activados, las evidencias sugieren que los carbohidratos juegan un papel muy importante en el mecanismo de reconocimiento entre el parásito y su célula huésped, ocurre una interacción del tipo lectina-azúcar donde la glicoproteína de 72 Kd presente sobre la superficie de los tripomastigotes metacíclicos se une a los residuos de N-acetilglucosamina presentes en la superficie de la célula huésped (203); otra de las glicoproteínas que pudiera mediar la interacción entre los macrófagos y el T. cruzi es la fibronectina ya que se ha identificado un receptor para esta glicoproteína sobre la superficie del parásito (204, 205). Una vez que los macrófagos han sido parasitados, se ha observado que a las 2 horas casi todos los tripanosomas se encuentran en las vesículas fagocíticas y que la fusión con los lisosomas ocurre invariablemente (111). Los macrófagos peritoneales residentes son tan capaces como los macrófagos activados con BCG para matar y degradar una mayor proporción de los organismos infectantes durante las primeras 24 horas; sin embargo cuando las células infectadas se examinan a las 72-96 horas se observa que en los macrófagos residentes hay un gran número de tripomastigotes creciendo en el citoplasma y no se observan parásitos en las vesículas lisosomales.

Los tripomastigotes parecen ser capaces de escapar de su estado precario en los lisosomas y se establecen en el citoplasma donde los macrófagos no tienen mecanismos especializa-

dos para matar a sus invasores. En contraste, tres o cuatro días después de la infección, los macrófagos activados con BCG matan y degradan virtualmente a todos los parásitos y solamente se localizan restos celulares (13,71,112).

Recientemente Nogueira y Cohn (69) han sido capaces de activar macrófagos residentes murinos in vitro para matar tripomastigotes, usando productos liberados por linfocitos sensibilizados (113). Aparentemente éstos macrófagos se vuelven capaces de liberar grandes cantidades de peróxido de hidrógeno y de ésta manera logran mantener el efecto microbicida contra T. cruzi (21,114).

Por otra parte, uno de los productos liberados por los macrófagos activados es el factor de necrosis tumoral que es una citocina caracterizada por su capacidad para distinguir y matar selectivamente a células tumorales; aparentemente éste factor también juega un papel importante durante la infección por T. cruzi ya que inhibe la multiplicación intracelular de T. cruzi en los macrófagos (206).

Aunque se sabe que la activación de los macrófagos facilita la muerte de los tripomastigotes, la regulación biológica de éste evento al igual que el mecanismo de activación de los fagocitos, se desconocen. Recientemente se ha postulado que los leucotrienos pueden estimular la captación y muerte de las formas virulentas del T. cruzi por los macrófagos y que el ácido retinoico modula la producción de leucotrienos por las células activadas durante la reacción inflamatoria y que el ácido retinoico induce la diferenciación de los macrófagos del exudado peritoneal y los derivados de la médula ósea



así como los macrófagos de líneas celulares establecidas, muy recientemente Wirth y Kierszenbaum determinaron que el ácido retinoico incrementa la ingestión y muerte de los tripomastigotes por macrófagos peritoneales de ratón durante la infección por T. cruzi (207).

De acuerdo a los hallazgos mencionados anteriormente parece ser que en algunos casos los parásitos pueden destruir a los macrófagos y en algunos otros éstas mismas células pueden participar en la diseminación de la infección (112,115).

Los mecanismos empleados por los parásitos para evadir los procesos inmunes del huésped no se conocen con certeza, Clinton y Cols (116) han demostrado que los ratones infectados con T. cruzi muestran una disminución en su capacidad de producir células formadoras de anticuerpos (117); sin embargo, Ortíz-Ortíz y Cols. (118) han demostrado que en la etapa anterior al estado de inmunosupresión, los macrófagos de los ratones infectados con T. cruzi son capaces de eliminar más eficientemente de la circulación, a partículas coloidales así como a microorganismos de Listeria monocitogenes, lo que sugiere un estado de activación inespecífica del sistema fagocítico mononuclear.

Uno de los aspectos más importantes en la infección experimental por T. cruzi es la inducción de resistencia contra la infección; García en 1972 logró inducir un cierto grado de protección con un antígeno somático de T. lewisi para la infección de T. cruzi en el ratón (53). También Ortíz-Ortíz y Cols han demostrado que los ratones pretratados con BCG son más resistentes a la infección por T. cruzi debido a la activación

inespecífica de macrófagos secundaria a la liberación de mediadores solubles por parte de los linfocitos T activados. En contraste, Hoff (71) demostró que solo se puede lograr protección a T. cruzi con macrófagos activados por T. cruzi y no con macrófagos activados por BCG o Listerias.

En estudios recientes se ha determinado que la actividad protectora contra un reto letal de tripomastigotes está fuertemente asociada con la fracción flagelar de los epimastigotes (119,120), ésta observación ha sido reforzada por Scott y Snary quienes lograron un efecto protector en ratones contra la infección aguda letal vacunandolos con una glicoproteína de 90 Kd aislada de la superficie de cualquiera de los estadios morfológicos de T. cruzi (38).

El ácido desoxirribonucleico (ARN) aislado del bazo de ratas infectadas con T. cruzi induce activación in vitro de linfocitos humanos no sensibilizados para el reconocimiento específico de antígenos de T. cruzi por un mecanismo de hipersensibilidad tardía evaluado mediante un ensayo de inhibición de la migración de leucocitos (25); la administración subcutánea e ARN polisomal a los ratones les confiere una protección importante contra la infección por T. cruzi según se evaluó por el nivel de parasitemia y el porcentaje de sobrevivencia de los ratones retados con la cepa virulenta Y. También los macrófagos peritoneales expuestos al ARN inmune mostraron una mayor resistencia a la infección por T. cruzi (208).

Aun cuando no hay evidencias disponibles sobre el papel biológico de los eosinófilos y neutrófilos en la infección por T. cruzi, y a pesar de que los macrófagos parecen ser los responsables de la multiplicación del parásito; se ha observado que los granulocitos representan un sistema capaz de destruir al parásito y por lo tanto son potencialmente importantes en la patogénesis de la infección (121) ya que forman una barrera para evitar la diseminación del parásito en los huéspedes infectados con T. cruzi. Se ha observado una acumulación de leucocitos neutrófilos y eosinófilos en la reacción inflamatoria que rodea al pseudoquiste del parásito en el corazón y otros órganos durante la etapa aguda de la enfermedad de Chagas en el hombre (122,123). Los leucocitos polimorfonucleares humanos son citotóxicos para epimastigotes y tripomastigotes sensibilizados con suero de pacientes con enfermedad de Chagas en la fase crónica, o con suero de conejos o ratón inmunizados (122, 124). Tanto en los eosinófilos como en los neutrófilos la citotoxicidad esta mediada por un mecanismo dependiente de la presencia de anticuerpos (ADCC) aunque los neutrófilos también realizan actividades citotóxicas independientes de anticuerpo (125,126).

Como ya se ha mencionado anteriormente, durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas, la reacción inflamatoria representa uno de los rasgos principales. Los estudios sobre la interacción de las células que participan en la respuesta inflamatoria y las formas infectantes de T. cruzi son muy importantes no solo para aclarar la contribución de dichas células en los mecanismos de defensa del huésped y en los procesos de

patogenicidad, sino también para definir los mecanismos efec-  
tores disponibles en las células que internalizan tripomasti-  
gotes y amastigotes: monocitos neutrófilos y eosinófilos.

Recientemente se han realizado importantes estudios en la  
búsqueda de factores cuya concentración en los fluidos corpora-  
les se incrementa durante la reacción inflamatoria y que además  
participan en la regulación de funciones celulares importantes  
como son la interacción de las células inflamatorias con Try-  
panosoma cruzi. Villalta y Kierszenbaum han reportado que se in-  
crementa la producción del factor estimulante de colonias para  
granulocitos y macrófagos (SCF) durante la respuesta inflamato-  
ria en la infección por T. cruzi y que éste factor estimula la  
capacidad de los neutrófilos humanos para ingerir y destruir  
amastigotes internalizados. El efecto regulador del SCF humano  
en la función de los neutrófilos es multifacética e incluye las  
reacciones ADCC y aquellas independientes de anticuerpos, el me-  
canismo parece implicar la producción de peróxido de hidrógeno  
el cual también es usado por los neutrófilos no estimulados pa-  
ra llevar a cabo la destrucción de los amastigotes internaliza-  
dos, éste mismo mecanismo ocurre con los macrófagos. El SCF tam-  
bién estimula la diferenciación y crecimiento de las células in-  
flamatorias (209).

Ocurre una respuesta hipoférrica durante la infección por  
T. cruzi probablemente por la transferencia de fierro a los si-  
tios de replicación intracelular del parásito, la depleción ex-  
perimental del fierro intracelular reduce la patogenicidad del  
parásito (59).

## ANTECEDENTES DE LA TESIS

Los mecanismos empleados por los parásitos para evadir los procesos inmunes de defensa del huésped no son conocidos con certeza. Existen parásitos que son capaces de inducir un estado inmune que no beneficia al huésped infectado. La variación antigénica algunas veces asociada con cambios morfológicos, parece ser un mecanismo importante en el retraso o evasión de los procesos de eliminación por reacciones inmunes (127,128). Otro mecanismo de evasión empleado por algunos parásitos es el de inducir un estado de supresión en la respuesta inmune a través de la liberación de factores supresores por las células inmunocompetentes (11, 54, 116, 129, 140, 179).

Muchos autores han sugerido que la captación de proteínas del huésped por parte del parásito ofrece un medio de escape al sistema inmunológico del huésped; éste mecanismo consiste en el enmascaramiento de los antígenos del parásito por las proteínas del huésped (116,141,142).

Las inmunoglobulinas de la clase IgG y otras proteínas plasmáticas del huésped han sido demostradas sobre la superficie de las formas circulantes y de cultivo de muchas de las especies del género Trypanosoma entre las cuales se pueden mencionar T. congolense (143,144); T. brucei gambiense (145, 146); T. brucei rhodesiense (140); T. cruzi (147-149); T. muscui (150) y T. lewisi (151-154). Otras proteínas del huésped tales como albúmina,  $\alpha$ -2 macroglobulina y C3 también han sido detectadas sobre la superficie de éstos protozoarios (144,153,154). Hay reportes contradictorios en cuanto a la presencia de albúmina en el caso particular de T. cruzi (149,156).

En ausencia de estudios acerca de la relación natural huésped - parásito no se conoce bien la manera precisa por la que se lleva a cabo la adsorción de las inmunoglobulinas del huésped por los parásitos protozoarios

Es posible que la presión evolutiva seleccione a los parásitos para que puedan escapar de la respuesta inmune del huésped y al mismo tiempo mantengan un equilibrio de coexistencia con el huésped.

Vickerman en 1972 sugirió que los componentes del huésped sobre la superficie de los Trypanosomas americanos facilita su patogenicidad al enmascarar los determinantes antigénicos. La adsorción no específica de la IgG en los Trypanosomas africanos podría ser una consecuencia de su adaptación inducida a las condiciones del laboratorio ya que las clonas de los tripomastigotes recientemente aisladas acumulan menos IgG de su huésped natural que los que han tenido uno o más pases por los roedores durante largos periodos de tiempo (154).

Puesto que las proteínas plasmáticas del huésped son adquiridas muy pronto por los parásitos ya sea durante el curso de la infección o por exposición in vitro se ha sugerido que la función de los componentes plasmáticos en los parásitos es la de facilitar su adaptación a un nuevo huésped o ambiente (143).

La adsorción de las inmunoglobulinas del huésped por parte del parásito pudiera ser analoga a aquella en la cual las gamma-globulinas autólogas regularmente adsorbidas sobre la superficie de los eritrocitos ayudan a estabilizar la membrana de éstas células (157). En el caso de Trypanosoma lewisi se ha sugerido -- que las inmunoglobulinas del huésped adsorbidas son las respon-

sables de la persistencia de las formas adultas del parásito en la circulación de las ratas infectadas (153). Aunque otra posible explicación es que la adsorción de los componentes plasmáticos del huésped es secundaria a la adaptación del parásito.

También se debe considerar la posibilidad de que la interacción entre el parásito protozoario y los componentes plasmáticos del huésped está dada por la diferencia de carga entre la superficie del parásito y la proteína plasmática. En 1975, Dwyer estableció que la carga neta de la superficie de T. lewisi es negativa y que por lo tanto las proteínas con carga neta positiva a PH fisiológico pudieran unirse de manera no específica a los tripomastigotes (210).

Se ha sugerido que se requiere de las proteínas plasmáticas del huésped homólogo para que se lleve a cabo la adaptación y el establecimiento de los tripomastigotes de un huésped específico a nuevos huéspedes heterólogos (152), y que esto pudiera ser un factor determinante de la especificidad de una especie de Trypanosomas a su huésped.

En 1977, Kloetzel y Deane reportaron diferencias importantes en cuanto a la capacidad de adsorber inmunoglobulinas plasmáticas entre dos cepas de T. cruzi; una cepa altamente virulenta ante la cual los ratones infectados sucumbieron en menos de una semana no adsorbe IgG del huésped, en cambio, una cepa que induce infecciones crónicas solo presenta IgG del huésped en -- la etapa tardía de la infección

No se puede correlacionar necesariamente a la virulencia con la presencia de IgG inespecífica del huésped sobre la superficie de diferentes especies patógenas de Trypanosomas.

Se han demostrado receptores específicos de membrana para el reconocimiento de ciertas proteínas del suero en varios sistemas de células mamíferas así como también para algunos parásitos protozoarios como el Schistosoma mansoni (211), en cuanto a T. cruzi se ha sugerido la presencia de un receptor Fc (155) para la IgG humana sobre la superficie del parásito, pero la demostración definitiva aún no se ha logrado a pesar de su relevancia potencial para entender al menos en parte la evasión inmune que caracteriza a T. cruzi.

Particularmente para algunas de las especies del género -- Trypanosoma incluyendo a T. cruzi aún no se ha determinado si las inmunoglobulinas del huésped localizadas en su superficie representan una interacción específica del tipo antígeno-anticuerpo tal como ha sido sugerido por Krettli y Nussenweig, o bien si se trata de una adsorción específica de éste componente sérico del huésped sobre la superficie del parásito. La orientación de la IgG sobre el T. cruzi pudiera representar un mero accidente de adsorción no específica o bien estar mediada por la unión a un receptor.

En virtud de la evidente importancia de estudiar el tipo de interacción que se establece entre el T. cruzi y las proteínas plasmáticas de su huésped, en ésta tesis se intentó aclarar la posible existencia de un receptor específico para la adsorción de la IgG humana sobre la superficie del parásito.

Como modelo experimental se eligieron las formas de cultivo de T. cruzi ya que por un lado en estudios preliminares (149, 155) se ha determinado que tanto los epimastigotes como los tripomastigotes fijan IgG humana de manera equivalente, y por otro la-



do debido al tipo de experimentos que habrían de ser realizados y sobre todo por la cantidad requerida de parásitos en cada uno de los ensayos, el uso de los epimastigotes resultaba conveniente.

## OBJETIVOS

Uno de los objetivos de éste trabajo fué determinar si la interacción que se establece entre la IgG humana y Trypanosoma cruzi se debe a la presencia de un receptor específico para la proteína plasmática del huésped sobre la superficie del parásito.

También se intentó dilucidar mediante un ensayo de lisis in vitro si la adsorción de IgG plasmática le confiere a Trypanosoma cruzi algún efecto protector por enmascaramiento de sus determinantes antigénicos.

## MATERIAL Y METODOS

Cultivos de Trypanosoma cruzi.- Las formas no infectivas de Trypanosoma cruzi, de la cepa Cocula donada por el Dr. F. Navarrete, Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad Autónoma de Guadalajara; Guadalajara, Jalisco, fueron mantenidas en cultivo hasta su aislamiento.

Los Epimastigotes se dejaron crecer hasta llegar a la fase logarítmica de crecimiento, aproximadamente 5 días, en 50 mls. de medio de Nakamura (162) sin adición exógena de suero, en frascos Erlenmeyer sobre una placa giratoria a 120 rpm que se mantuvo en un cuarto aislado y cuya temperatura se conservó a 28°C. Una vez que los cultivos alcanzaron una densidad de 10-15 X 10<sup>6</sup> epis/ml., se procedió a cosechar los microorganismos por centrifugación a 4°C, 1000 G durante 15 minutos utilizando una centrífuga marca Sorvall. El paquete celular se colectó en 10 mls. de NaCl 0.9% (p/v) y después de resuspender los epimastigotes por agitación manual, se procedió a centrifugar nuevamente bajo las condiciones ya descritas. El proceso de lavado se repitió dos veces más y al término de los mismos se procedió a resuspender los epimastigotes en una solución de NaCl 0.9% que contenía buffer de fosfatos 0.015 M PH 7.2. Una alícuota fué observada a microscopía de contraste de fase donde se detectó únicamente la presencia de epimastigotes (Fig. 1) de los cuales la gran mayoría estaban viables (95%) según el criterio de movilidad.

Tratamiento enzimático de los epimastigotes.- Para este fin volúmenes iguales de una suspensión de 10<sup>8</sup> parásitos/ml. y una

solución de tripsina a  $1\text{mg/ml}$  fueron incubados a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Posteriormente los parásitos fueron lavados por -- centrifugación en medio de RPMI-1640 (Gibco) sin suero durante cinco veces para finalmente ser resuspendidos a  $2 \times 10^6$  parási-  
tos/ml en PBS-BSA 5%.

Purificación de IgG Humana. - La extracción de gammaglobulinas a partir de suero humano se efectuó mediante precipitación de las mismas con sulfato de amonio saturado a una concentración final del 40% (180); el suero que se encontraba bajo agitación continua en baño de hielo se le añadió el sulfato de amonio -- lentamente y después de 30 minutos de agitación se centrifugó la mezcla a 10 000 G durante 15 min. a  $4^\circ\text{C}$ . El precipitado se resuspendió en solución salina isotónica (SSI) PH 7.2 al volumen original al del suero y se repitió la precipitación con -- sulfato de amonio tres veces más, hasta obtener un precipitado de color blanco, el cual se dializó exhaustivamente contra SSA 0.015 M PH 7.2 (cinco cambios de 100 volúmenes cada uno). Después de ajustar la concentración de la muestra a  $1\text{mg/ml}$  se pasaron 10 mls por una columna de Sepharosa-proteína A equilibrada con buffer de fosfatos 0.1 M PH 8.0; la elución de la -- fracción IgG se efectuó con una solución de ácido acético - -- 0.1 M previo lavado de la columna con la solución de equili--- brio. La absorbancia a 280nm de las fracciones obtenidas se leyeron en un espectrofotómetro y después de graficar densidad óptica contra el No. de fracción se unieron todas aquellas que -- conformaron el primer pico de elución de la columna. La pureza de la IgG así obtenida se comprobó por inmunodifusión radial -- en agarosa al 1% contra un anticuerpo anti-IgG humana comer---

cial (Laboratorios Miles) y además por electroforésis en gel de acrilamida al 10% en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol.

Una vez comprobada la pureza en grado satisfactorio se procedió a cuantificar la concentración de proteína por el método de - - Lowry (163).

Obtención de Fragmentos Fab y Fc de IgG Humana.- 100 mg de IgG humana suspendidos en buffer de fosfatos PH 7.2 fueron digeridos con una solución de papaína que contenía EDTA 0.002 M y --- cisteína 0.01 M; a una relación de proteína: enzima de 4:1 p/p- durante 2 horas a 37°C. Después de dializar la inmunoglobulina- digerida contra buffer de fosfatos 0.015 M, se sometió a una -- cromatografía de filtración en Sephadex G- 100 bajo las condi-- ciones experimentales especificadas en la Fig 3, de ésta manera se lograron obtener fragmentos Fc y Fab a los 75-85 mls de volu men de elución (picos IV y V ), la separación de éstos dos -- fragmentos se realizó mediante cromatografía de afinidad en una columna de Sepharosa-proteína A, eluyendo el fragmento Fc con - ácido acético 0.1 M. La pureza de los fragmentos Fc y Fab se -- comprobó mediante electroforésis en gel de poliacrilamida.

Electroforésis en Gel de Acrilamida de la IgG humana y sus Fragmentos Fe y Fab.- La preparación de los geles de acrilami- da al 10% y que contenían SDS fué conforme al sistema de buffers reportado por Laemmli (164). La concentración de las muestras - fué ajustada previamente en un rango de 20 -50 ug y de acuerdo- con las características particulares para cada muestra se les - sometió o no a condiciones de reducción con 2-mercaptoetanol y- fueron hervidas durante 5 minutos antes de efectuar la electro-

foré<sup>s</sup>is. Como marcadores de peso molecular se utilizó un preparado comercial (Bio-Rad). Los geles se tiñieron con azul brillante de Coomasie al 0.06% en una mezcla de ácido acético al 10% en metanol al 30% y se destiñieron con ácido acético al 10%.

Iodinación de Proteínas, - La IgG y los fragmentos Fc y Fab de la misma se marcaron con  $^{125}\text{I}$  utilizando el método de Bolton-Hunter (165). A 5mg de proteína en 200 ul de buffer boratos 0.1 M PH 8.5 se les dejó en contacto con el ester iodinado ( 1 mCi ) y se dejaron reaccionar durante 15 minutos a 4°C, al termino de este tiempo y con el fin de detener la reacción se añadieron 500 ul de una solución de glicina 0.2 M en buffer de boratos 0.1 M PH 8.5 durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente la proteína marcada con iodo se separó del iodo libre por filtración en Sephadex G-25 equilibrada y eluida con buffer de fosfatos 0.015 M PH 7.5.

Generalmente mediante éste procedimiento se logró una actividad específica de aproximadamente 100 000 cpm/ug de proteína.

Obtención de Componentes Subcelulares de Epimastigotes por Centrifugación-diferencial, - Aproximadamente  $10^8$  epimastigotes en 5 ml de PBS 0.015 M PH 7.2 fueron lisados por congelamiento y descongelamiento durante 3 ó 4 veces y el lisado se centrifugó a 650 G durante 10 minutos a 4°C, al precipitado se le denominó fracción No. I; el sobrenadante resultante de ésta primera centrifugación se volvió a centrifugar a 9500 G durante 30 minutos a 4°C; de esta manera se obtuvo el segundo precipitado que se denominó fracción II; el sobrenadante se centrifugó ahora a 85 000 G durante 3 hr. a 4°C; el precipitado colectado se deno-

mino fracción III y al sobrenadante, fracción No. IV.

El contenido subcelular para cada fracción fué checado mediante microscopía electrónica.

Unión de  $^{125}\text{I}$ -IgG a los epimastigotes de T. cruzi. - Estos ensayos se llevaron a cabo en placas de cloruro de polivinilo de 96 pozos con un volumen por pozo de 200 ul. Antes de utilizar las placas para el ensayo los pozos fueron recubiertos con 200 ul de una solución de albúmina sérica bovina al 5% en PBS y se dejaron a temperatura ambiente ó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 hs.

Los epimastigotes fueron resuspendidos en PBS con albúmina sérica bovina al 0.5% para la determinación de los parámetros de unión, la mezcla de reacción contenía un número fijo de epimastigotes (mismo que varió dependiendo del experimento) y diferentes cantidades de  $^{125}\text{I}$ -IgG en 150 ul de PBS que contenía albúmina sérica bovina al 5%. La reacción se dejó incubando por 4 hs a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación moderada y posteriormente la placa que contenía las diferentes mezclas de reacción se lavó tres veces con PBS-BSA al 0.5% centrifugando durante 10 minutos en frío a 1086 G. Al final de los lavados cada pozo se recortó de la placa y se colocaron en tubos de ensayo de 13X100mm para así poder cuantificar la radioactividad de cada pozo en un contador de radiaciones gamma (Beckman Instruments Inc.)

La fijación no específica de la  $^{125}\text{I}$ -IgG a los pozos se -- cuantificó como menos del 5% del total de CPM aplicadas por pozo. La determinación de  $^{125}\text{I}$ -IgG unida a los epimastigotes se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: Actividad específica/ug ÷ CPM de la muestra = a ug de  $^{125}\text{I}$ -IgG unida a los epimastigotes. Para estudiar la inhibición de unión por IgG no radioactiva las

condiciones de los ensayos se seleccionaron de tal manera que la  $^{125}\text{I}$ -IgG y la concentración de epimastigotes, considerando a éstos últimos como sitio receptor, estuvieron cercanas al valor de su constante de asociación, es decir, a una cantidad constante de epimastigotes  $1 \times 10^6$  se agregaron varias cantidades de  $^{125}\text{I}$ -IgG hasta obtener la unión máxima. Una vez determinada -- ésta constante se hicieron pruebas de inhibición utilizando IgG no radioactiva a las concentraciones determinadas con el experimento anterior. Se hicieron dos tipos de pruebas de inhibición. En la primera se incubaron epimastigotes con IgG no radioactiva y posteriormente se agregó la IgG radioactiva; y en la segunda, se incubó la IgG radioactiva con la IgG no marcada radiactivamente y posteriormente se agregaron los epimastigotes.

Obtención de hemolisina contra globulos rojos de carnero.- Se inmunizaron dos conejos por vía intravenosa con una solución de eritrocitos de carnero al 10% en solución salina de acuerdo al siguiente protocolo (222).

tiempo (días)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	22
dosis (ml)	1	1	1	1	1	2	2	2	2	sangrar

El sangrado por punción cardiaca. Se obtuvo suero después de dejar retraer el coagulo a  $4^\circ\text{C}$  centrifugando a 3000 rpm durante - 15 minutos. El suero se alicuotó y se guardó a  $-20^\circ\text{C}$ .

Titulación de hemolisina.- En una serie de 12 tubos que contienen 0.25 ml de PBS se hicieron diluciones con un factor de dos de la hemolisina previamente inactivada por calentamiento a  $56^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Después de homogeneizar cada tubo se añadieron-



0.25 ml de una suspensión de eritrocitos de carnero al 1% en -- PBS y se dejaron incubando durante 1 hora a 37°C seguido de 18- horas a 4°C. La lectura se efectuó considerando como título de hemolisina al inverso de la dilución del último tubo en cuyo -- fondo se observaba una red de aglutinación franca. El título -- así obtenido fue de 1:4160.

Obtención de células mononucleares adherentes de bazo de ratón.-

A ratones Balb/c hembras de 4-6 semanas que fueron sacrificadas por dislocación cervical se les extrajo asépticamente el bazo y se colocó en una caja de Petri que contenía solución salina balanceada. Los esplenocitos se obtuvieron desgarrando el bazo -- con agujas del número 23 seguido de tres lavados con solución -- salina balanceada. Los eritrocitos contaminantes fueron elimina-- dos de la preparación al exponer las células con buffer de li-- sis que contenía cloruro de amonio al 0.85% durante 15 minutos-- a 37°C seguido de dos lavados en solución salina balanceada. -- Una vez obtenida la suspensión de esplenocitos se ajustó la den-- sidad celular a  $2 \times 10^6$  cel/ml y 10 ml de ésta suspensión se colo-- caron en cajas de Petri estériles las cuales se dejaron incubar durante 2 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Al termi-- no de ésta incubación las células no adheridas se removieron -- con pipeta pasteur y las células adherentes se lavaron cuidado-- samente con solución salina balanceada antes de despegarlas con un agitador de hule. La viabilidad de las células adherentes se checó con azul de tripán (viabilidad mayor del 90%) y se ajusta-- ron a una densidad de  $2 \times 10^6$  cel/ml en solución salina balancea-- da.

Técnica de rosetas "EA".- En tubos de ensayo se colocaron 0.25 ml de la suspensión de células adherentes murinas y 0.25 ml de una suspensión de eritrocitos de carnero al 2% sensibilizados con hemolisina en solución salina balanceada; después de centrifugar los tubos a 500 rpm durante 5 minutos, se incubaron a 37°C durante 15 minutos y finalmente se resuspendieron suavemente las células, se colocaron 10 ul de la suspensión celular en un hemocitómetro y se contaron 200 macrófagos.

Los macrófagos con tres o más eritrocitos adheridos se consideraron como rosetas. Los resultados se expresan como porcentaje de macrófagos formando rosetas.

Sensibilización de eritrocitos de carnero con hemolisina.- A 5 ml de una suspensión de eritrocitos al 2% en solución salina balanceada se le añadieron 0.30 ml de hemolisina diluída 1:8320 (título subaglutinante) y se dejó la mezcla incubándose a 37°C durante 30 minutos, al final de la incubación se lavaron los eritrocitos tres veces en solución salina balanceada centrifugando durante 5 minutos en cada lavado y finalmente se resuspendieron al 2% en solución salina balanceada.

Obtención de suero hiperinmune en ratones.- Ratones Balb/c hembras de 8 semanas de edad fueron inoculados semanalmente por vía subcutánea en el área axilar con 0.1 ml de una suspensión de epimastigotes rotos por sonicación, congelamiento y descongelamiento. Cada 100 ul de ésta suspensión contenía 15 ug de proteína. Las inoculaciones se efectuaron hasta que el suero de los animales obtenido de la sangre extraída por punción retroorbital con capilares dió un título de aglutinación a epimastigotes de 1:2040.

Una vez logrado éste título, los animales fueron sangrados a -- blanco y el suero se guardó en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Parte de éste suero hiperinmune fué precipitado con sulfato de amonio a una concentración final del 5% y después de repetir la precipitación 2 veces más, se dializaron las inmunoglobulinas -- contra solución salina y posteriormente se pasaron por una columna de Sepharosa-Proteína A para obtener las IgG (ver sección de purificación de IgG's humanas).

Lisis mediada por complemento.- La fuente de complemento utilizada en éstos experimentos fue suero fresco o conservado a  $-70^{\circ}\text{C}$  de individuos sanos, conejos, cobayos, ratones y carneros.

La fuente de complemento fué absorbida antes de su uso con  $2 \times 10^7$  epimastigotes durante una hora a  $4^{\circ}\text{C}$  en dos ocasiones, -- posteriormente a éste procedimiento se observó que el suero así absorbido ya no aglutinaba a los epimastigotes.

Muestras de 0.2 ml del suero absorbido de las diversas fuentes de complemento fueron mezcladas con 30 ul de una solución 0.005 M de cloruro de magnesio y 0.0015 M de cloruro de calcio; aproximadamente  $5 \times 10^6$  epimastigotes fueron expuestos a la solución anterior durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$  y luego por observación directa al microscopio se calculó el porcentaje de epimastigotes lisados por acción del complemento.

Experimentos similares se realizaron en presencia de suero hiperinmune de ratón anti-epimastigote.

La determinación de la vía del complemento activada se realizó en presencia de agentes quelantes para calcio y magnesio además de una serie de tratamientos fisicoquímicos que se practicaron sobre las diversas fuentes de complemento y que están especifi-

cadavres en cada experimento en particular.

## RESULTADOS

Purificación de la IgG humana y sus fragmentos Fc y Fab.

Como puede verse en las Figuras 2 y 2a, la IgG humana obtenida de la precipitación del suero con sulfato de amonio y que además se incubó en una columna de Sepharosa proteína A, muestra un elevado y satisfactorio grado de pureza según se determinó por electroforésis en gel de poliacrilamida e inmunodifusión radial . en un gel de agarosa al 1% con un anticuerpo comercial anti-IgG humana.

Los fragmentos Fc y Fab obtenidos del digerido de la IgG humana con papaína se purificarón por cromatografía de filtración con Sephadex G-100 ( Fig. 3 ) donde a los 75-85 ml de elución se obtuvo la mezcla de fragmentos Fc + Fab según se determinó por PAGE ( Fig. 4 ); la separación de cada uno de éstos fragmentos se realizó mediante cromatografía de afinidad con una columna de Sepharosa proteína A donde el fragmento Fab se eluyó con buffer de fosfatos 0.1 M a PH=8 durante el lavado de la columna y el fragmento Fc se eluyó con ác. acético 0.1 M ( Fig.5 ).

La pureza de los fragmentos obtenidos después del procedimiento descrito, se confirmó por PAGE comparando los pesos moleculares con una mezcla comercial de proteínas con pesos moleculares conocidos ( Fig. 6 ).

Iodinación de la IgG humana y sus fragmentos Fc y Fab por el método de Bolton-Hunter.

La iodinación de los fragmentos Fc y Fab se realizó de dos maneras para evitar algún posible error en la interpretación de los resultados donde se utilizaron dichas proteínas.

Una manera de obtener los fragmentos marcados radioactivamente consistió en hacer la iodinación de la IgG humana purificada y a partir de ésta obtener los  $^{125}\text{I}$ -Fc y  $^{125}\text{I}$ -Fab luego de someter a la IgG al procedimiento de digestión con papaína seguida de las correspondientes cromatografías tal como se describió en el párrafo anterior. La otra forma consistió en marcar por separado cada uno de los fragmentos así como la IgG humana completa; en éste caso el  $^{125}\text{I}$  libre se separó de la correspondiente proteína marcada mediante una cromatografía de filtración con sephadex G-25 fino tal y como se ejemplifica en las Figs. 7 y 8.

Es conveniente mencionar que los resultados obtenidos en los experimentos donde se emplearon los fragmentos marcados en las diferentes formas descritas, no variaron.

#### Funcionalidad biológica de la $^{125}\text{I}$ -IgG.

Para determinar si la IgG humana marcada radioactivamente aún conservaba su actividad biológica, se ensayó la capacidad de la proteína en éstas condiciones de inhibir la formación de rosetas entre macrófagos murinos y eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina; en la Fig. 9 se muestra que la preincubación de los macrófagos con la  $^{125}\text{I}$ -IgG a distintas concentraciones, inhibe la formación de rosetas de manera idéntica a la observada con la IgG humana no marcada con el isótopo.

#### Unión de la $^{125}\text{I}$ -IgG a los epimastigotes.

Se expusieron diferentes concentraciones de epimastigotes a 25 ug de  $^{125}\text{I}$ -IgG que tenía una actividad específica de 110 232 cpm/ug de proteína, durante 4 h a 29°C, los parásitos se lavaron después exhaustivamente para eliminar la proteína no fijada a los

epimastigotes y posteriormente se determinó la cantidad de radioactividad presente al correspondiente paquete celular en un contador de radiaciones gamma. La Fig. 10 muestra como varía la cantidad de  $^{125}\text{I}$ -IgG unida a los epimastigotes según varía también el número de parásitos.

La Fig. 11 muestra como la temperatura a la cual se lleva a cabo la unión entre los epimastigotes y la  $^{125}\text{I}$ -IgG no altera los resultados.

#### Localización de la $^{125}\text{I}$ -IgG humana sobre los epimastigotes.

Se expusieron  $10^7$  epimastigotes a 2 mg de IgG marcada radioactivamente con una actividad específica de 63 413 cpm/ug de proteína durante 4 h a  $29^\circ\text{C}$ , al término de la incubación los epimastigotes se lavaron exhaustivamente y se lisaron por congelamiento y descongelamiento; el lisado se sometió a un proceso de centrifugación diferencial tal y como se ha descrito en la sección de material y métodos. En tres de las fracciones así obtenidas se determinó la cantidad de marca radioactiva precipitable con ác. tricloroacético y al relacionar estos resultados con la actividad específica de la  $^{125}\text{I}$ -IgG adicionada originalmente, se determinó la cantidad de inmunoglobulina presente en cada fracción subcelular de los epimastigotes; por otro lado, se correlacionaron éstos resultados con las observaciones por microscopía electrónica de las fracciones obtenidas en las mismas condiciones de un lisado de epimastigotes sin marca radioactiva ( Fig. 12 ).

En la tabla I se muestra como la mayor parte de la  $^{125}\text{I}$ -IgG humana se encuentra asociada a la fracción enriquecida en componentes de membrana plasmática, Fracción I.

Cinética de Saturación entre la  $^{125}\text{I}$ -IgG humana y los epimastigotes.

De los resultados anteriores se eligió la concentración de  $10^6$  parásitos para la realización de los siguientes ensayos, así -- pues, cuando se expusieron los parásitos a diversas cantidades de  $^{125}\text{I}$ -IgG determinamos que es posible alcanzar la saturación del sistema con 173 ug de inmunoglobulina. (tabla II y Fig. 13).

Inhibición de la unión de  $^{125}\text{I}$ -IgG con IgG humana no radioactiva a la superficie de los epimastigotes.-

Debido a que había determinado previamente que el sistema de -- unión entre IgG humana y los epimastigotes era saturable, en un ensayo posterior se preincubaron  $10^6$  parásitos con cantidades -- crecientes de IgG humana sin marca radioactiva durante 4 horas a  $4^\circ\text{C}$ , al término de éste tiempo los parásitos se lavaron exhaustivamente y se volvieron a exponer por un periodo igual de -- tiempo a 50 ug de  $^{125}\text{I}$ -IgG equivalente al 30% de la concentración máxima saturante, según describe Cuatrecasas (citado en 181); al final de ésta segunda incubación se volvieron a lavar los -- epimastigotes y la cantidad de radioactividad presente en cada paquete celular se determinó en un contador gamma.

Como se puede observar en la Fig. 14, la preincubación de los -- epimastigotes con IgG no radiocativa aún a muy altas concentraciones (hasta 6 mg) no inhibe más del 7% la unión de  $^{125}\text{I}$ -IgG -- a la superficie de los epimastigotes.

Unión competitiva de  $^{125}\text{I}$ -IgG e IgG humana no marcada radioactivamente a la superficie de los epimastigotes.

Incubando  $10^6$  epimastigotes con 50 ug de  $^{125}\text{I}$ -IgG simultáneamente con cantidades crecientes de IgG humana sin marcar con  $^{125}\text{I}$



en un rango de concentraciones de 1 a 1000 ug; los resultados presentados en la Fig. 15 indican que la unión de  $^{125}\text{I}$ -IgG a la superficie de los epimastigotes no se inhibe; a pesar de que -- con 2 ug de la IgG no radioactiva hubo una inhibición máxima -- del 18% que se repitió con 7.5 ug, el resto de la curva indica -- que aún en presencia de grandes cantidades de IgG fría la cantidad de  $^{125}\text{I}$ -IgG que se une a los epimastigotes no varía.

Unión de los fragmentos Fab y Fc a la superficie de los epimastigotes.

Una vez marcados los fragmentos Fab y Fc con  $^{125}\text{I}$  se determinó mediante un radioinmunoensayo la unión de dichos fragmentos a la superficie de  $10^6$  epimastigotes y se comparó con la unión de IgG humana. El ensayo se efectuó con 12 ug de los respectivos fragmentos incubando durante 4 hs a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Como puede observarse en la tabla III hubo una pobre unión de  $^{125}\text{I}$ -Fc y no hubo fijación de  $^{125}\text{I}$ -fab a la superficie de los epimastigotes.

Unión de IgG humana marcada con yodo no radioactivo a la superficie de los epimastigotes.

En virtud de los resultados anteriores se decidió emular el tratamiento de marcaje de la inmunoglobulina humana utilizando yoduro de sodio. Una vez "marcada" la IgG con NaI se repitieron los experimentos de competencia y se observó que los resultados no fueron diferentes a los de los ensayos anteriores (Tabla IV), es decir, no se logró competir ni desplazar la unión de la ---  $^{125}\text{I}$ -IgG sobre la superficie de los epimastigotes.

### Lisis de los epimastigotes en presencia de anticuerpo y complemento.-

Inicialmente determinamos la lisis de los epimastigotes mediada por anticuerpo específico en presencia de una fuente de complemento. Los resultados descritos en la tabla V aclaran que no solo en presencia de anticuerpo específico se logra la lisis total - sino que también en presencia de otras gammaglobulinas se observa el mismo fenómeno; el porcentaje de lisis disminuye gradualmente conforme se diluya la fuente original de complemento.

Para estos ensayos se pusieron 0.26 ug de anticuerpo ya que en ensayos previos a la prueba se determinó por aglutinación directa que ésta concentración de anticuerpo antiepimastigote correspondía a la dosis subaglutinante requerida para los experimentos de lisis celular mediada por complemento.

### Lisis de epimastigotes por activación de la vía alterna del complemento.-

Los resultados de la Tabla VI demostraron que todos los sueros de diferentes especies usados como fuente de complemento, tienen diferente capacidad de inducir lisis de epimastigotes; el mayor grado de lisis se obtuvo en presencia de suero humano y el menor se observó con suero de ratón.

La inactivación del complemento por calentamiento a 56°C durante 30 minutos eliminó totalmente su capacidad de lisar epimastigotes; de la misma manera, la inactivación del componente C<sub>3a</sub> - en éstos sueros disminuyó de manera muy importante la actividad lítica de los mismos.

Los sueros tratados con ácido etilendiamintetraacético (EDTA 10 mM, quelante para iones calcio y magnesio) mostraron una marca-

da reducción en su capacidad de inducir lisis.

Los sueros tratados con ácido etilenglicoltetraéctico (EGTA mM, quelante para calcio) conservaron inalterada su capacidad para inducir lisis. La adición exógena de cationes divalentes - - - (MgCL<sub>2</sub> 3mM y CaCL<sub>2</sub> 2mM) a los sueros tratados con EGTA mantuvo su capacidad de lisis. Los controles negativos mostraron que -- los agentes quelantes "per se" no tienen ningún efecto directo de lisis de los epimastigotes.

Lisis de epimastigotes en presencia de diferentes concentraciones de complemento humano .-

La tabla VII muestra los resultados que demuestran que el suero humano fresco es capaz de lisar al 50% de los epimastigotes a dilución de I: 15. El tratamiento de dicho suero con EDTA reduce considerablemente su capacidad lítica, este resultado con--- cuerda con la posibilidad de que el parásito sea un activador - de la vía alterna del complemento.

¿Es la IgG humana capaz de proteger a los epimastigotes de la lisis mediada por complemento?

Con el fin de averiguar si la presencia de IgG sobre la superfi- cie de los epimastigotes le confería al parásito algún efecto - protector; repetimos los experimentos de lisis usando suero --- fresco humano como fuente de complemento ahora en epimastigotes preincubados con varias concentraciones de IgG humana durante - 4 hr. a 4°C. como se puede ver en la tabla VIII no hubo cambio- alguno en el grado de lisis con complemento humano.

Lisis de epimastigotes pretratados con tripsina.-

$5 \times 10^5$  epimastigotes fueron expuestos a diferentes concentraciones de tripsina durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , posteriormente se lavaron exhaustivamente en solución de PBS-Albúmina antes de ser sometidos al ensayo de lisis en presencia de complemento humano.

Como se puede apreciar en la tabla IX el tratamiento de los epimastigotes con tripsina incrementa de manera notable el grado de lisis a altas diluciones del suero humano fresco usado como fuente de complemento. (Comparar los resultados con los de la tabla VII).

Fig. 2.- Electroforésis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS y 2-mercaptoetanol de la IgG humana -- obtenida del suero precipitado con sulfato de amonio y purificada por cromatografía de afinidad con Sepharosa proteína A.

a) Proteínas totales precipitadas

b) Cadenas pesadas y ligeras de la IgG humana

Tinción con Azul Brillante de Coomasie.

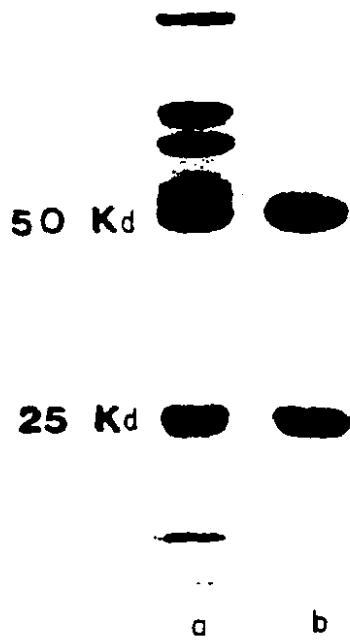


Fig. 2a.- Doble inmunodifusión en agarosa al 1% de la IgG humana purificada y sus fragmentos Fab y Fc contra los correspondientes anticuerpos. La prueba fué realizada por el método de Ouchterlony.

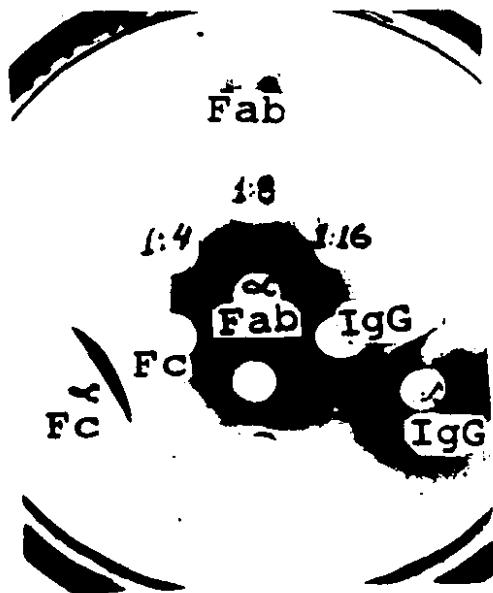




Fig. 3.- Perfil de elución de la IgG humana digerida con papaína, a través de una columna de Sephadex -- G-100.

## CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-100

Muestra: IgG humana digerida con papaína

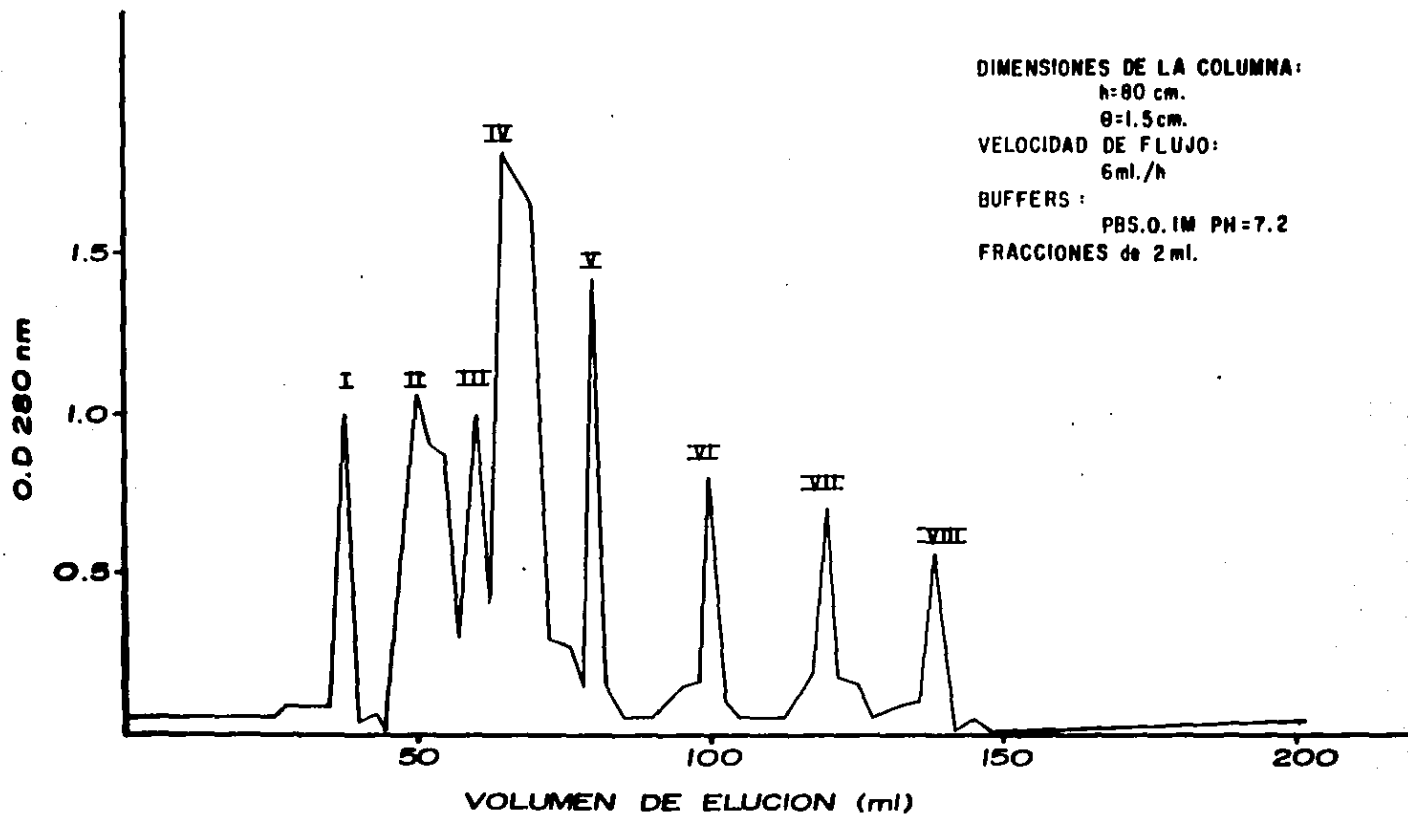


Fig. 4.- Electroforésis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS de la IgG humana digerida con papaína y de los fragmentos Fc y Fab obtenidos por cromatografía de filtración con Sephadex G-100.

- a) IgG digerida
- b) Fragmentos Fc y Fab (Picos IV y V de la fig. 3).
- c) Control de pesos moleculares

Gel teñido con Azul Brillante de Coomasie.

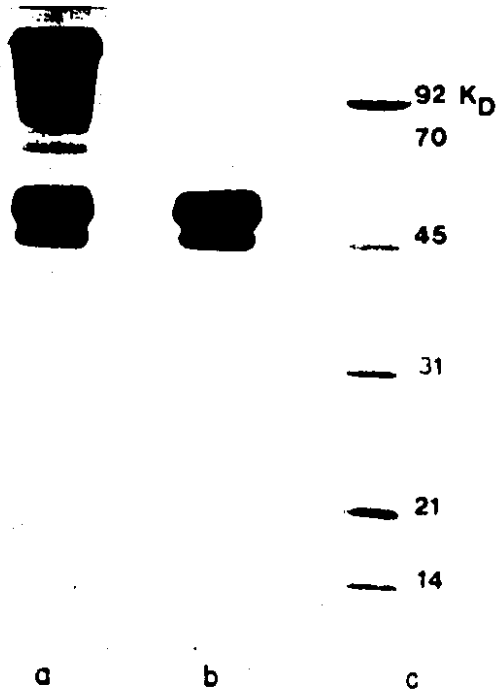


Fig. 5.- Perfil de elución de la mezcla de los fragmentos Fc y Fab, a través de una columna de Sepharosa-proteína A.

# CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CON SEPHAROSA-PROT-A

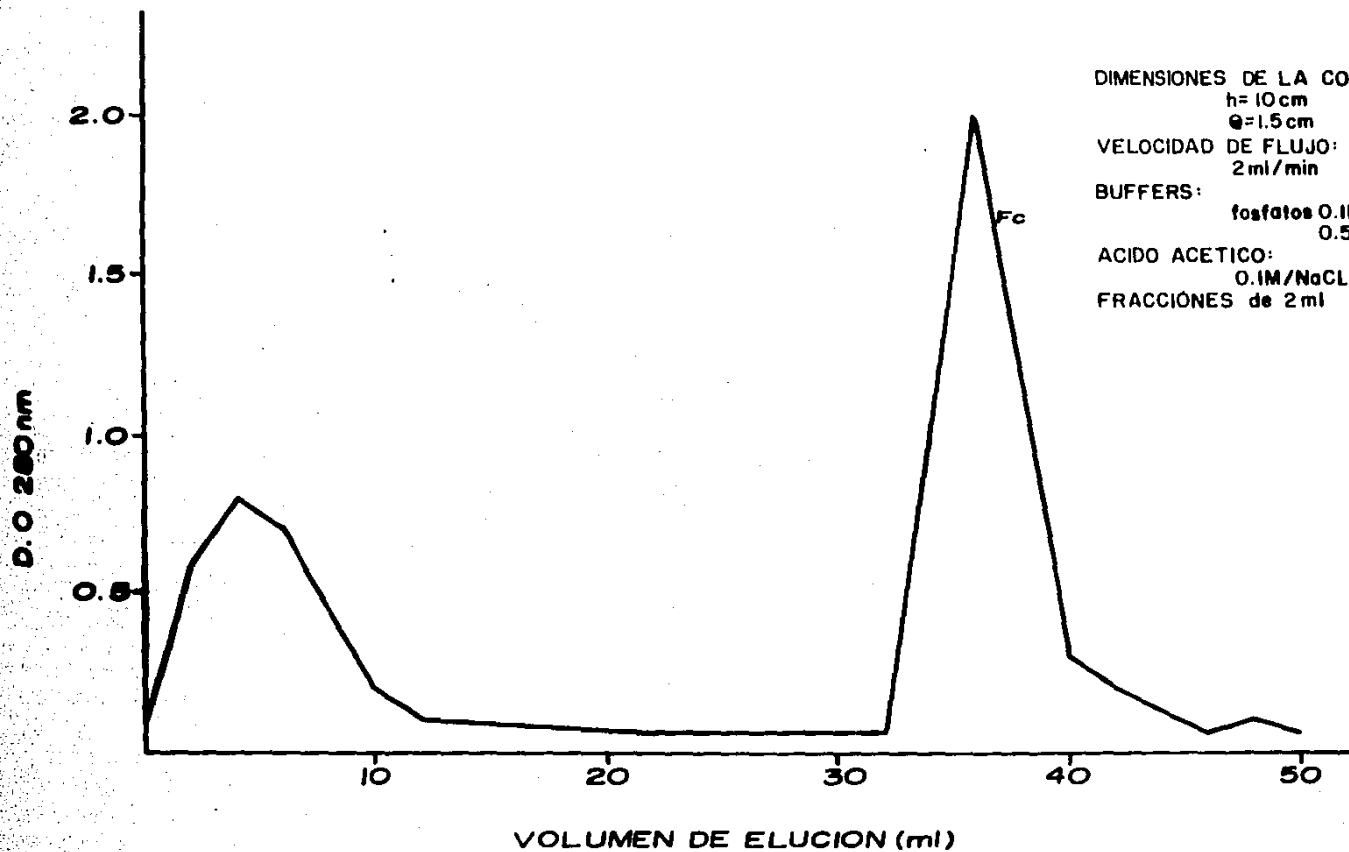


Fig. 6.- Electroforésis en gel de poliacrilamida con SDS de los fragmentos purificados por cromatografía de afinidad en una columna de fragmentos Sepharosa proteína A

a) Fab

b) Fc

c) Mezcla comercial de proteínas de pesos moleculares conocidos.

Tinción con Azul Brillante de Coomasie.

← 150 Kd  
← 94  
← 68

Fab

← 45

a

b

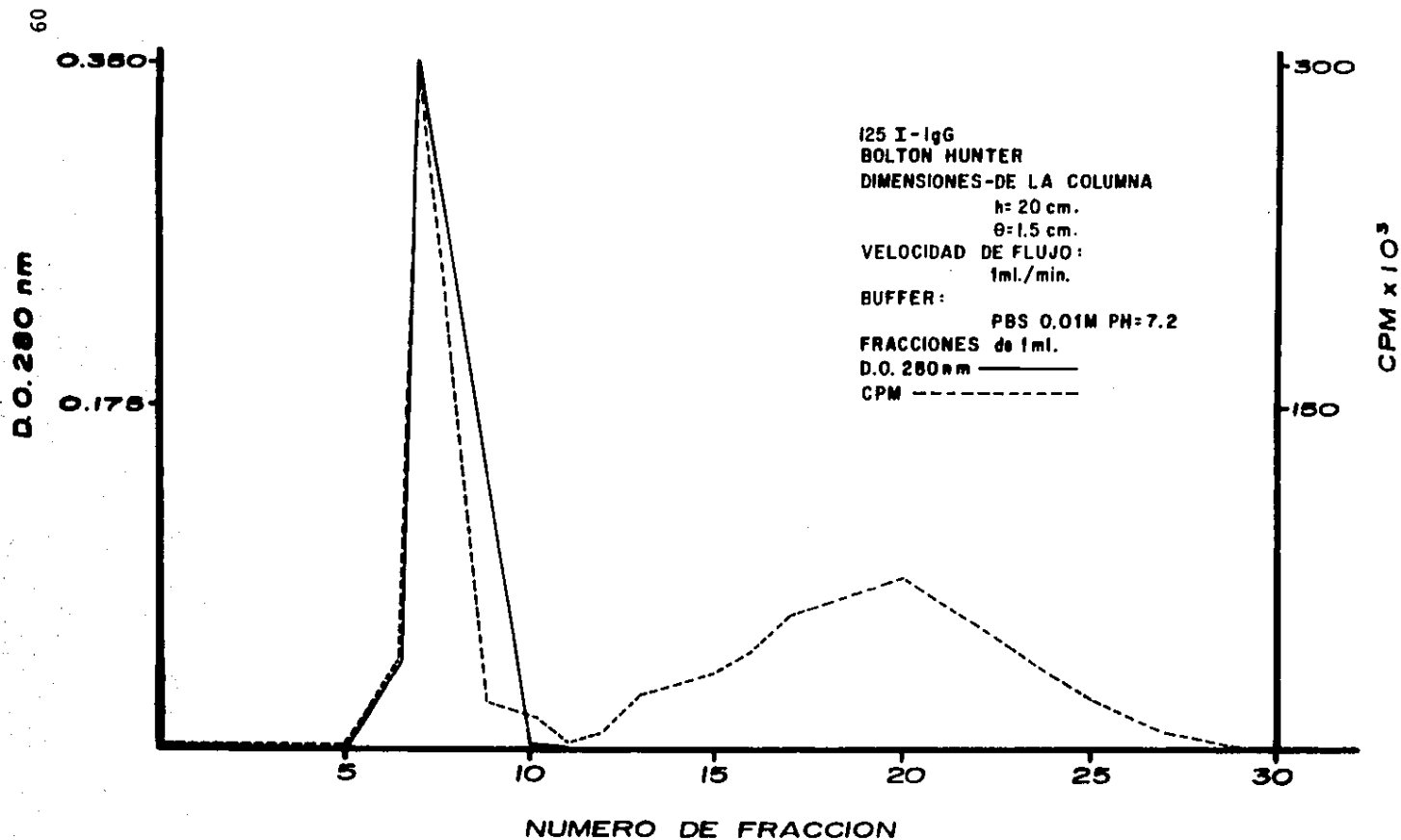
c



Fig. 7.- Cromatografía de filtración con Sephadex G-25 fino para separar el  $^{125}\text{I}$  libre de la IgG humana marcada con  $^{125}\text{I}$ .

Fig. 8.- Perfil de elución del fragmento  $^{125}\text{I}$ -Fab y del  $^{125}\text{I}$  no acoplado a la proteína, a través de -- una columna de Sephadex G-25.

CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-25



CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-25 FINO  
MUESTRA: 125 I - Feb

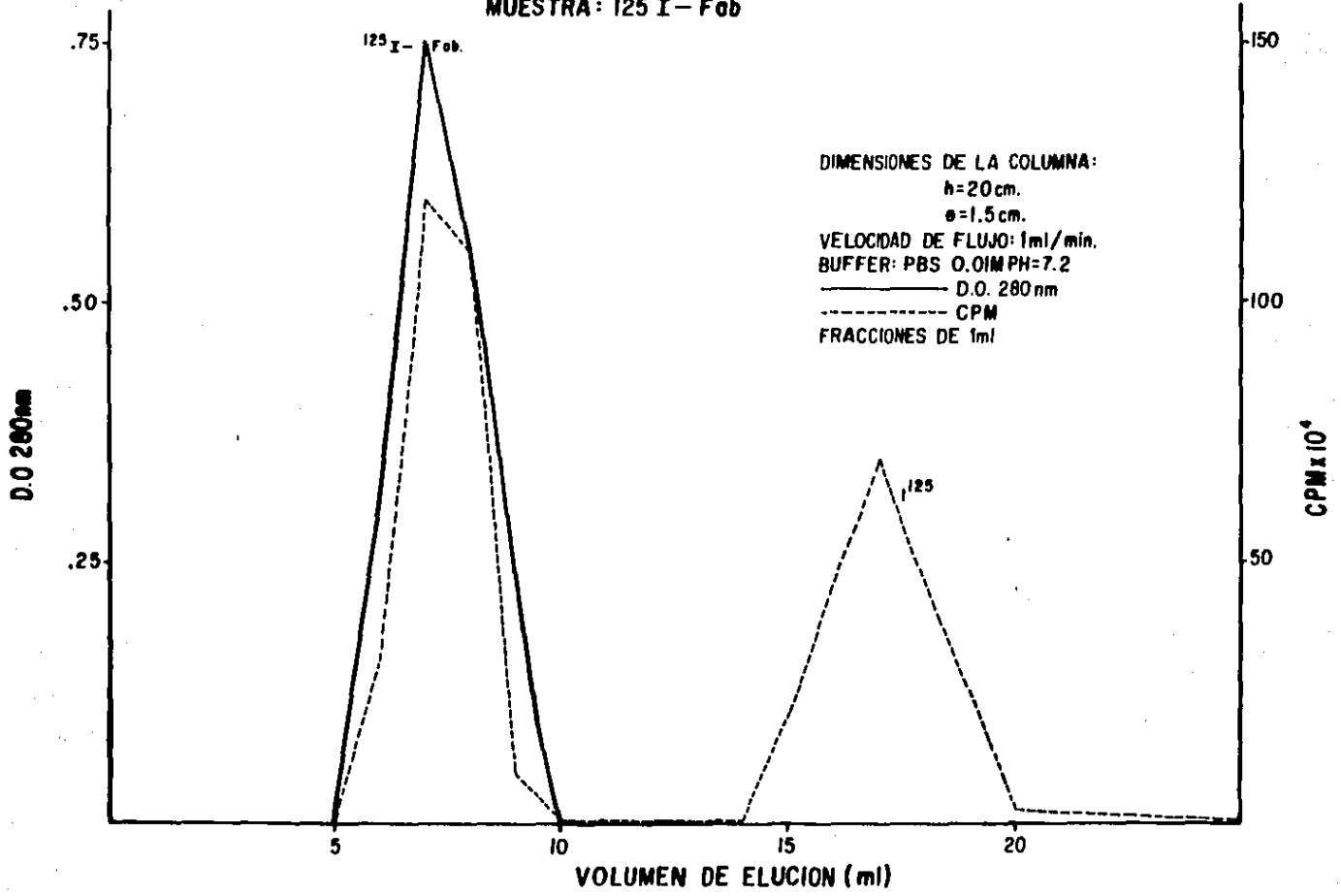


Fig. 9.- Determinación de la integridad biológica de la región Fc de la IgG humana marcada con  $^{125}\text{I}$ . Se midió la capacidad de la IgG marcada para unirse a la membrana de los macrófagos murinos a través de su receptor para Fc e inhibir la formación de rosetas entre los macrófagos y los eritrocitos de carnero sensibilizados.

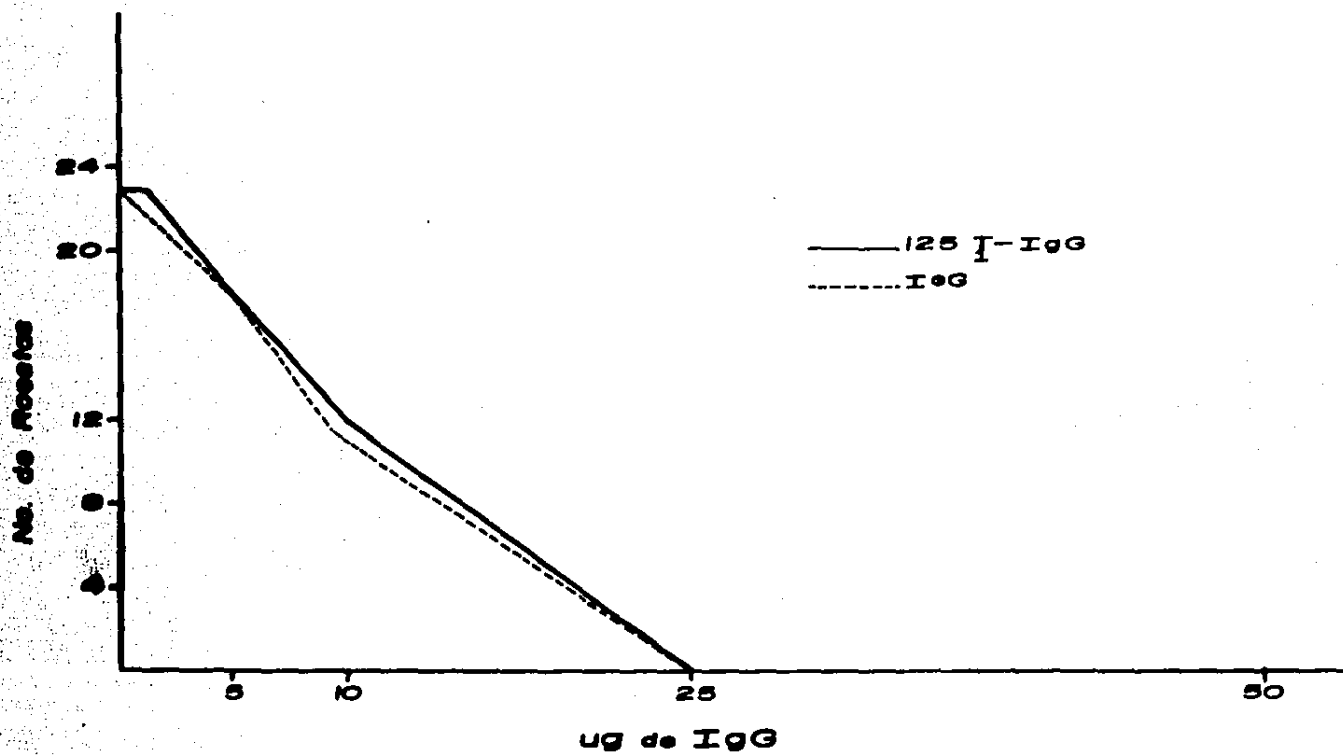
INHIBICION DE LA FORMACION DE ROSETAS CON MACROFAGOS MURINOS POR I<sub>0</sub>G HNA

Fig. 10.- Unión de la  $^{125}\text{I}$ -IgG humana a los epimastigotes de *T. cruzi*. Distintas concentraciones de éste parásito se expusieron a 25 ug de  $^{125}\text{I}$ -IgG, con una actividad específica de 110 232 cpm/ug, éste ensayo se realizó a 29°C y la cantidad de inmunoglobulina asociada a los epimastigotes se determinó 4 horas después. Promedio de tres experimentos.

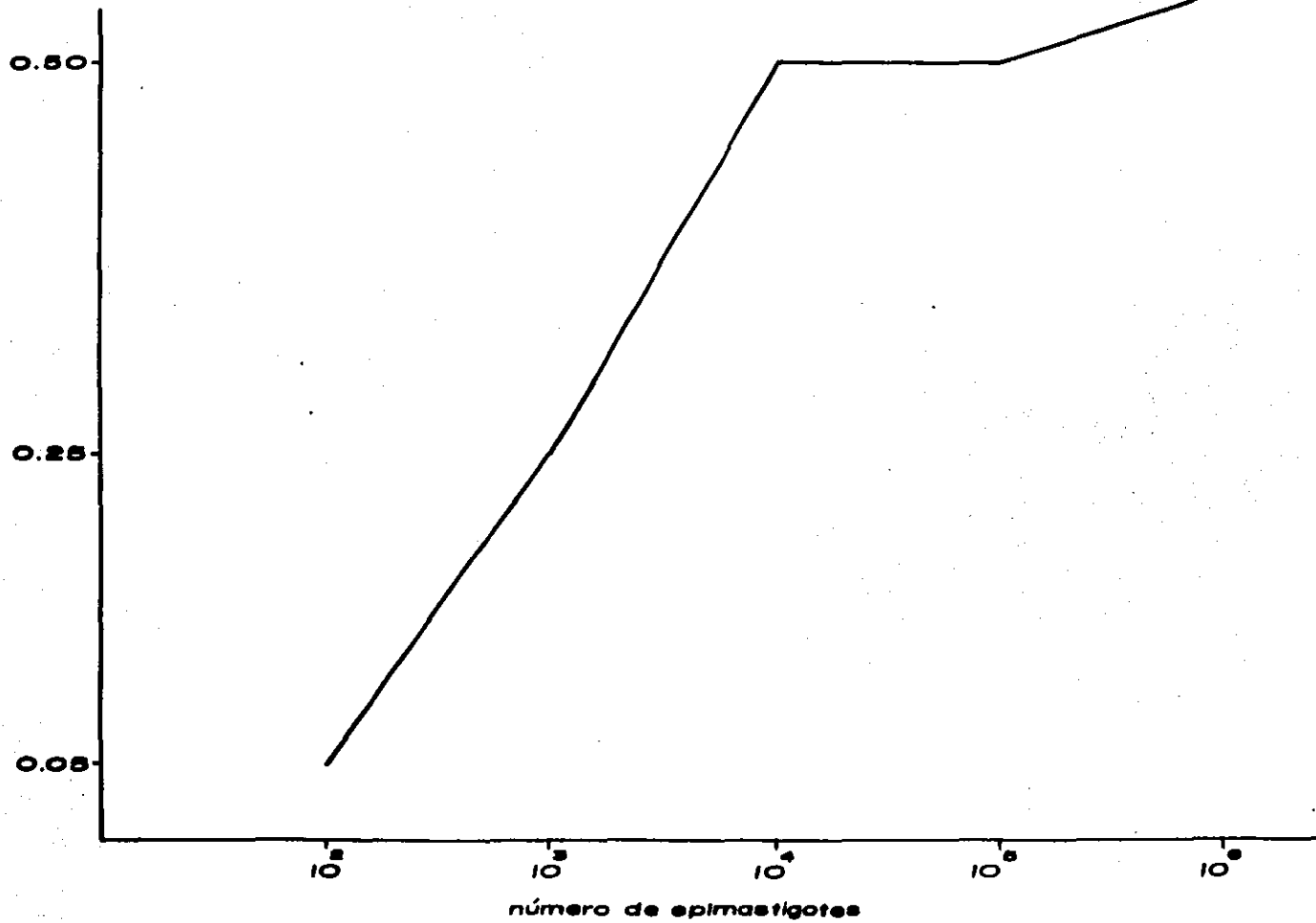
$\mu\text{g de I25 I-IgG}$ 



Fig. 11.- En presencia de 25 ug de  $^{125}\text{I}$ -IgG con actividad específica de 128 315 cpm/ug la unión a distintas concentraciones de epimastigotes no fué - - afectada de manera significativa por la temperatura a la cual se realiza el ensayo. Promedio de tres determinaciones.

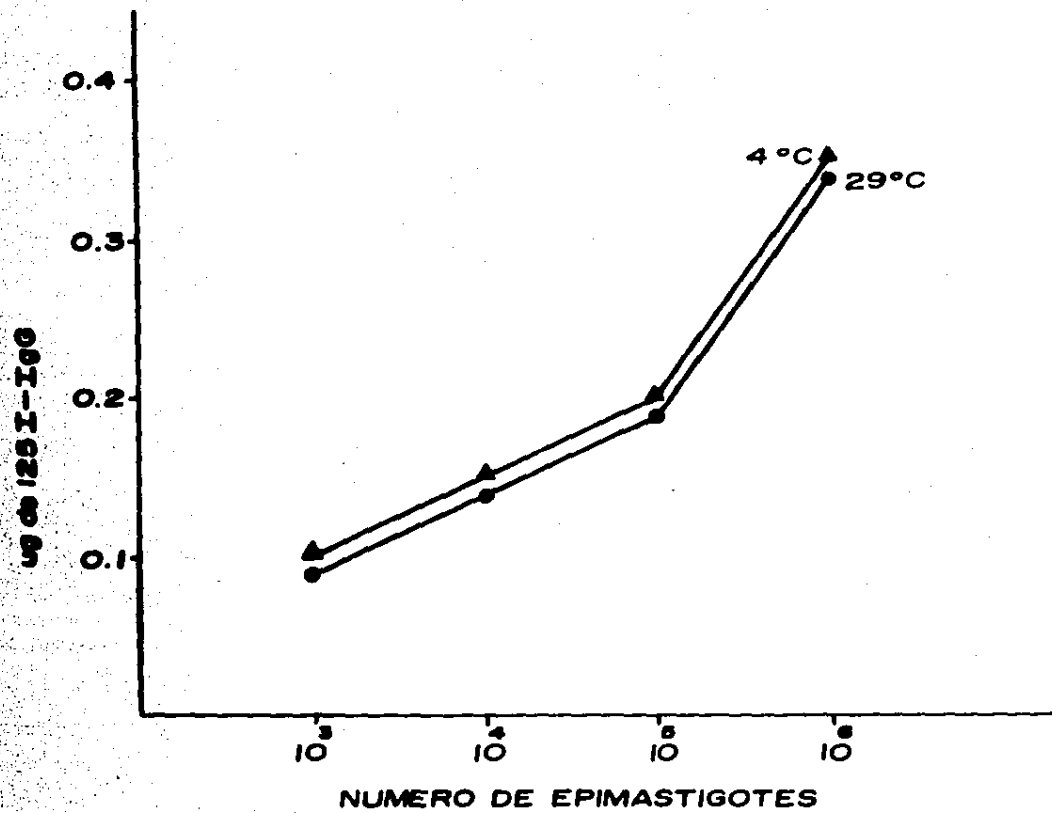


Fig.12.- Micrografía de los componentes subcelulares obtenidos por centrifugación diferencial de un lisado de epimastigotes de T. cruzi

A 40 000 aumentos en la fracción I se observan : membrana plasmática (MP), flagelo (F), etc.

En la fracción II a 50 000 X se identifican: lisosomas (L), mitocondrias (M), vacuolas (V), gránulos de glucógeno (G), etc.

La fracción III contiene principalmente: polirribosomas (PR), ribosomas libres (R), gránulos osmiofílicos (GO), etc. 50 000 X.

Fig. 13.- Con  $1 \times 10^6$  epimastigotes se realizó una cinética de saturación entre la  $^{125}\text{I}$ -IgG a distintas concentraciones y los parásitos. Se observó una unión máxima a 150-173 ug de la inmunoglobulina. Promedio de tres ensayos; la actividad específica de la  $^{125}\text{I}$ -IgG en éste experimento fué de 138 094 cpm/ug.

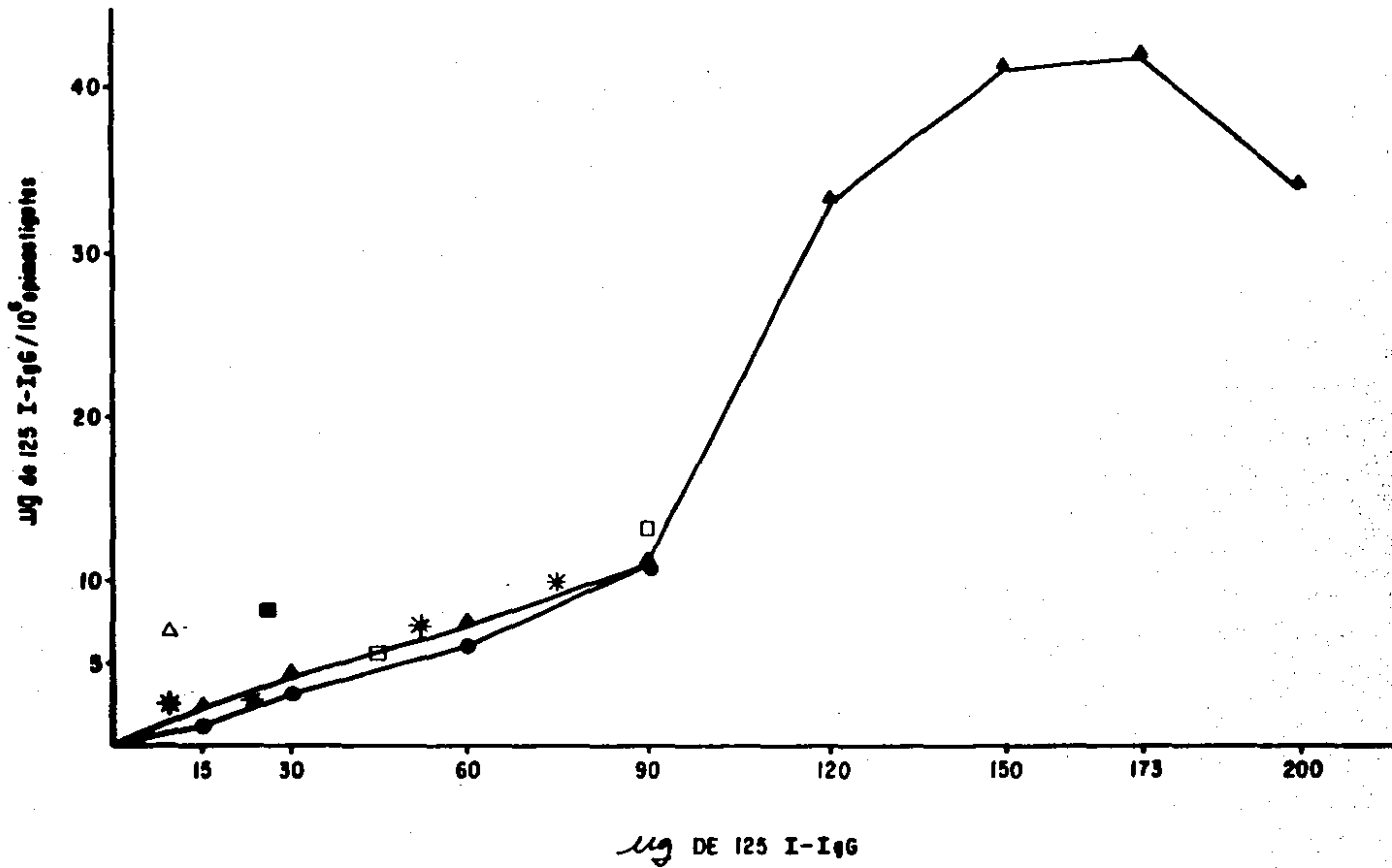


Fig. 14.- La unión de la IgG humana a la superficie de los epimastigotes no es inhibida cuando se preincu--ban los parásitos con cantidades crecientes de - IgG sérica humana. Aún a las más altas concentra-- ciones, la inhibición de la unión de  $^{125}\text{I}$ -IgG -- con una actividad específica de 130 993 cpm/ug - no es mayor del 7%.

Promedio de tres determinaciones.

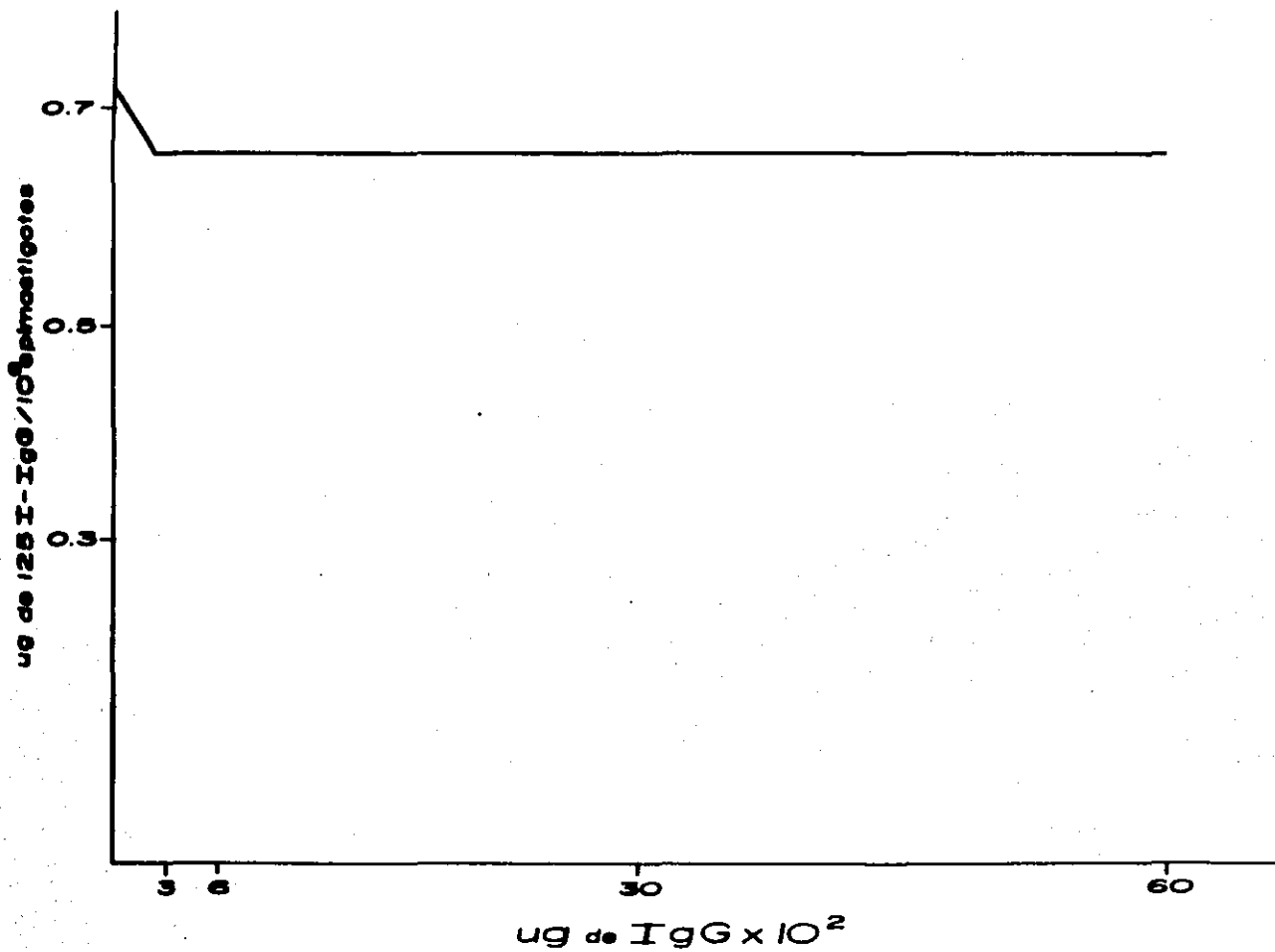


Fig. 15.- La exposición simultánea de los epimastigotes a  $^{125}\text{I}$ -IgG e IgG no radioactiva no reduce la unión de la  $^{125}\text{I}$ -IgG.  
Promedio de cuatro determinaciones.



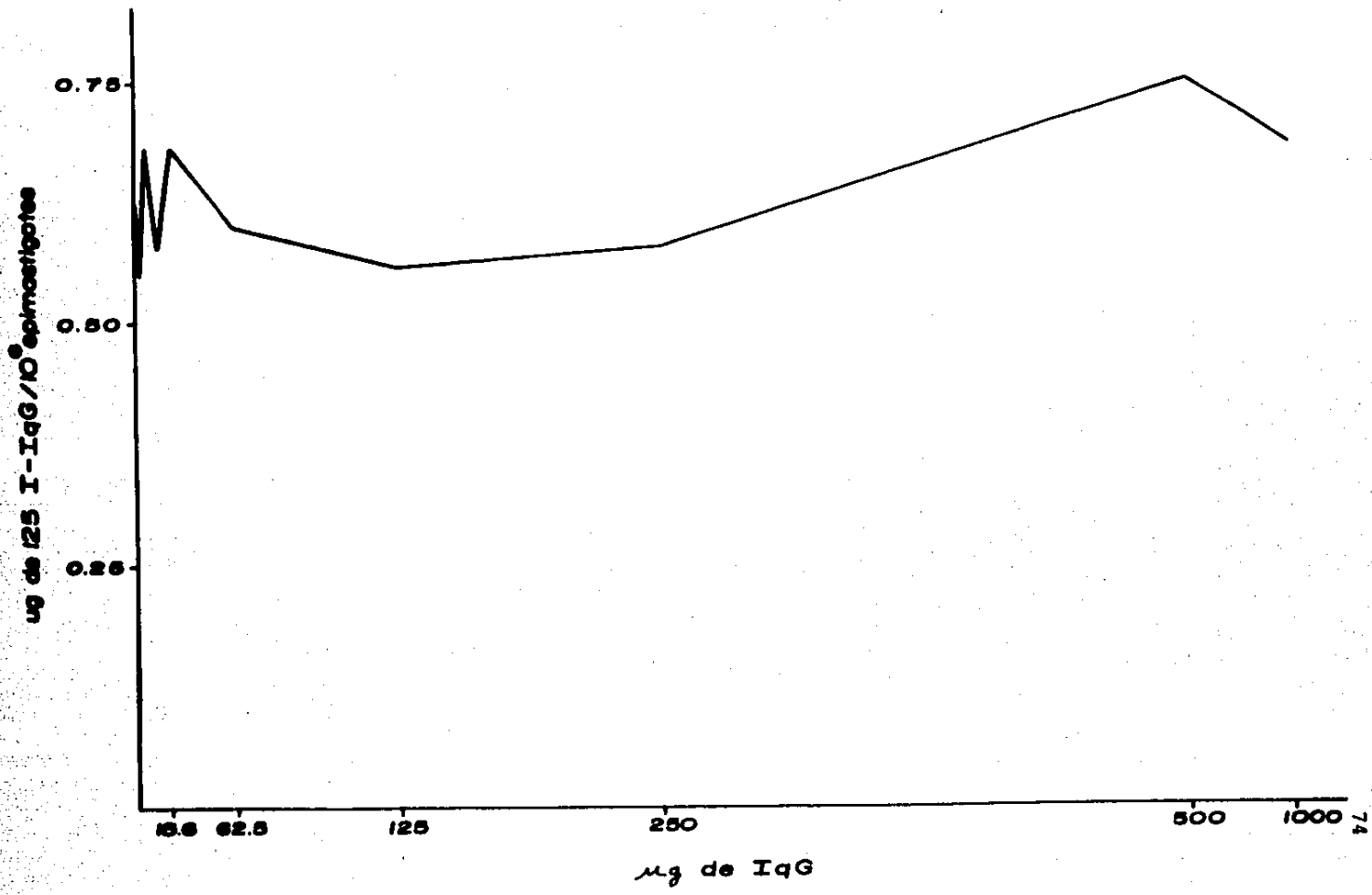


TABLA I  
LOCALIZACION DE  $^{125}\text{I}$ -IgG EN LOS EPIMASTIGOTES

No. de Fracción <sup>a</sup>	ug <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>	Vel. de Centrifugación
I	5.7	91.1	650 g.
II	0.27	4.3	9,500 g.
III	0.29	4.6	85,000 g.

- a) Fracciones obtenidas de un lisado de epimastigotes expuestos a 2mg de IgG radioactiva; revisar la Fig. 9 para el contenido subcelular en cada fracción.
- b) Correlacionando la actividad específica de la  $^{125}\text{I}$ -IgG con las CPM determinadas en una alícuota representativa de cada fracción se obtuvo la -- cantidad de un ug de inmunoglobulina por fracción.
- c) Los resultados de (b) expresados en porcentaje indican que casi toda la proteína radioactiva se localiza en la fracción enriquecida en componentes de membrana plasmática.

Promedio de tres determinaciones.

TABLA II  
CINETICA DE SATURACION ENTRE LA  $^{125}\text{I}$ -IgG Y LOS EPIMASTIGOTES

$^{125}\text{I}$ -IgG/Pozo	$^{125}\text{I}$ -IgG en $10^6$ epimastigotes CPM	ug	No. de IgG/epimastigotes <sup>6</sup>
1	1533	0.009	$0.036 \times 10^6$
5	4070	0.031	$0.12 \times 10^6$
15	23007	0.135	$0.52 \times 10^6$
30	39088	0.346	$1.36 \times 10^6$
60	85563	0.710	$2.84 \times 10^6$
90	123961	1.130	$4.53 \times 10^6$
120	354149	3.300	$13.24 \times 10^6$
150	559574	4.090	$16.41 \times 10^6$
173	574471	4.160	$16.69 \times 10^6$
200	488606	3.490	$14.00 \times 10^6$

- a) Correlacionando la actividad específica de la  $^{125}\text{I}$ -IgG que es de 138 094 CPM/ug con el No. de CPM obtenidas en cada ensayo, se determinó la cantidad en ug de  $^{125}\text{I}$ -IgG unida a los apimastigotes.
- b) Multiplicando  $4.014 \times 10^{12}$  que es el número de moléculas de IgG en un ug por la actividad específica y luego dividiendo el producto entre  $1 \times 10^6$  se obtiene el número de IgG unida a cada epimastigote.

Promedio de tres determinaciones.

TABLA III

UNION DE LOS FRAGMENTOS Fab Y Fc A LA SUPERFICIE DE LOS EPIMASTIGOTES<sup>a</sup>

[ Proteína ]	Act. Esp. CPM/ug	CPM/10 <sup>6</sup> epis	ug/10 <sup>6</sup> epis
40 ug de <sup>125</sup> I-IgG	93 032	151 762	1.67
12 ug de <sup>125</sup> I-Fab	492 785	00	0.00
12 ug de <sup>125</sup> I-Fc	178 785	1 253	0.007

a)  $1 \times 10^6$  epimastigotes fueron expuestos a la IgG completa o a cada uno de los fragmentos resultantes de su digerido con papaína.

El marcaje radioactivo de las proteínas se realizó por el método de Bolton-Hunter.

Promedio de tres determinaciones.

TABLA IV

UNION DE LA IgG HUMANA MARCADA CON IODO NO RADIOACTIVO A LA SUPERFICIE  
DE LOS EPIMASTIGOTES <sup>a</sup>

	CPM/10 <sup>6</sup> epis	ug/10 <sup>6</sup> epis
40 ug de <sup>125</sup> I-IgG	212 038	1.69
40 ug de I-IgG + 40 ug de <sup>125</sup> I-IgG	249 987	1.98
200 ug de I-IgG + 40 ug de <sup>125</sup> I-IgG	223 705	1.77
400 ug de I-IgG + 40 ug de <sup>125</sup> I-IgG	218 734	1.74
1000 ug de I-IgG + 40 ug de <sup>125</sup> I-IgG	205 110	1.63

- a)  $1 \times 10^6$  epimastigotes se expusieron a <sup>125</sup>I-IgG con una actividad específica de 125 696 CPM/ug durante 4 horas a 4°C.
- b) Algunos parásitos se expusieron simultáneamente tanto a <sup>125</sup>I-IgG como a IgG en la que se simuló el procedimiento de marcaje con Iodo.

Los resultados representan el promedio de tres determinaciones.

TABLA V  
LISIS DE LOS EPIMASTIGOTES EN PRESENCIA DE ANTICUERPO ESPECIFICO Y COMPLEMENTO

	Suero de cobayo			Suero humano			PBS-Alb.
	1:1	1:5	1:10	1:10	1:30	1:150	
IgG antiepimastigote de Balb/c	100	97	92	93	15	9	2
IgG no inmune de Balb/c	100	95	90	95	10	8	3
IgG bovina	100	96	94	98	9	7	2
Gammaglobulina de cerdo	100	93	92	89	8	7	2

3 x 10<sup>6</sup> apimastigotes en 100 ul de PBS fueron expuestos a 26 ug de las inmunoglobulinas indicadas durante 30 minutos a 37°C y luego fueron expuestos a 100 ul de suero fresco de cobayo o humano como fuente de complemento a diferentes diluciones.

El porcentaje de lisis se determinó 30 minutos después mediante observación directa al microscopio óptico o de contraste de fases.

TABLA VI  
ACTIVIDAD LITICA DEL SUERO DE DIFERENTES ESPECIES SOBRE LOS EPIMASTIGOTES <sup>a</sup>

	Humano	Cobayo	Conejo	Ratón	Carnero
Sin tratamiento <sup>b</sup>	97	83	24	15	35
56°/30 min.	1	3	2	1	2
50°/30 min.	17	22	7	7	23
EDTA 10 mM	28	15	5	4	12
EGTA 2 mM	99	85	8	7	55
EGTA-MgCl <sub>2</sub> 3mM	100	95	11	8	54
EGTA-MgCl <sub>2</sub> 2mM	100	92	15	12	58
PBS-Alb. 4%, EDTA	1	1	0	2	1
PBS-Alb. 4%, EGTA	0	1	0	2	2
PBS-Alb. 4%	0	2	0	1	2

- a)  $5 \times 10^5$  EPIMASTIGOTES fueron expuestos a 100 ul de suero fresco derivado de diferentes especies como fuente de complemento y diluido 1:3.
- b) Cada uno de estos sueros fué sometido a un procesamiento fisicoquímico y se determinó su actividad lítica bajo éstas condiciones.  
Los resultados están expresados como porcentaje de lisis, representan el pro medio de tres lecturas.

TABLA V

LISIS DE LOS EPIMASTIGOTES EN PRESENCIA DE ANTICUERPO ESPECIFICO Y COMPLEMENTO

	Suero de cobayo			Suero humano			PBS-Alb.
	1:1	1:5	1:10	1:10	1:30	1:150	
IgG antiepipimastigote de Balb/c	100	97	92	93	15	9	2
IgG no inmune de Balb/c	100	95	90	95	10	8	3
IgG bovina	100	96	94	98	9	7	2
Gammaglobulina de cerdo	100	93	92	89	8	7	2

$3 \times 10^6$  epimastigotes en 100 ul de PBS fueron expuestos a 26 ug de las inmunoglobulinas indicadas durante 30 minutos a 37°C y luego fueron expuestos a 100 ul de suero fresco de cobayo o humano como fuente de complemento a diferentes diluciones.

El porcentaje de lisis se determinó 30 minutos después mediante observación directa al microscopio óptico o de contraste de fases.



TABLA VI  
ACTIVIDAD LITICA DEL SUERO DE DIFERENTES ESPECIES SOBRE LOS EPIMASTIGOTES <sup>a</sup>

	Humano	Cobayo	Conejo	Ratón	Carnero
Sin tratamiento <sup>b</sup>	97	83	24	15	35
56°/30 min.	1	3	2	1	2
50°/30 min.	17	22	7	7	23
EDTA 10 mM	28	15	5	4	12
EGTA 2 mM	99	85	8	7	55
EGTA-MgCl <sub>2</sub> 3mM	100	95	11	8	54
EGTA-MgCl <sub>2</sub> 2mM	100	92	15	12	58
PBS-Alb. 4%, EDTA	1	1	0	2	1
PBS-Alb. 4%, EGTA	0	1	0	2	2
PBS-Alb. 4%	0	2	0	1	2

- a)  $5 \times 10^5$  EPIMASTIGOTES fueron expuestos a 100 ul de suero fresco derivado de de diferentes especies como fuente de complemento y diluido 1:3.
- b) Cada uno de estos sueros fué sometido a un procesamiento fisicoquímico y se determinó su actividad lítica bajo éstas condiciones.  
Los resultados están expresados como porcentaje de lisis, representan el pro medio de tres lecturas.

TABLA VII  
ACTIVIDAD LITICA DEL SUERO HUMANO SOBRE LOS EPIMASTIGOTES<sup>a</sup>

	1:3	1:6	1:15	1:30	1:150
Sin tratamiento	97	88	53	13	2
56°/30 min.	1	3	2	1	2
56°/30 min.	17	2	3	2	2
EDTA 10mM	28	9	6	1	1
EGTA 2mM	99	97	74	8	1
EGTA-MgCl <sub>2</sub> 3mM	100	99	95	45	2
EGTA-MgCl <sub>2</sub> -CaCl <sub>2</sub> 2mM	100	95	93	55	6
PBS-Albúmina 4% EDTA	1	0	0	0	0
PBS-Albúmina 4% EGTA	0	0	0	0	0
PBS-Albúmina 4 %	0	0	0	0	0

- a)  $5 \times 10^5$  EPIMASTIGOTES fueron expuestos a 100 ul de suero fresco humano como fuente de complemento a diferentes diluciones.
- b) El suero humano fué sometido a un procesamiento fisicoquímico con el fin de medir su capacidad lítica bajo éstas condiciones.
- Los resultados expresados como porcentaje de lisis representan el promedio de tres lecturas.

TABLA VIII

LA IgG HUMANA SOBRE LA SUPERFICIE DE LOS EPIMASTIGOTES NO LOS PROTEGE DE LA LISIS MEDIADA POR COMPLEMENTO

Ug de IgG <sup>a</sup>	Suero humano <sup>b</sup>		PBS-alb 4%
	1:3	1:6	
1000	95	89	3
500	97	90	2
100	100	93	2
50	100	90	3
PBS-Albúmina 4%	100	95	2

- a)  $5 \times 10^5$  epimastigotes fueron incubados con distintas concentraciones de IgG humana antes de ser sometidos al ensayo lítico usando
- b) suero humano fresco a diferentes diluciones como fuente de complemento.

TABLA IX  
LISIS DE EPIMASTIGOTES TRATADOS CON TRIPSINA <sup>a</sup>

[ Tripsina ]	SUERO		HUMANO	DILUIDO	
	1:3	1:6	1:15	1:30	1:150
1 mg	100	100	92	90	72
5 mg	100	100	95	92	88
PBS-Albúmina	100	89	62	23	5

a) El ensayo de lisis se realizó con  $5 \times 10^6$  epimastigotes pretratados con tripsina a las concentraciones indicadas.

Como control de la actividad de la tripsina se observó su efecto sobre monocapas de cultivos de fibroblastos y células VERO.

Los resultados están expresados como porcentaje de lisis y corresponden al promedio de tres determinaciones.

## DISCUSION

En éste trabajo se estudiaron las características de unión de una proteína sérica humana representada por la IgG humana a la superficie de los epimastigotes del Trypanosoma cruzi. Este estudio fué motivado por el interés de analizar como el parásito se comporta frente a la respuesta inmune del huésped infectado.

En nuestro país se desconoce el número de individuos afectados por la enfermedad de Chagas, pero no sería extraño que muchos de los casos en los que se diagnostica miocarditis de etiología desconocida fueran secundarios a la tripanosomiasis, especialmente en los casos referentes de los estados de la -- vertiente del Pacífico como Jalisco, Oaxaca y Chiapas principalmente (29,30).

Numerosa literatura certifica la posibilidad de que los -- parásitos son capaces de evadir eficientemente la respuesta inmune del huésped ( 212,213).

En el caso de los parásitos del género Trypanosoma se ha postulado de manera más o menos convincente el enmascaramiento de los antígenos del parásito por las proteínas plasmáticas -- huésped (140, 143-154, 196) como posible mecanismo de evasión inmune; se ha observado la presencia de inmunoglobulinas de la clase IgG en numerosas especies del género Trypanosoma (143--155) pero lo que no ha quedado claro es como se pegan éstas -- proteínas a la superficie del parásito a pesar de que se ha -- postulado la presencia de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas en la superficie del parásito (155).

Con el objeto de determinar cual es el mecanismo por el --

cual la IgG humana se pega a la superficie del Trypanosoma cruzi se purificó la inmunoglobulina de un pool de sueros de individuos aparentemente sanos por precipitación de las gamma bulinas con sulfato de amonio y cromatografía de afinidad en una columna de sepharosa-proteína A. Este método es muy frecuentemente utilizado en base a la afinidad que tiene la proteína A del Estafilococo para la porción Fc de las inmunoglobulinas de la clase IgG (160, 170), la elución que se hizo con ácido cítrico 0.1 M en NaCl 0.15M despega a las subclases IgG1 IgG2 e IgG4 con las cuales se realizaron todos los experimentos de ésta tesis.

En reportes anteriores se ha demostrado la presencia de IgG humana sobre la superficie tanto de epimastigotes como de tripomastigotes utilizando diferentes técnicas tales como la aglutinación (153), inmunofluorescencia (143,144), técnicas inmunoenzimáticas (149), formación de rosetas (155) y muy recientemente inmunoelectrotransferencia (196). En éste trabajo decidimos hacer la determinación de la adsorción de IgG a los epimastigotes de Trypanosoma cruzi mediante un radioinmunoensayo ya que es una técnica cuantitativa y tiene una elevada sensibilidad ( 1 pg) para la detección de antígenos y anticuerpos ( 214).

La técnica que se utilizó para marcar con  $^{125}\text{I}$  a la inmunoglobulina G humana y sus fragmentos Fab y Fc fué la de Bolton-Hunter (165); la elección de éste método a que la reacción de iodinación por otros métodos es mucho más violenta (183) -- que la del método de Bolton-Hunter y la intención en ésta par-

te de la tesis era la de no alterar a la molécula de IgG para que su comportamiento fuera lo más cercano posible a su función in vivo. Para poder determinar si la IgG humana marcada radioactivamente aún conservaba su función biológica, se ensayó su capacidad de inhibir la formación de rosetas con macrófagos murinos expuestos a eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina; ésta prueba de inhibición con  $^{125}\text{I}$ -IgG comprobó que la iodinación de la IgG no alteró su porción Fc, situación que era importante determinar ya que como se ha mencionado anteriormente uno de los objetivos de éste trabajo era determinar si la interacción IgG- T. cruzi está mediada por receptores Fc tal y como se ha sugerido por Ferreira y Cols. (1955).

La  $^{125}\text{I}$ -IgG utilizada en los experimentos de ésta tesis -- fué capaz de unirse a los receptores para Fc presentes en la membrana de los macrófagos murinos de la misma manera que la IgG no radioactiva. Una vez comprobada la actividad biológica de la IgG se procedió a determinar la cantidad de ésta proteína que se unía a los epimastigotes; los resultados demostraron que la máxima cantidad de CPM que se obtuvieron para un número constante de epimastigotes ( $1 \times 10^6$ ) fué el equivalente al 2.4% de las CPM inicialmente introducidas en el experimento; a pesar de que sabemos que en cada  $\mu\text{g}$  de IgG hay un equivalente a  $4.014 \times 10^{12}$  moléculas de IgG no fué posible determinar el número de moléculas pegadas a cada epimastigotes ya que desconocíamos cuantas moléculas de  $^{125}\text{I}$  se unieron a cada molécula de -- IgG.

Debido a que cabía la posibilidad de que al poner más

IgG marcada radioactivamente a un número constante de epimastigotes el porcentaje de IgG captada por los parásitos fuera mayor, se realizó un ensayo en forma cinética para demostrar que la unión de  $^{125}\text{I}$ -IgG a los epimastigotes es saturable con 173 ug, pero el porcentaje de radioactividad no varió, ya que aún en presencia de los 173 ug de IgG radiactiva el porcentaje de unión fué solamente del 2.6%.

Con ésto se cubría una de las principales condiciones para considerar que la IgG-T. cruzi estuviera mediada por un receptor ya que el sistema era saturable tal y como se establece en (181).

Por lo anterior, bien valía la pena averiguar si la  $^{125}\text{I}$ -IgG se unía a la membrana del parásito o si se internaliza y almacena en alguno de los componentes subcelulares, ésta posibilidad tampoco ha sido analizada con detalle en los reportes anteriores; los resultados mostraron que la radioactividad estaba asociada a la fracción I del proceso de centrifugación diferencial (tabla I) en la cual por microscopía electrónica se observó que está integrada básicamente de componentes de membrana tal y como se ha reportado en (1, 120, 174). De ésta mane que la  $^{125}\text{I}$ -IgG está asociada sobre la membrana del parásito y considerando la posibilidad de que la unión pudiera estar mediada por receptores, lo más probable es que con el tiempo, la IgG radioactiva se despegara del parásito o bien que aún en el caso de no despegarse, el parásito siguiera su ciclo de reproducción de manera normal como pareció ser el caso.

Resultados no publicados en ésta tesis, mostraron que los cultivos de epimastigotes marcados con  $^{125}\text{I}$ -IgG se comportan



de manera totalmente normal en terminos de tiempo de reproducción y morfología, ésta observación concuerda con lo reportado también en la bibliografía (175).

Antes de seguir adelante con ésta tesis y debido a que el objetivo primordial era averiguar como se unía la IgG a la membrana de los epimastigotes, se realizaron experimentos de competencia de la unión de  $^{125}\text{I}$ -IgG con IgG no radioactiva con el fin de determinar si la unión estaba mediada a través de receptores específicos, o bien si la unión era inespecífica; siguiendo el principio de dilución isotópica se determinó la cantidad de  $^{125}\text{I}$ -IgG que se unía en presencia y ausencia de un exceso de hasta 20 veces o más de la IgG no marcada. Dada la importancia de éstos experimentos se repitieron por lo menos en cuatro ocasiones. Con 50 ug de  $^{125}\text{I}$ -IgG y compitiendo con IgG fría desde 1 a 1000 ug no se observó reducción significativa de la unión de IgG radioactiva (Fig. 15); los resultados de éstos experimentos junto con los de inhibición de la unión por preincubación de los epimastigotes con IgG no radioactiva, demuestran de manera clara y contundente que la unión de la IgG a la membrana de los epimastigotes no es reversible, condición indispensable para considerar una unión específica como mediada por receptores (181).

A pesar de que con los experimentos anteriormente discutidos quedaba establecido que la unión de la IgG no está mediada por receptores sino por adsorción inespecífica, era interesante averiguar que región de la IgG es la que se asocia a la superficie del epimastigote y por lo tanto se repitieron algunos

de los experimentos anteriores con los fragmentos Fc y Fab marcados radioactivamente.

Los resultados de la Tabla III demuestran que el fragmento Fc se une muy pobremente a la membrana de los epimastigotes y - que el fragmento Fab no se une; éstos resultados contrastan de manera importante con los expuestos en la Tabla I donde aún a bajas concentraciones de IgG p.e. 15 ug de IgG se unieron 0.135 ug en  $1 \times 10^6$  epimastigotes, por lo tanto con 12 ug del fragmento Fc se hubiera esperado cuando menos la unión de 0.1 ug de Fc. Este resultado refuerza la posibilidad de que la unión de la IgG a los epimastigotes no está mediada por un receptor para Fc. y que se requiere de la molécula completa de la IgG para que se lleve a cabo una adsorción más efectiva sobre la membrana de los epimastigotes.

Con el fin de descartar la posibilidad de que al marcar la IgG con el  $^{125}\text{I}$  se hubiera introducido en la molécula alguna modificación que explicara la necesidad de la IgG completa para - que se lleve a cabo una adsorción más efectiva y que la hiciera comportarse de manera distinta en comparación con la IgG no radioactiva y que esto explicara el porqué la IgG humana fría no compete ni inhibe la unión de la  $^{125}\text{I}$ -IgG a la superficie de -- los epimastigotes; se simuló el procedimiento de marcaje de la IgG con yoduro de sodio. El hecho de que la I-IgG no lograra -- competir la unión de la  $^{125}\text{I}$ -IgG demuestra que no hay alteración en la molécula de IgG marcada radioactivamente.

Una vez que se estableció mediante los experimentos anteriores que la unión de la IgG a la superficie de los epimastigotes no es secundaria a la presencia de receptores específicos para

la región Fc sino que más bien se trata de una unión estrictamente no específica llamada también adsorción inespecífica (181) de la proteína; era importante averiguar si la poca cantidad de IgG adsorbida al epimastigote juega algún papel biológico importante en cuanto a la susceptibilidad de T. cruzi en su estadio de epimastigote a ciertos mecanismos de respuesta inmune del huésped como son lisis, fagocitosis, etc.

La decisión de estudiar la lisis mediada por complemento de los epimastigotes que adsorben IgG humana se debió a que el sistema del complemento es uno de los primeros sistemas inespecíficos de defensa inmune que se pone en juego en el huésped infectado por T. cruzi (184).

El primer experimento consistió en averiguar si la presencia de anticuerpo específico lograba la lisis de los epimastigotes; los resultados mostraron que no solo el anticuerpo específico en presencia de complemento lograba la lisis total de los epimastigotes sino que aún en presencia de otras inmunoglobulinas no inmunes se producía la lisis; se compararon diferentes fuentes de complemento y se observó mayor grado de lisis con suero humano y menor susceptibilidad a la lisis de los epimastigotes cuando se utilizó suero normal de ratón.

Debido a que si había lisis de los epimastigotes aún en ausencia de anticuerpos específicos, era razonable suponer que la lisis se debía a que los epimastigotes estaban siendo capaces de activar la vía alterna del complemento como ya se ha demostrado también para el caso de otros parásitos (185). En particular para los epimastigotes de T. cruzi cuando realizamos los experimentos de lisis había reportes contradictorios en cuanto a la vía

de activación del complemento ( 74. 184,215) y además en ausencia de reportes previos para el mecanismo de lisis en los epimastigotes de la cepa cocula de T. cruzi se realizaron experimentos a fin de determinar si la vía clásica o la alterna del complemento se activaba para el caso de nuestro modelo experimental.

En una serie de ensayos de lisis se utilizaron diversos agentes quelantes para los iones  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  de los cuales se sabe que tienen efecto sobre una u otra de las vías (186), en la vía clásica del complemento se requiere de la presencia de los iones calcio y magnesio (187), mientras que en la vía alterna se requiere únicamente de los iones magnesio (188,189). Los sueros utilizados como fuente de complemento cuando fueron tratados con ácido etilendiamintetracético (EDTA) 10mM que es un agente quelante para calcio y magnesio, mostraron una marcada reducción en su capacidad de lisis; en cambio, los sueros tratados con ácido etilenglicoltetracético (EGTA), agente quelante para calcio, conservaron inalterada su capacidad de inducir lisis de los epimastigotes. La adición exógena de los cationes divalentes calcio y magnesio a los sueros tratados con EGTA mantuvo inalterada la capacidad de éstos en cuanto a la lisis; los resultados sugieren de manera importante que los epimastigotes de T. cruzi de la cepa cocula son capaces de activar la vía alterna del complemento.

Para poder corroborar lo anterior, los sueros utilizados como fuente de complemento también fueron sometidos a calentamiento durante 30 min a  $56^{\circ}C$  con el objeto de inactivar al complemento ( 191), dichos sueros mostraron una pérdida completa de su capacidad para lisar a los epimastigotes; mientras que los mismos sue--

ros tratados a 50°C durante 30 min (192), mostraron una disminución importante en su actividad lítica.

Una vez que determinamos por todos éstos experimentos que los epimastigotes de nuestro modelo experimental son capaces de activar la vía alterna del complemento intentamos averiguar si era posible que la IgG humana que ya determinamos se pega de manera inespecífica al epimastigote le confiriera alguna protección al parásito contra el ataque del sistema del complemento bloqueando a la proteína responsable de la activación del complemento y que se encuentra presente en la membrana del parásito. Recientemente se ha demostrado que una glicoproteína con peso molecular de 72 Kd presente en la membrana de los epimastigotes es la molécula aceptora de C3b cuyo depósito desencadena la activación de la vía alterna del complemento (216).

Para tratar de aclarar la duda anteriormente expuesta se -- efectuaron los experimentos cuyos resultados se exponen en la Tabla VIII y que demuestran que la presencia de la IgG humana sobre la superficie del epimastigote no le confiere ninguna protección al efecto lítico del complemento; sin embargo, ésto no descarta la posibilidad de que in vivo si se dé el fenómeno de protección a la lisis de los tripomastigotes que también son capaces de adquirir IgG del huésped tal y como se ha reportado en (155). Es posible que el tratamiento enzimático de los parásitos así recubiertos no solo remueva la cubierta de proteínas plasmáticas del huésped sino que además afecte a las estructuras superficiales responsables de regular la susceptibilidad a la lisis en el T. cruzi en el caso de que la cubierta "protectora" proporcionada por las inmunoglobulinas del huésped no fuera la única responsable de la

resistencia a la lisis por complemento, para tratar de probar de probar ésta posibilidad se trataron los epimastigotes con tripsina la cual se sabe es capaz de destruir muchas proteínas presentes en las membranas celulares (176-178) y se sometieron a la acción del complemento, los resultados demostraron que el tratamiento de los parásitos con ésta enzima no solo no afectaba la lisis de los mismos sino que la lisis se incrementaba aún a bajas concentraciones de complemento, es decir, la dilución del suero humano se podía llevar hasta 1:150 y aún se observaba un muy importante porcentaje de lisis.

Es difícil suponer que el tratamiento enzimático de los epimastigotes afectó a alguna posible proteína protectora presente en la membrana, uno pensaría que lo que sucedió, es que la membrana del parásito se encontraba mucho más expuesta a la acción del complemento; o bien que la estructura responsable de la activación se expone mejor tal como se a sugerido en (190).

En resumen se puede decir por los datos experimentales mencionados en ésta tesis que la presencia de la IgG humana sobre la superficie de los epimastigotes se debe a una adsorción inespecífica de la misma a concentraciones muy bajas, esto muy probablemente también es válido para el caso de los tripomastigotes de Trypanosoma cruzi ya que la estructura molecular responsable de la adsorción inespecífica de la IgG humana pudiera estar compartida en ambos estadios; muy recientemente se ha reportado en T. lewisi que por lo menos uno de los componentes que unen IgG humana no específica sobre su superficie es una glicoproteína con peso molecular de 74 Kd (196). En el caso de T. cruzi se debe recordar que más de una glicoproteína con peso molecular en-

tre 90 y 51 Kd están compartidas entre sus diferentes estadios -- (17,22,217).

Por otro lado, en cuanto al aspecto de posible función biológica, la presencia de la IgG humana no parece conferirle al parásito al menos en su estadio de epimastigote ninguna protección - contra el ataque del sistema inmune.

Los resultados anteriores abren nuevas conjeturas a cerca - del papel que juega la presencia de inmunoglobulinas circulantes de huésped en la superficie del Trypanosoma cruzi, porque si bien su unión es inespecífica y pobre, es casi seguro que ejerce alguna función, como por ejemplo, establecer el reconocimiento entre el parásito y su célula huésped y que no necesariamente tiene que establecerse a través de receptores. Algunas proteínas de superficie capaces de fijar diferentes isotipos de IgG humana se han estudiado en una gran variedad de agentes infecciosos y células de mamíferos (219-221).

La capacidad de unir IgG del huésped por parte del Trypanosoma cruzi resulta ser un fenómeno interesante ya que también en el caso de éste parásito podría representar el bloqueo de la activación de los mecanismos inmunes efectores por división enzimática de la inmunoglobulina plasmática o específica que se adsorbe a su superficie. Este fenómeno denominado fagulación ya ha sido ampliamente estudiado en otros agentes infecciosos como Schistosoma mansoni (212), Tetrahymena pyriformis (213), Pseudomonas aeruginosa (218), etc.

## BIBLIOGRAFIA

1. Texeira, A. R. L. y Santos- Buch, C. A. The immunology of experimental Chagas' disease. I. Preparation of Trypanosoma cruzi antigens and humeral antibody response to these antigens. J. Immunol. 113: 859 (1974).
2. D. de Isola, E. L., Lammel, E.M., Katzin, V.J. y González, C.S.M. Influence of organ extracts of triatoma infestans on differentiation of Trypanosoma cruzi . J. Parasitol. 67: 53 (1981).
3. Belding, D. L. Textbook of clinical parasitology . Appleton Century. Co. New York (1942).
4. Brener, A. Biology of Trypanosoma cruzi. Ann. Rev. Microbiol. 27: 347 (1973).
5. Goble, F. C. Pathogenesis of blood protozoa. En. E.J.L. Soulsby (ed): Biology of parasites. Academic press, New york (1966).
6. Goble, F.C. South american trypanosomes. En G.J. Jackson; R. Hernan y I. Singer (eds.), Immunity to parasitic animals. Appleton Century Crofts. New York (1970).
7. World Health Organization. Chagas' disease. Report of a study group Technical Report Series, No. 202 (1960).
8. World Health Organization. Immunology of Chagas' disease. Bull. Wld. Hlth.Org. 50: 459 (1974).
9. Pereira, M.E.A., Loures, M.A., Villalta, F. y Andrade, A.F.B. Lectin receptors as markers for Trypanosoma cruzi . J. Exp. Med. 152: 1375 (1980).
10. Sher, A. Specific inhibition of the morphogenesis of Trypanosoma cruzi by a monoclonal antibody. Nature (London). 300: 639 (1982).



11. Albright, J.F., Albright, J.W. y Dusanic, D.G. Trypanosome induce splenomegaly and suppression of mouse spleen cell responses to antigen and mitogens. *J. Reticuloendothel. Soc.* 21: 21 (1977).
12. Nogueira, N. y Cohn, Z. Trypanosoma cruzi: Mechanims of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.* 143: 1402 (1976).
13. Kress, Y., Tanowitz, H., Bloom, R. y Wittner, M. Trypanosoma cruzi: Infection of normal and activated mouse macrophages. *Exp. Parasitol.* 41: 385 ( 1977).
14. Chiari, E., De Souza, W., Romanha, A.J., Chiari, C. A., Brener, Z. Concanavalin A receptors on the cell membrane of Trypanosoma cruzi. *Acta Tropica.* 35: 113 (1978).
15. Araujo, F.G. y Remington, J.S. Characterization of stages and strains of Trypanosoma cruzi by analysis of cell membrane components. *J. Immunol.* 127: 855 (1981).
16. Baum, S.G., Wittner, M., Nadler, J.P. Horwitz, S.B., Dennis, J. E., Schiff, P.B. y Tanowitz, H.B. Taxol a microtubule stabilizing agent blocks the replication of Trypanosoma cruzi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 4571 (1981).
17. Nogueira, N., Unkeless, J. y Cohn, Z. Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of trypanosoma cruzi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 1259 (1982).
18. Corsini, S.C., Costa, M.G., Oliveira, O.L.T., Camargo, J.J.B. y Rangel, H.A. A Fraction (FAd) from Trypanosoma cruzi epimastigotes depresses the immune response in mice. *Immunology* 40: 505 (1980).
19. Gaborak, M., Darling, J.L. y Gutteridge, W.E. Comparative drug sensitivities of culture forms of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma dionisii. *Nature (London)* 268: 339 (1977).

20. Cover, B.W.E. y Gaborak, M. Isolation of blood and intracellular forms of Trypanosoma cruzi from rats and other rodents and preliminary studies of their metabolism. *Parasitology* 76: 139 (1979).
  21. Bloom, B.R. Games parasites play: how parasites evade immune surveillance. *Nature (London)* 279: 21 (1979).
  22. Snary, D. y Hudson, L. Trypanosoma cruzi cell surface proteins: Identification of one major glycoprotein. *FEBS LETTERS*. 100: 166 (1979).
  23. Scott, M.T. The nature of immunity against Trypanosoma cruzi in mice recovered from acute infection. *Parasite Immunol.* 3: 209 (1981).
  24. Hudson, L. Immunobiology of Trypanosoma cruzi infection and Chagas disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 35: 493 (1981).
  25. De Lucca, F.L., Bertoloni, M.C. y Zini, M.N. In vitro transfer of reactivity to Trypanosoma cruzi antigens from rat cells to human cell with immune RNA. *J. Infect. dis.* 145: 148 (1982).
  26. Wood, J.N., Hudson, L., Jassell, T.M. y Yamamoto, M. A monoclonal antibody defining antigenic determinants of subpopulations of mammalian neurones and Trypanosoma cruzi parasites. *Nature (London)* 296: 34 (1982).
- Trischmann, T.M. y Bloom, B.R. Genetics of murine resistance to Trypanosoma cruzi. *Infect. & Immun.* 35: 546 (1982).
28. Cohen, S. Parasitic diseases infection. En S. Cohen & E.H. Saduen (eds.), Blackwell. London. 1976.
  29. Tay, J. La enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Sal. Pub. Mex.* XXII: 409 (1980).

30. Gómez, T.R., Rodríguez, V.M.L., Mooser, B.O. y Ramírez I. J.M. Enfermedad de Chagas en el estado de Aguascalientes. Aislamiento de una nueva cepa de Trypanosoma cruzi en el estado de Aguascalientes. (I Parte). Arch. Inst. Cardiol. Mex. 53: 139 (1983).
31. Stoppani, A.D.M., Docampo, R., De Boiso, J.F. y Frasch, A.C.C. Effect of inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation on Trypanosoma cruzi respiration and growth. Molec. & Biochem. Parasitol. 2: 3 (1980).
32. Belnat, P., Paoletti, J. y Riou, G. Subunit organization of chromatin from Trypanosoma cruzi sensitive and resistant to ethidium bromide. Moec. & biochem. Parasitol. 2: 167 (1981).
33. Wrightsman, R., Krassner, S. y Watson, J. Genetic control of responses to Trypanosoma cruzi in mice: Multiple genes influencing parasitemia and survival. Infect. & immun. 36: 637 (1982).
34. Koberle, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes. The pathology of american tripanosomiasis. Adv. Parasitol. 6: 63 (1968).
35. Hanson, W.L. Immunology of american tripanosomiasis (Chagas' disease). En S. Cohen y E.H. Sudaun (eds.) Immunology of parasitic infection. Blackwell scientific Publications. Oxford. 1976.
36. Texeira, A.R.L., Texeira, M.L. y Santos- Buch, A. The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas disease in man. Am. J. Pathol. 80: 163 (1975).
37. James, S.L., Kipnis, T.L., Sher, A. y Hoff, R. Enhanced resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice treated with an interferon inducer. Infect. & Immun. 35: 588 (1982).
38. Scott, M.T. y Snary, D. Protective immunisation of mice using cell surface glycoprotein from Trypanosoma cruzi. Nature (London). 282: 73 (1979).
39. Ribeiro Dos Santos, R. y Hudson, I. Trypanosoma cruzi : Immunological consequences of parasite modification of host cells. Clin. Exp. Immunol. 40: 36 (1980).

30. Gómez, T.R., Rodríguez, V.M.L., Mooser, B.O. y Ramírez I. J.M. Enfermedad de Chagas en el estado de Aguascalientes. Aislamiento de una nueva cepa de Trypanosoma cruzi en el estado de Aguascalientes. (I Parte). Arch. Inst. Cardiol. Mex. 53: 139 (1983).
31. Stoppani, A.D.M., Docampo, R., De Boiso, J.F. y Frasch, A.C.C. Effect of inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation on Trypanosoma cruzi respiration and growth. Molec. & Biochem. Parasitol. 2: 3 (1980).
32. Belnat, P., Paoletti, J. y Riou, G. Subunit organization of chromatin from Trypanosoma cruzi sensitive and resistant to ethidium bromide. Moec. & biochem. Parasitol. 2: 167 (1981).
33. Wrightsman, R., Krassner, S. y Watson, J. Genetic control of responses to Trypanosoma cruzi in mice: Multiple genes influencing parasitemia and survival. Infect. & immun. 36: 637 (1982).
34. Koberle, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes. The pathology of american tripanosomiasis. Adv. Parasitol. 6: 63 (1968).
35. Hanson, W.L. Immunology of american tripanosomiasis (Chagas' disease). En S. Cohen y E.H. Sudun (eds.) Immunology of parasitic infection. Blackwell scientific Publications. Oxford. 1976.
36. Texeira, A.R.L., Texeira, M.L. y Santos- Buch, A. The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas disease in man. Am. J. Pathol. 80: 163 (1975).
37. James, S.L., Kipnis, T.L., Sher, A. y Hoff, R. Enhanced resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice treated with an interferon inducer. Infect. & Immun. 35: 588 (1982).
38. Scott, M.T. y Snary, D. Protective immunisation of mice using cell surface glycoprotein from Trypanosoma cruzi. Nature (London). 282: 73 (1979).
39. Ribeiro Dos Santos, R. y Hudson, I. Trypanosoma cruzi: Immunological consequences of parasite modification of host cells. Clin. Exp. Immunol. 40: 36 (1980).

40. Cossio, P.M., Diez, C., Szarfman, A., Kreutzer, E., Candiolo, B. y Arana, R.M. Chagasic cardiopathology. Demonstration of a serum gammaglobulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* 49: 13 (1974).
41. Cossio, P.M., Laguens, R.P., Diez, C., Szarfman, A., Segal, A. y Arana, R.M. Chagasic cardiopathology: Antibodies reacting with membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation*. 50: 1252 (1974).
42. Menezes, H. Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of Trypanosoma cruzi against experimental infection in mice. *Rev. Inst. Me. Trop. Sao Paulo*. 10: 1 (1968).
43. Kagan, I., G. y Norman, L. Immunologic studies in Trypanosoma cruzi. III. Duration of acquired immunity in mice initially infected with a north american strain of T. cruzi. *J. Infect. Dis.* 108: 213 (1961).
44. Marr, J.S. y Pike, E.H. The protection of mice by "Corpus Christi" strain of Trypanosoma cruzi when challenged with "Brazil" strain. *J. Parasitol.* 53: 657 (1967).
45. Bloem, B.R. y Rowen, A. Cell mediated immunity in Chagas' disease. WHO meeting on immunology of Chagas' disease. México. Dec. 3-7 (1973).
46. Kierzenbaum, F. Brief review of the role of antibodies in immunity to Chagas' disease. WHO meeting on immunology of Chagas' disease. México. Dec. 3-7 (1976).
47. Kirchner, H., Chused, T.M., Heberman, R.B., Holden, H.T. y Lavrin, D.H. Evidence of suppressor cell activity in spleens of mice bearing primary tumors induced by Moloney sarcoma virus. *J. Exp. Med.* 139: 1473 (1974).
48. Montufar, Q.M.B., Musatti, C.C., Mendes, E. y Mendes, N.F. Cellular immunity in chronic Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 5: 401 (1977).

49. Reis, A. , Chiari, C. , Tanus, R. y Andrade, I. Cellular immunity to Trypanosoma cruzi infection in mice. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 18: 422 (1976).
50. Seah, S. Delayed hipersensitivity in Trypanosoma cruzi infection. Nature (London). 225: 1236 (1970).
51. Teixeira, A.R.L. y Santos-Buch, C.A. The immunology experimental Chagas´disease. II. Delayed hipersensitivity to T. cruzi antigens. Immunology. 28: 401 (1975).
52. Tschudi, E.I., Anziano, D.F. y Dalmasso, A.P. Lymphocyte transformation in Chagas´disease. Infect. & immun. 6: 905 (1972).
53. Garcia, F.de L. W. Protección de ratones con antígeno de Trypanosoma lewisi y sus fracciones en contra de la infección experimental de Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop, Sao Paulo. 14: 301 (1972).
54. Cunningham, D.S., Kuhn, R.E. y Rowland, E.C. Suppression of humoral response during Trypanosoma cruzi infection in mice. Infect.&Immun. 22: 155 (1978).
55. Behbehani, M. K. Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi infections in x-irradiated and thymectomized mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 65: 265 (1971).
56. Roberson, E.L. y Hanson, W.L. Trypanosoma cruzi. Effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. Exp. Parasitol. 34: 168 (1973).
57. Schmuñis, G.A., Gonzalez-Cappa, S.M., Traversa, O.C. y Yanovsky J.F. The effect of immunodepression due to neonatal thymectomy on infections with Trypanosoma cruzi in mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 65: 89 (1971).

58. Trischmann, T.M. Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' Disease. *J. Immunol.* 130: 1953. (1983).
59. Loo, V.G. Role of Iron in Intracellular growth of Trypanosoma Cruzi. *Infect. & Immun.* 45: 726 (1984).
60. Harel-Bellan, A., Joskowicz, M. Fadelizi, D. y Eisen, H. Modifica---tion of T-cell proliferation and interleukin in mice infected---with Trypanosoma Cruzi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3466. (1983).
61. Chused, T. M., Steinberg, A. D. y Parker, L. M. Enhanced antibody --response of mice to polyinosinic - polycidilic acid by anti thymo cyt $\epsilon$  serum and its age - dependent loss in NZB/W mice. *J. Immunol-*  
111: 52. (1973).
62. Krakauer, R.S., Waldmann, T. A. y Strober, W. Loss of suppressor T cells in adult NZB/W mice. *J. Exp. Med.* 144: 662 (1976).
63. Hatcher, F.M., Kuhn, R.E., Cerrone, M.C. y Burton, R.C. Increased natural killer cell activity in experimental american trypanoso-miasis. *J. Immunol.* 127: 1126 (1981).
64. Hatcher, F.M. y Kuhn, R.E. Destruction of Trypanosoma cruzi by natural killer cells. *Science.* 218: 295 (1982).
65. Kierszenbaum, F. y Sonnenfeld, G. B- interferon inhibits cell infec-tion by Trypanosoma cruzi. *Infect. & Immun.* 45: 726 (1984).
66. Cunningham, D.S., Kuhn, R.E. y Hatcher, F.M. Trypanosoma cruzi : Response by cells from infected mice to alloantigens. *Exp. Para-sitol.* 51: 141 (1981).
67. Maleckar, J.R. y Kierszenbaum, F. Inhibition of mitogen-induced pro-liferation of mouse T and B Lymphocytes by bloodstream forms of Trypanosoma cruzi. *J. Immunol.* 130: 908 (1983).
68. Kierszenbaum, F. On evation of Trypanosoma cruzi from the host immune response to trypanosomal antigens during acute and chro-nic experimental Chagas' disease. *Immunology.* 44: 641 (1981).

69. Nogueira, N., Gordon, S. y Cohn, Z. Trypanosoma cruzi: Modification of macrophage function during infection. J. Exp. Med. 146: 157 (1977).
70. Krettli, A.B. y Brener, Z. Protective effect of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections. J. Immunol. 116: 755 (1976).
71. Hoff, R. Killing in vitro of Trypanosoma cruzi by macrophages from mice immunized with Trypanosoma cruzi or BCG and absence of cross immunity on challenge in vitro. J. Exp. Med. 142: 299 (1975).
72. Corsini, A.C. y Stelini, A. Immune T cells control Trypanosoma cruzi infections. Experientia. 37: 904 (1981).
73. González-Cappa, S., Schuñis, T., Traversa, O., Yanovsky, J. y Parodi, A. Complement-fixation test and experimental immunization with antigens of Trypanosoma cruzi prepared under pressure. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 17: 709 (1968).
74. Búdzko, D.B., Pizzimenti, M.C. y Kierszenbaum, F. Effects of complement depletion in experimental Chagas' disease: Immune lysis of virulent blood forms of Trypanosoma cruzi. Infect. & Immun. 11: 85 (1975).
75. Dalmaso, A.P. y Jarvinen, J.A. Experimental Chagas' disease in complement deficient mouse and guinea-pigs. Infect. & Immun. 5: 434 (1980).
76. Cunningham, S.D., Brewer, T.E., Kuhn, R.E. y Craig, W.H. Partial characterization of a Trypanosoma cruzi- released decomplementing factor. J. Parasitol. 64: 475 (1981).
77. Nielsen, K. y Shepard, J. Activation of complement by Trypanosomes. Experientia. 25: 769 (1977).
78. Camargo, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis. Technical modification employing



preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in a slide test. Rev. Int. Med. trop. Sao Paulo. 8: 227 (1966).

79. Camargo, M.E., Hoshino, S. y Siqueira, G.R.V. Haemagglutination with preserved sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of american trypanosomiasis. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo. 15: 81 (1973).
80. Camargo, M.E. y Amato Neto, V. Anti-Trypanosoma cruzi IgM antibodies as serological evidence of recent infection. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 16: 200 (1974).
81. Neva, F.A. y Gam, A.A. A complement fixing antigens from Trypanosoma cruzi grown in cell culture. Am. J. Trop. Med. & Hyg. 26: 37 1977.
83. Lelchuk, R., Dalmasso, A.P., Inglisini, C.L., Alvarez, M. y Cerisola, J. A. Immunoglobulin studies in serum of patients with american trypanosomiasis (Chagas' disease). Clin. Exp. Immunol. 6: 547 (1970).
84. Schmuñis, G.A., Szafman, A., Coarasa, L. y Vainstok, C. Immunoglobulin concentration in treated human acute Chagas' disease. A follow up study. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 27: 473 (1978).
85. Valtrione, N.H., Szarfman, A. y González-Cappa, S.M. Antibody response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic Trypanosoma cruzi infections (Chagas' disease). J. trop. Med. Hyg. 76: 45 (1973).
86. Araujo, F.G., Sharma, S.D., Pat Cox, V.T. y Remington, J.S. Monoclonal antibodies to stages of Trypanosoma cruzi: Characterization and use for antigens detection. Infect. Immun. 37: 344 (1982).

88. Burges, D.E., Kuhn, R.E. y Carlon, K.S. Induction of parasite specific helper T lymphocytes during Trypanosoma cruzi infection in mice. J. Immunol. 127: 2092 (1981).
89. Abelene, D.C., Tobie, J.E., G.J., Conlacos, P.G. y Evans, C.B. Alteration in serum proteins and 19S antibody production during the course of induced malarial infections in man. Amer. J. Trop. med. Hyg. 14: 191 (1965).
90. Freeman, T., Smithers, S.R., Targett, G.A. y Walker, P.J. Specificity of immunoglobulin G in rhesus monkeys infected with Schistosoma mansoni, Plasmodium Knowlese and Trypanosoma brucei J. Infect. Dis. 121: 401 (1970).
91. Sanabria, A. Ultrastructure of Trypanosoma cruzi in mouse liver. Exp. Parasitol. 30: 187 (1971).
92. Lelchuk, R., Patrucco, A. y Manni, J.A. Studies of cellular immunity in Chagas' disease: Effect of glutaraldehyde-treated specific antigens on inhibition of leucocyte migration. J. Immunol. 112: 1578 (1974).
93. Roberson, E.L. Y Hanson, W.L. Trypanosoma cruzi. Transfer of immunity of T. cruzi. Trans. Roy. soc. Trop. med. Hyg. 68: 338 (1974).
94. Devorak, J.A. y Schmuñis, G.A. Trypanosoma cruzi: Interaction with mouse peritoneal macrophages. Exp. Parasitol. 32: 289 (1972).
95. Goble, F.C. y Boyd, J.L. Reticulo-endothelial blockade in experimental CHagas' disease. J. Parasitol. 48: 223 (1962).
96. Kierszenbaum, F., Knecht, E., Budzko, D.B. y Pizzimenti, M.C. Phagocytosis : A defense mechanism against infection with Trypanosoma cruzi. J. Immunol. 112: 1839 (1974).

97. Kress, K., Bloom, B.R., Wittne, M., Rowen, C. y Tanowitz, H. Resistance of Trypanosoma cruzi to killing by macrophages. Nature (London). 257: 394 (1975).
98. Nogueira, N. y Cohn, Z. Trypanosoma cruzi: In vitro infection of macrophage microbicidal activity. J. Exp. Med. 148: 288 (1978).
99. Ortiz-Ortiz, L., González Mendoza, A. y Lamoyi, E.A. Vaccination procedure against T. cruzi infection in mice by nonspecific immunization. J. Immunol. 114: 1424 (1975).
100. Tanowitz, H., Wittner, M., Kress, Y. y Bloom, B.R. Studies of in vitro infections by Trypanosoma cruzi. I. Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L cells. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 24: 25 (1975).
101. Kukn, R.E. y Murnane, J.E. Trypanosoma cruzi : Immune destruction of parasitized mouse fibroblast in vitro. Exp. Parasitol. 41: 66 (1977).
102. Santos-Buch, C.H.A. y Teixeira, A.R.L. The Immunology of experimental Chagas' disease. III. Rejection of allogenic cells in vitro J. Exp. Med. 140: 38 (1974).
103. Krahenbuhl, J.L. y Remington, J.S. In vitro induction of nonspecific resistance in macrophages by specifically sensitized lymphocytes. Infect. Immun. 4: 337 (1971).
104. North, R.J. Importance of thymus-derived lymphocytes in cell mediated immunity to infection. Cell. Immunol. 7: 166 (1973).
105. Bloom, B.R. In vitro approaches to the mechanism of cell mediated immune reactions. Adv. Immunol. 13: 101 (1971).
106. Evans, R., Grant, Cox, H., Steele, K. y Alexander, P. Thymus-derived lymphocytes produce an immunologically specific macrophage arming factor. J. Exp. Med. 136: 1318 (1972).

107. Mackaness, G.D. The influence of immunological committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. J. Exp. Med. 129: 973 (1969).
108. Kipnis, T.L., Calich, V.L.G. y Dias da Silva' W. Active entry of bloodstream forms of Trypanosoma cruzi into macrophages. Parasitology. 73 39 (1979).
109. Nogueira, N., Chaplan, F. y Cohn, Z. Trypanosoma cruzi factors modifying ingestion and fate of blood form trypomastigotes. J. Exp. Med. 152: 447 (1980).
110. Williams, D.M. y Remington, J.S. Effect of human monocytes and macrophages on Trypanosoma cruzi. Immunology. 32: 19 (1977).
111. Milder, R. y Kloetzel, J. The development of Trypanosoma cruzi in macrophages in vitro. Interaction with lysosomes and host cell fate. Parasitology. 80: 139 (1980).
112. Kress, Y., Bloom, B.R., Wittner, M., Rowen, A. y Tanowitz, H. Resistance of Trypanosoma cruzi to killing by macrophages. Nature (London). 257: 394 (1975).
113. Nogueira, N. y Cohn, Z. A. Trypanosoma cruzi: In vitro induction of macrophage microbicidal activity . J. Exp. Med. 148: 238 (1978).
114. Nathan, C., Nogueira, N., Juangbhanich, C., Ellis, J. y Cohn, Z. Activation of macrophages in vivo and in vitro : Correlation between hydrogen peroxide release and killing of Trypanosoma cruzi. J. Exp. Med. 149: 1056 (1979).
115. Devorak, J.A. y Schmuñis, G.A. Trypanosoma cruzi. Interction with mouse peritoneal macrophages. Exp. Parasitol. 32: 289 (1972).
116. Clinton, B.A., Ortíz-Ortíz, L., García, W., Martínez, T. y Capin, R. Trypanosoma cruzi. Early immune responses at cellular level by infected mice. Exp. Parasitol. 37: 417 (1975).

117. Cunningham, D. S., Grogg, M. y Kuhn, R. E. Suppression of antibody responses in humans infected with Trypanosoma cruzi. *Infect. Immun.* 30: 496. (1980).
118. Ortiz-Ortiz, L. Ortega, T., Capín, R. y Martínez, T. Enhanced mononuclear phagocytic activity during Trypanosoma cruzi infection in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 50: 232 (1976).
119. Segura, E.L., Vazquez, C., Bronzina, A., Campos, J.M., Cerisola, J.A. y González-Cappa, S.M. Antigens of the subcellular fractions of Trypanosoma cruzi . II. Flagellar and membrane fractions. *J. Protozool.* 24: 540 (1977).
120. Pereira, N.M., Timm, S.L., G. Da Costa, S.C., Rebello, M.A. y De Souza, W. Trypanosoma cruzi : Isolation and characterization of membrane and flagellar fractions. *Exp. Parasitol.* 46: 225 (1978).
121. Sanderson, C.J. A morphological study of the interaction between Trypanosoma cruzi and rat eosinophils, neutrophils and macrophages in vitro. *J. Cell. Sci.* 37: 275 (1979).
122. Olabuenaga, S.E., Cardoni, R.L., Segura, E.L. Riera, N.E. y De Bracco, M.M.E. Antibody-dependent cytolysis of Trypanosoma cruzi by human polymorphonuclear leukocytes. *Cell. Immunol.* 45: 85 (1979).
123. Rimoldi, M.T., Olabuenaga, S.E. y De Bracco, M.M. Phagocytosis of Trypanosoma cruzi by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Protozool.* 28: 351 (1981).
124. Kierszenbaum, F. Antybody- dependent killing of bloodstream forms of Trypanosoma cruzi by human peripheral blood leukocytes. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 965 (1979).
125. Sanderson, C.J., López, A.F. y Bunn Moreno, M.M. Eosinophils and not lymphoid K cells kill Trypanosoma cruzi epimastigotes. *Nature (London)*. 268: 340 (1977).
126. López, A.F., Bunn Moreno, M.M. y Sanderson, C.J. The lysis of Trypanosoma cruzi epimastigotes by eosinophils and neutrophils. *Int. J. Parasitol.* 3: 485 (1973).

127. Butchner, G.A. y Cohen, S. Antigenic variation and protective immunity in Plasmodium Knowlesi malaria. *Immunology*. 23: 503 (1972).
128. Phillis, R.S. Antigenic variation in Babesia rodhacni demonstrated by immunization with irradiated parasites. *Parasitology*. 63: 315 (1971).
129. Allt, G., Evans, E.M., Evans, D.H. y Fargett, G. A. The effect of infection with Trypanosomes on the development of experimental allergic neuritis in rabbits. *Nature (London)*. 233: 197 (1971).
130. Corsini, A.C., Clayton, C., Askonas, B.A. y Ogilvie, B.M. Suppressor cell and loss of B-cell potential in mice infected with Trypanosoma brucei. *Clin. Exp. Immunol.* 29: 122 (1977).
131. Eardley, D.D. Y Jayawardena, A.N. Suppressor cell in mice infected with Trypanosoma brucei. *J. Immunol.* 119: 1020 (1977).
132. Greenwood, B.N., Witte, H.C. y Molineux, D.H. Immunosuppression in Gambian trypanosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67: 846 (1973).
133. Jayawardena, A.N. y Waksman, B.H. Suppressor cells in experimental trypanosomiasis. *Nature (London)*. 265: 539 (1977).
135. Murray, P.K. Jennings, F.W., Murray, M. y Urguhart, G.M. The response of mice infected with Trypanosoma brucei to the administration of sheep erythrocytes. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67: 267 (1973).
134. Jayawardena, A.N., Waksman, B.H. y Eardley, D.D. Activation of distinct helper and suppressor T cells in experimental trypanosomiasis. *J. Immunol.* 121: 622 (1978).
136. Murray, P.K., Kennings, F.W., Murray, M. y Urguhart, G. M. The nature of immunosuppression in T. brucei infection. I. The role of the macrophage. *Immunology*. 27: 815 (1974).

137. Murray, P.K., Kennings, F.W., Murray, M. y Urguhart, G.M. The nature of immunosuppression in T. brucei infections in mice. II. The role of the T and B lymphocytes. *Immunology*. 27: 825 (1974).
138. Rowland, E.C. y Kuhn, R.E. Suppression of cellular responses in mice during Trypanosoma cruzi infections. *Infect. Immun.* 20: 393 (1978).
139. Sánchez, J.L. Alteración de la respuesta inmune celular en ratones infectados con Trypanosoma cruzi. Tesis Profesional. Facultad de Química. UNAM. 1978.
140. Urguhart, G.M., Murray, M., Murray, P.K., Jennings, F.N. y Bate, E. Immunosuppression in Trypanosoma brucei infections in rats and mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67: 528 (1973).
141. Ribeiro dos Santos, R. y Hudson, L. Trypanosoma cruzi: Binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. *Parasite Immunol.* 2: 1 (1980).
142. Cantor, H., Shen, F.W. y Boyse, E.A. Separation of helper T cells from suppressor T cell expressing different Ly components. II. Activation by antigen after immunization antigen-specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T cell subclasses. *J. Exp. Med.* 143: 1391 (1976).
143. Diffley, P. y Honigberg, B.M. Fluorescent antibody analysis of host plasma components on bloodstream forms of african pathogenics trypanosomes. I. Host specificity and time of accretion in Trypanosoma congolense. *J. Parasitol.* 63: 599 (1977).
144. Diffley, P. y Honigberg, B.M. Immunologic analysis of host plasma proteins on bloodstream forms of african pathogenics trypanosomes II. Identification and quantitation of surface bound albumin, non-specific IgG and complement on Trypanosoma congolense. *J. Parasitol.* 64: 674 (1978).

145. Bogucki, M.S. y Seed, J.R. Parasite-bound heterospecific antibody in experimental African trypanosomiasis. *J. Reticuloendothel. Soc.* 23: 89 (1978).
146. Diffley, P. Comparative Immunologic analysis of host plasma protein bound to bloodstream forms of Trypanosoma brucei subspecies. *Infect. Immun.* 21: 605 (1978).
147. Kloetzel, J. y Deane, M.P. Presence of immunoglobulins on the surface of bloodstream Trypanosoma cruzi. Capping during differentiation in culture. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 19: 397 (1977).
148. Krettli, A. y Nussensweig. Presence of immunoglobulin on the surface of circulating trypomastigotes of Trypanosoma cruzi resulting in activation of the alternative pathway of complement and lysis in Chagas' disease. *Pan. Amer. Health. Org. Sci. Pub.* 347: 71 (1977).
149. Villacampa, R.J. Identificación de proteínas séricas del huésped en Trypanosoma cruzi por técnicas inmunoenzimáticas en microscopía electrónica. Tesis Profesional. Facultad de Química. UNAM. 1978.
150. Dwyer, D.M. y D'Alesandro, P.A. The cell surface of Trypanosoma musculi bloodstream forms. II. Lectin and immunologic studies. *J. Protozool.* 23: 262 (1976).
151. Enter, N. Further studies on antigenic changes in Trypanosoma lewisi. *J. Protozool.* 15: 630 (1968).
152. D'Alesandro, P. A. Trypanosoma lewisi: Production of exoantigens during infection in the rat. *Exp. Parasitol.* 32: 149 (1972).



153. Dwyer, D.M. Immunologic and fine structure evidence of avidly bound host serum proteins in the surface coat of a bloodstream trypanosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 1222 (1976).
154. Giannini, H.S. y D'Alesandro, P.A. Trypanosoma lewisi: accumulation of antigen-specific host IgG as a component of the surface coat during the course of infection in the rat. *Exp. Parasitol.* 47: 342 (1979).
155. Ferreira, K. I. y Campos, N.A. Receptor for immunoglobulin Fc on pathogenic but not on nonpathogenic protozoa of the trypanosomatidae. *J. Exp. Med.* 154: 1732 (1981).
156. Andrade, S.G. Possibilidade de incorporação de proteínas do hospedeiro pelo Trypanosoma cruzi. (Investigação experimental). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 20: 279 (1973).
157. Najjar, V.A. In *Advances in Enzymology*, Ed. Meister, A. (John Wiley & sons, Inc. New York), 41: 129 (1974).
158. Ferrante, A. y Jenkin, C.R. Surface immunoglobulins, a possible mechanism for the persistence of Trypanosoma lewisi in the circulation of rats. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.* 55: 275 (1977).
59. Ketteridge, D. The presence of host serum components and the surface of rodent adapted Trypanosoma vivax. *J. Protozool. Suppl.* 17: 24 (1970).
160. Schraw, W.P. y Vaughn, G.L. Trypanosoma lewisi: Alteration in membrane function in the rat. *Exp. Parasitol.* 48: 15 (1979).

161. Gutteridge, W.E. Trypanosoma cruzi : Recent biochemical advances. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 75: 484 (1981).
162. Boné, G.J. y Parent, G. Stearic acid, an essential growth factor for Trypanosoma cruzi. J. Gen. Microbiol. 31: 261 (1963).
163. Lowry, O. H., Rosebrough, H. J., Farr, A.L. y Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 (1951).
164. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London). 227: 680 (1970).
165. Hunter, W.M. In handbook of experimental immunology D.M. Weir, editor. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford. (1973).
166. Yanovsky, J.F. y Albado, G. Humoral and cellular response to Trypanosoma cruzi infection. J. Immunol. 109: 1159 (1972).
167. Yanovsky, J.F., Traversa, O.C., Taratuto, A.L., Schmuñis, G.A. González-Cappa, S.M. y Parodi, A.S. Trypanosoma cruzi: Experimental immunization of mice. Exp. Parasitol. 26: 73 (1979).
168. Kierszenbaum, F. y Howard, J.G. Mechanisms of resistance against experimental Trypanosoma cruzi infections: The importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. J. Immunol. 116: 1203 (1976).
169. Goding, J.W. Use of Staphylococcal protein A as an immunological reagent. J. Immunol. Meth. 20: 241 (1978).
170. Lancet, D., Ienman, D., Sjödaahl, J., Sjökuist, J. y Pecht, I. Interactions between Staphylococcal protein A and immunoglobulin domains. Biochem. Biophys. Res. Comm. 85: 608 (1978).

171. Ey, P. L., Prowse, J.J. y Jenkin, C.R. Isolation of pure IgG1 IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry*. 15: 429 (1978).
172. Heussar, Ch., Anderson, C. y Grey, H. Receptor for IgG: subclass specificity of receptors on different mouse cell types and the definition of two distinct receptors on a macrophage cell line. *J. Exp. Med.* 145: 1417 (1977).
173. Wolf, H., Fredman-Rabourden, Ch., Neaupots. y Gisler, R. Characterization and functions of T cell Fc $\gamma$  receptor. *Immunol. Rev.* 56: 55 (1981).
174. Alves, M. J. M. y Colli, W. Agglutination of Trypanosoma cruzi by concanavalin. *J. Protozool.* 21: 575 (1974).
175. Plessmann, C.E., Barbieri, C.L. y Jankevicius, J.V. Possible artifacts in the radiodination of surface proteins of Trypanosomatids. *J. Immunol. Methods.* 52: 245 (1982).
176. Sturtevant, J.E. y Balber, A.E. Externally disposed membrane polypeptides of intact and protease-treated Trypanosoma lewisi correlated with sensitivity to alternate complement pathway-mediated lysis. *Immunology.* 42: 869 (1983).
177. Bergmann, M., Fruton, J. S. The specificity of proteinases. *Adv. Enzymol.* 1: 63 (1941).
178. Desnuelle, P. Trypsin. The enzymes. Edited by Boyer. Lardy Myrback. Academic Press. New York. The Enzymes. 4: 119 (1960).
179. Ramos, G.C. Inmunosupresión inducida en el ratón por la infección experimental con Trypanosoma cruzi. Tesis Doctoral. Esc. de Ciencias Biológicas. IPN. (1980).

180. Heide, K. y Schwish, H.G. Salt fractionation of immunoglobulins. In D. M. Weir (ed.), Handbook of experimental immunologic. Vol.1. Immunochemistry: Blackwell Sci. Publications. L.T.D. Oxford. (1978).
181. The receptors. Vol. 1 General principles and procedures. Edited by R.D. O'Brien. Ithaca. New. York. (1980).
182. Camargo, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved cultured forms of Trypanosoma cruzi in a slide test. Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo. 8: 227 (1966).
183. Greenwood, F.C., Hunter, W.M. y Glover, J.S. The preparation of I-131 labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89: 114 (1963).
184. Anziano, D.F., Dalmaso, A. P. Lechuk, R. y Vázquez. Role of complement in immune lysis of Trypanosoma cruzi. Infect. Immun. 6: 860 (1972).
185. Strannegard, O. y Lycke, E. Properdin and the antibody effect on Toxoplasma gondii. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 66: 227 (1966).
186. Miller-Eberhard, H.J. Chemistry and reactions mechanism of complement. Adv. Immunol. 8: 1 (1968).
187. Mayer, M.M., Osler, A. G., Bier, O. G. y Heidelberger, M. The activating effect of magnesium and others cations on the hemolytic function of complement. J. Exp. Med. 84: 535 (1946).
188. Pellemer, L. , Blum, L. , Lepow, I. H. , Ross, D. A. , Todd, E. W.

- y Wardlaw, A.C. The properdin system and immunity. Science. 120: 279 (1954).
189. Pangburn M.K., Morrison, D.C., Schreiber, R.D., Müller-Eberhard, H.J. Activation of the alternative complement pathway: Recognition of surface structures on activators by bound C3b. J. Immunol. 124: 977 (1980).
190. Kipnis, T.L., David, J.R., Alper, C.A., Sher, A. y Dias DaSilva, W. Enzymatic treatment transforms Trypomastigotes of Trypanosoma cruzi into activators of alternative complement pathway and potentials their uptake by macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 602 (1981).
191. Rapp, H.J. y Borsos, T. Molecular basis of complement action. Appleton Century Crofts. New. York. (1970).
192. Götz, O. y Müller-Eberhard, H.J. The C3 activator system: and alternate pathway of complement activation. J. Exp. Med. 134: 90 (1971).
193. Wrightsman, R.A., Leon, W. y Manning, J.E. Variation in antigenic determinants specific to the infective stage of Trypanosoma cruzi. Infect. Immun. 53: 235 (1986).
194. Doyle, P. S., Devorak, J.A. y Engel, J.C. Trypanosoma cruzi. Quantification and analysis of the infectivity of cloned stocks. J. Protozool. 31: 280 (1984).
195. Postan, M., Devorak, J.A. y Mc Daniel, J.P. Studies of Trypanosoma cruzi clones in inbred mice. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 32: 497 (1983).

196. Andrew, E.B. y Sturtevant, J.E. . A surface glycoprotein of Trypanosoma lewisi binds immunoglobulin G from the serum of uninfected rats. *Infect. Immun.* 53: 420 (1986).
197. Giannini, S.H. y D'Alesandro, P. A. Isolation of protective antigens -- from Trypanosoma lewisi by using trypanostatic (ablastic) immunoglobulin G from the surface coat. *Infect. Immun.* 43: 617 (1984).
198. Rangel-Aldao, R., Comach, G., Allende, O., Cayama, E., Delgado, V., Piras, R., Piras, M., Enríquez, D. y Negri, S. Trypanosoma cruzi: polypeptide markers of epimastigotes and trypomastigotes. *Molec. Biochem. Parasitol.* 20: 25 (1986).
199. Libby, P., Alroy, J. y Pereira, M.E.A. A neuraminidase from Trypanosoma cruzi removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 77: 127 (1986).
200. Nickell, S.P., Gebremichael, A., Hoff, R. y Boyer, M.H. Isolation and functional characterization of murine T cell lines and clones specific for the protozoan parasite Trypanosoma cruzi. *J. Immunol.* 138: 914 (1987).
201. Britten, V. y Hudson, L. Isolation and characterization of human T-cell lines from a patient with Chagas' disease. *Lancet. Sep.* 21: 637 (1985).
202. Choramanski, L. y Kuhn, R.E. Use of parasite antigens and interleukin-2 to enhance suppressed. Immune responses during Trypanosoma cruzi infection in mice. *Infect. Immun.* 55: 403 (1987).
203. Snary, D. Receptors and recognition mechanisms of Trypanosoma cruzi. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 587 (1985)

204. Oliiaissi, M.A., Cornette, J. y Capron, A. Identification - and isolation of Trypanosoma cruzi trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Molec. Biochem. Parasitol.* 19: 201 (1986).
205. Oliiaissi, M.A., Cornette, J. y Capron, A. Trypanosoma cruzi modulation of parasite cell interaction by plasma fibronectin. *Eur. J. Immunol.* 15: 1096 (1985).
206. De Titto, E.H., Catterall, J.R. y Remington, J.S. Activity of the combinant tumor necrosis factor on Toxoplasma gondii and Trypanosoma cruzi. *J. Immunol.* 137: 1342 (1986).
207. Wirth, J.J. y Kierszenbaum, F. Stimulatory effect of retinoic acid on macrophage interaction with blood forms of -- Trypanosoma cruzi: involvement of transglutaminase activity. *J. Immunol.* 137: 3326 (1986).
208. Bertolini, M.C. y Lucca, F.L. Poly(A)-Containing RNA from the spleens of mice with Chagas'disease triggers in vitro macrophage resistance to Trypanosoma cruzi. *J. Protozool.* 33: 81 (1986).
209. Villalta, F. y Kierszenbaum, F. Effects of human colony-stimulating factor on the uptake and destruction of a pathogenic parasite (Trypanosoma cruzi) by human neutrophils. *J. Immunol.* 137: 1703 (1986).
210. Dwyer, D.M. Cell surface sacharides of Trypanosoma lewisi. I. Polycation induced cell agglutination and fine structure cytochemistry. *J. Cell Sci.* 19: 621 (1975).
211. Torpier, G., Capron, A. y Oliiaissi, M.A. Receptor for IgG (Fc) and human B-2 microglobulin on Schistosoma mansoni schistosomula. *Nature (London)*. 278: 447 (1979).

212. Auriault, C., OuaiSSI, M.A., Torpier, G., Eisen, H. y Capron, A. Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of Schistosoma mansoni schistosomula. Parasite Immunol 3: 33 (1981).
213. Eisen, H. y Tallan, I. Tetrahymena pyriformis recovers from antibody immobilization by producing univalent antibody fragments. Nature (London). 270: 514 (1977).
214. Stites, P.D. Pruebas inmunológicas de laboratorio. En Funderberg, H.H., Caldwell, J.L., Stites, P.D. y Wells, J.V. (eds.). Inmunología Clínica. El Manual Moderno, S.A. México, D.F. (1982).
215. Nogueira, N., Bianco, C. y Cohn, Z. Studies on the selective lysis and purification of Trypanosoma cruzi. J. Exp. Med. 142: 224 (1975).
216. Sher, A., Hieny, S. y Joiner, K. Evasion of the alternative complement pathway by metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi: Dependence on the developmentally regulated synthesis of surface protein and N-linked carbohydrate. J. Immunol. 137: 2961 (1986).
217. Scharfstein, J., Schechter, M., Senna, M., Peralta, J.M., Mendonca-Previato, L. y Miles, M.A. Trypanosoma cruzi: Characterization and isolation of a 57/51, 000 M.W. Surface glycoprotein (GP 57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. J. Immunol. 137: 1336 (1986).
218. Fick, R. B., Baltimore, R.S., Squier, S. V. y Reynolds, H. Y. IgG proteolytic activity of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 151: 589 (1985).
219. Langone, J.L. Protein A of Staphylococcus aureus and related immunoglobulin receptors produced by streptococci and pneumococci. Adv. Immunol. 32: 157 (1982).



220. Torpier, G., Capron, A. Ouaiissi, M.A. Receptor for IgG (Fc) and human B-2 microglobulin on Schistosoma mansoni schistosomula. Nature (London). 278: 447 (1979).
221. Widders, P.R., Stockes, C.R., Newby, T.J. y Bourne, F.J. Nonimmune binding of equine immunoglobulin by the causative organism of contagious equine metritis Taylorella equigenitalis. Infect. Immun. 48: 417 (1985).
222. Williams, C and Chase, M.N. Agglutination complement neutralization and inhibition. En Methods in immunology and immunochemistry. Academic Press. New York. 127-144.(1977).