

419
255



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**CHAGOMA EXPERIMENTAL EN
MODELO MURINO**

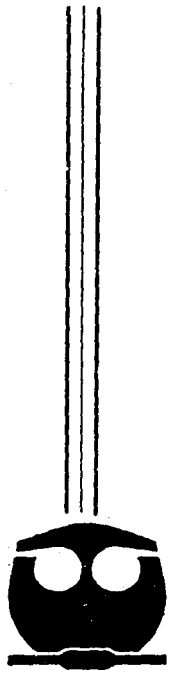
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

GUADALUPE JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1993



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 está 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.

INDICE

	PAGINA
1. OBJETIVOS	4
1.1 OBJETIVOS GENERALES	4
1.2 OBJETIVOS PARTICULARES	4
2. INTRODUCCION	5
2.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS. DEFINICION	5
2.2 CLASIFICACION TAXONOMICA DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
2.3 MECANISMO DE INFECCION	5
2.4 VECTOR TRANSMISOR	6
2.5 RESERVORIOS NATURALES DEL PARASITO	10
2.6 EPIDEMIOLOGIA	10
2.7 MORFOLOGIA Y CICLO DE VIDA DEL PARASITO	10
2.8 CICLO BIOLOGICO DE <i>T. cruzi</i> EN EL HOMBRE	13
2.9 PATOGENIA	15
2.10 CUADRO CLINICO	15
2.11 DIAGNOSTICO	19

3. ANTECEDENTES	22
3.1 INTERACCION CELULA HOSPEDERA-PARASITO	22
3.2 RESPUESTA INMUNE CONTRA <i>T. cruzi</i>	30
3.3 MECANISMOS DE PATOGENIA DEL PARASITO	40
3.4 DETECCION DEL PARASITO Y/O ANTIGENO TISULAR POR EL METODO DE INMUNOHISTOQUIMICA	51
4. MATERIAL Y METODOS	53
4.1 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>T. cruzi</i> CEPA NINOA	53
4.2 CULTIVO DE LA LINEA CELULAR DE MACROFAGOS HUMANOS P-388	57
4.3 TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA	61
4.4 ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA	63
4.5 INFECCION DE RATONES DE LA CEPA BALB/c	64
4.6 CURVA DE PARASITEMIA	66
4.7 OBTENCION DE ORGANOS DE LOS RATONES DE LOS GRUPOS CONTROL E INFECTADOS.	66
4.8 TECNICA HISTOLOGICA DE RUTINA	68
4.9 OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE LOS CORTES HISTOLOGICOS PARA LA TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA	70
4.10 TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA EN CORTES DE PARAFINA	70

5. RESULTADOS	73
5.1 CURVA DE PARASITEMIA	73
5.2 OBSERVACIONES ANATOMOPATOLOGICAS DE LOS RATONES INOCULADOS CON TRIPOMASTIGOTES METACICLICOS	75
5.3 OBSERVACIONES HISTOPATOLOGICAS EN LOS TEJIDOS TEÑIDOS CON HEMATOXILINA Y EOSINA	76
5.4 ESTANDARIZACION DE LOS SUEROS Y DEL COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA EMPLEADOS EN LA TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA	79
5.5 DETECCION DEL PARASITO Y/O ANTIGENO TISULAR POR EL METODO DE INMUNOHISTOQUIMICA EMPLEANDO EL ANTICUERPO POLICLONAL	81
5.6 ESTUDIO SEMICUANTITATIVO DE IDENTIFICACION DEL PARASITO EN TEJIDOS PROCESADOS POR EL METODO HISTOLOGICO DE RUTINA Y POR LA TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA EMPLEANDO EL ANTICUERPO POLICLONAL ANTI-EPIMASTIGOTES	88
5.7 ESTUDIO COMPARATIVO DEL METODO DE INMUNOHISTOQUIMICA EMPLEANDO EL ANTICUERPO POLICLONAL Y EL MONOCLONAL ANTI AMASTIGOTES	91
6. ANALISIS DE RESULTADOS	94
7. CONCLUSIONES	110
8. BIBLIOGRAFIA	113

"CHAGOMA EXPERIMENTAL EN MODELO MURINO"

1. OBJETIVOS:

1.1 OBJETIVOS GENERALES:

Describir la cinética de inflamación durante la etapa primaria o fase aguda postinfección del Chagoma experimental en modelo murino.

1.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Realizar la curva de parasitemia de un lote de ratones susceptibles (BALB/c) infectados con tripomastigotes metacíclicos de triatomas.
- Correlacionar los datos de la curva de parasitemia con los estudios anatómo e histopatológicos de distintos órganos (ganglio linfático regional, piel, hígado, bazo, músculo estriado y corazón) a diferentes tiempos postinoculación.
- Revisar cortes de tejido teñidos con H y E y tratados por el método de Inmunohistoquímica (IHQ) a Microscopía óptica, para detectar al Parásito y/o antígeno.
- Comparar los resultados obtenidos en la técnica de IHQ cuando se emplee un anticuerpo monoclonal anti-amastigote y un policlonal anti-epimastigote.
- Evidenciar los posibles mecanismos de patogenia durante la fase aguda de la enfermedad.

2. INTRODUCCION

2.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS.

La enfermedad de Chagas tiene un gran impacto sobre la salud pública latinoamericana debido a su amplia distribución geográfica, elevada prevalencia, disminución de la esperanza de vida y particularmente sobre la calidad de ésta, ya que es una enfermedad invalidante lo que a su vez repercute sobre la economía de los pueblos que la sufren.

DEFINICION: La enfermedad de Chagas-Mazza (conocida también como enfermedad de Chagas-Mazza-Romaña, tripanosomiasis americana o tripanosomiasis cruzi), es una protozoosis cuyo agente etiológico es *Trypanosoma cruzi* parásito hemofagelado intracelular del sistema mononuclear fagocítico que ataca particularmente el miocardio, la musculatura lisa y el SNC. (Pub Téc del INDRÉ).

2.2 CLASIFICACION TAXONOMICA DE *T. cruzi*:

Pertenece al:

Phylum:	<i>Protozoa</i>
Subphylum:	<i>Sarcosmagophora</i>
Superclase:	<i>Mastigophora</i>
Clase:	<i>Zoomastigophora</i>
Orden:	<i>Kinetoplastida</i>
Suborden:	<i>Trypanosomatina</i>
Género:	<i>Trypanosoma</i>
Sección:	<i>Stercoraria</i>
Especie:	<i>cruzi</i> (Velasco C., et al, 1990).

2.3 MECANISMOS DE INFECCION:

En el hombre la infección puede ser congénita o adquirida. Los principales mecanismos de transmisión de la parasitosis comprenden:

2.3.1 Las defecaciones del artrópodo sobre la piel no indemne, donde el artrópodo al picar en zonas descubiertas de la piel del hombre y los mamíferos durante el sueño, elimina sus hecos con los tripomastigotes metacíclicos que penetran por el sitio de la picadura, a través de la piel escoriada o por las mucosas.

2.3.2. Las transfusiones sanguíneas, ya que *T. cruzi* se mantiene vivo aún en refrigeración hasta por dos meses.

2.3.3. La ingestión y manipulación de carnes semicrudas o crudas de animales infectados.

2.3.4. *In utero* o vía transplacentaria, que determina la infección congénita. Una madre infectada puede transmitir los tripomastigotes sanguíneos al producto durante el segundo trimestre de la gestación por un aumento en la permeabilidad de la placenta.

2.3.5. La leche materna.

2.3.6. La falta de cuidado en el laboratorio.

2.3.7. El trasplante de órganos (Costa R., et al, 1991).

2.4 VECTOR TRANSMISOR:

El ciclo biológico de *T. cruzi* está involucrado con vertebrados que fungen como Hospederos y reservorios y con un artrópodo vector, el triatomino llamado "vinchuca y chipo" en los países del cono sur; mientras que en México se le conoce como "Pick" (en lengua Maya), "Chinche de Compostela, talaje, chinche hocicona, besucona, voladora", etc.

Los triatomíinos son insectos pertenecientes al:

Orden:	<i>Hemiptera</i>
Familia:	<i>Reduviidae</i>
Subfamilia:	<i>Triatominae</i>

repartidos en seis géneros y ciento catorce especies.

Se distribuyen en el continente americano desde los 43° de latitud norte a los 49° de latitud sur.

Estos insectos miden entre 1.0 y 6.5 cm de longitud. Poseen un cuerpo segmentado en cabeza, tórax y abdomen, y tres pares de patas que nacen del tórax. Casi todos los triatomíinos adultos tienen un par de alas membranosas.

Son animales de actividad nocturna; durante el día reposan en sus criaderos naturales o en las hendiduras de paredes, techos, etc., de la habitación humana. Durante la noche se acercan a las camas de las

personas dormidas, son hematófagos y succionan cantidades variables de sangre para su alimentación, las cuales fluctúan entre 0.5 y 6.0 ml (Pub Téc INDRE).

De acuerdo a la distribución geográfica en la República Mexicana, se presentan diversas especies de triatominos (Velasco C., et al, 1988), así pues existen:

25 especies del género *Triatoma*

- 1 especie del género *Rhodnius* (*R. prolixus*)
- 1 especie del género *Panstrongylus* (*P. vetotuberculatus*)
- 1 especie del género *Belminus* (*B. costarricensis*)
- 2 especies del género *Eratyrus* (*E. cuspidatus* y *E. mucronatus*)
- 2 especies del género *Paratriatoma* (*P. hirsuta*)
- 1 especie del género *Dipetalogaster* (*D. maximus*)

Por su mayor distribución geográfica y domesticidad, las especies mexicanas de mayor importancia son: *R. prolixus*, *T. barberi*, *T. dimidiata*, *T. phyllosoma*, *T. longipennis* y *T. picturata*.
(Mapa No. 1).

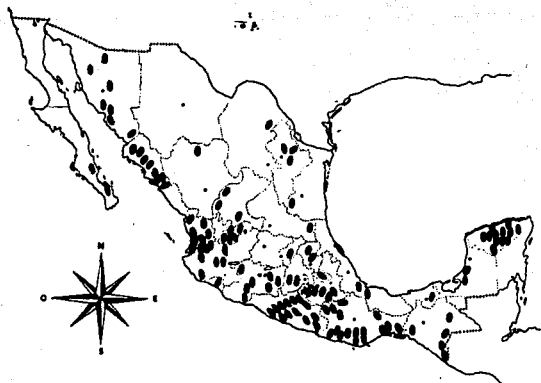
2.4.1. CICLO DE TRANSMISION DE *T. cruzi* POR LOS TRIATOMINOS:

Realizan tres diferentes ciclos, en relación directa con su antropofilia:

2.4.1.1. Ciclo silvestre o enzoótico: triatominos silvestres que sólo ocasionalmente pican al hombre.

2.4.1.2. Ciclo peridoméstico, intermedio o zoontrópico: aquellos que habitan en las cercanías de la vivienda humana y que han iniciado la colonización de ésta.

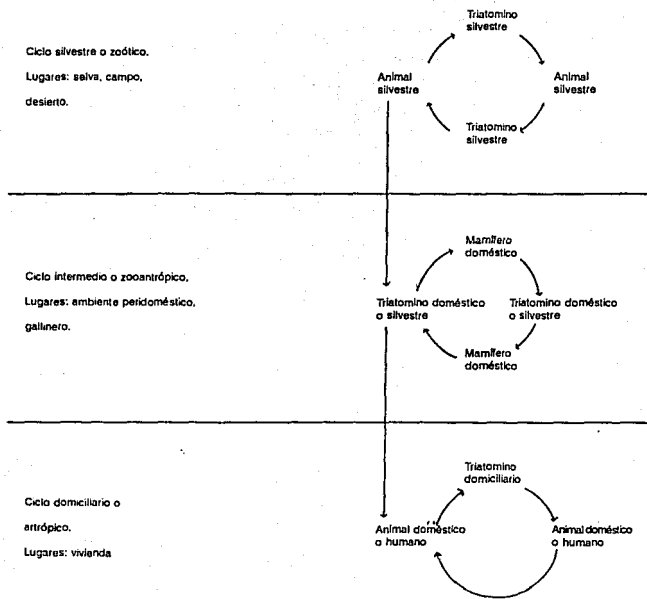
2.4.1.3. Ciclo doméstico, domiciliario o antropológico: son triatominos que tienen como principal fuente de alimento al hombre y en menor grado animales domésticos o silvestres (murciélagos, tlacuaches, ciertos roedores, etc.) que viven en la habitación humana o penetran en ella. De ahí que el hombre con malas condiciones de vida en zonas endémicas sea fácilmente infectado por la picadura de los triatominos (Fig. 1). (Carcavallo R., 1975).



MAPA No. 1

● LOCALIDADES EN DONDE SE HA ENCONTRADO TRIATOMÍDEOS INFECTADOS CON T. CRUZI

FIGURA 1. LOS TRIATOMINOS Y SUS CICLOS EN LA NATURALEZA



2.5 RESERVORIOS NATURALES DEL PARASITO:

La infección es principalmente una enzootia, por lo que los animales silvestres peridomésticos actúan como reservorios, entre otros se han reportado a:

<i>Rattus norvegicus</i>	(rata)
<i>Neotomma sp</i>	(rata de campo)
<i>Peromyscus sp</i>	(ratones de campo)
<i>Dasyprocta novemcinctus</i>	(armadillo)
<i>Didelphis marsupialis</i>	(lucuaque)
<i>Canis familiaris</i>	(perro)

2.6 EPIDEMIOLOGIA:

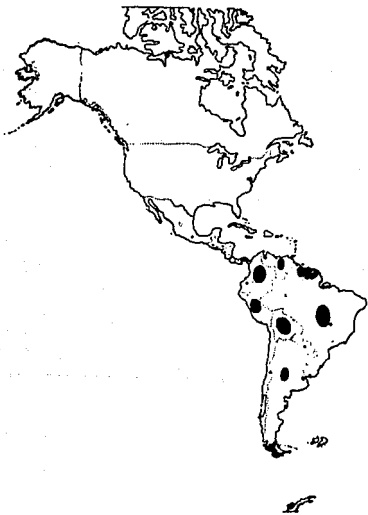
La tripanosomiasis americana es una enfermedad oriunda y exclusiva de este continente. Su distribución geográfica comprende desde el sur de los Estados Unidos de América, donde se han registrado casos autóctonos, hasta la provincia de Río Negro, en el sur de Argentina.

En Brasil se considera a la enfermedad de Chagas como un problema serio, siendo las partes del Sur, Este y Noroeste del país las más afectadas (Mapa No. 2).

Los estados de la República Mexicana comprometidos principalmente son: Oaxaca, Chiapas, Jalisco, Nayarit, Michoacán, Guerrero, Zacatecas, Yucatán, Veracruz, Estado de México, Sonora, y en menor grado: Aguascalientes, Morelos, Colima, Campeche, Durango, Guanajuato, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí y Sinaloa [(Pub Téc INDRE., Velasco C., et al, 1990; Velasco C., et al, 1986) Mapa No. 3]

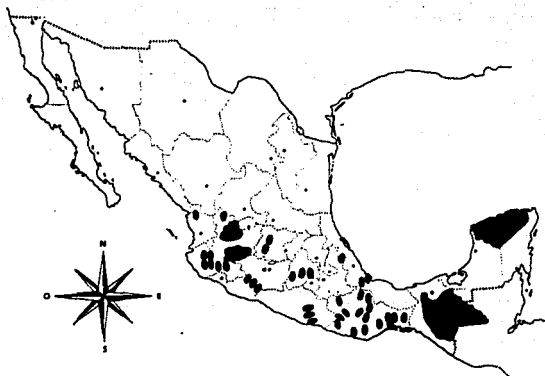
2.7 MORFOLOGIA Y CICLO DE VIDA DEL PARASITO:

Trypanosoma cruzi se presenta en la naturaleza en tres estadios morfológicos principales que son: tripomastigote, epimastigote y amastigote. La forma de epimastigote, observada en el triatominos, mide de 15 a 20 μ de longitud, el cinetoplasto migra desde la porción anterior del cuerpo, hasta la posición posterior al núcleo (posición anteronuclear), pero todavía no se establece en su sitio final, el flagelo forma una pequeña membrana ondulante. Este estado morfológico se multiplica en el intestino de los triatominos, para dar lugar a los tripomastigotes



MAPA NO. 2

● PRINCIPALES ZONAS ENDEMICAS DE TRIPANOSOMIASIS
AMERICANA



MAPA No. 3 ● PRINCIPALES ZONAS ENDEMICAS DE TRIPANOSOMIASIS AMERICANA

metacíclicos. La fase de tripomastigote metacíclico, contenida en la materia fecal del triatómino infecta al Hospedero vertebrado penetrando por la solución de continuidad causada por la picadura del insecto, por las mucosas y probablemente por la piel ínterna. Dentro del Hospedero penetra a células no fagocíticas y macrófagos (Mφs); en éstos últimos si logra sobrevivir, se redondea y se convierte en amastigote, que mide de 2-7 μ de diámetro, sin flagelo libre, presenta un núcleo grande y excéntrico y un cinetoplasto en forma de bastón incurvado a partir del cual se origina el flagelo en las diversas formas evolutivas, se reproduce rápidamente por bipartición en el citoplasma, rompe la célula y penetra a otras (Tay J., et al, 1980).

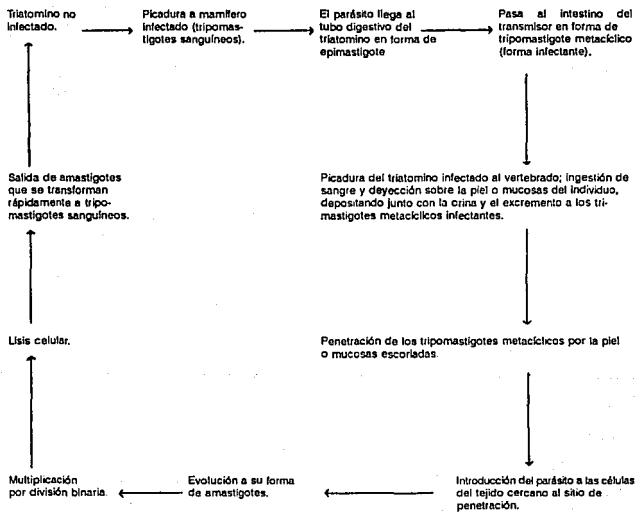
Este estado poco después se transforma en tripomastigote sanguíneo, que es flagelado, de cuerpo alargado, que mide unas 20 a 25 μ de longitud y generalmente esta incurvado en forma de C, U o S. Presenta un gran núcleo de centro vesiculoso y cinetoplasto subterminal, del cual nace una membrana ondulante que se convierte en flagelo. El citoplasma es poco granuloso y cuando se tiñe al parásito con Giemsa o Wright, se ve azul pálido, el núcleo color carmín y el cinetoplasto morado (Tay J., et al, 1980).

En esta fase el parásito se encuentra en la sangre de los mamíferos y en el intestino posterior de los triatóminos. Según Romaña y otros autores en el vertebrado parasitado ocurre de manera simultánea un ciclo vital de progresión fusiforme, que termina en tripomastigote delgado y otro de progresión orbicular que origina tripomastigotes gruesos (Romaña C., 1963; Silva L., 1959; Brener Z., 1975).

Brener propone que ambas formas son simplemente resultado del polimorfismo del género *Trypanosoma*, y que difieren en su capacidad de penetrar a las células del vertebrado, en la resistencia a la inmunidad del Hospedero y especialmente en la eficiencia para infectar al insecto transmisor. Así, las formas delgadas penetran con rapidez en las células del Hospedero, son fácilmente destruidas por el sistema inmunológico y es difícil que parasiten al invertebrado cuando este las ingiere. Sucede todo lo contrario con los tripomastigotes gruesos, que al parecer son los únicos capaces de infectar a los triatóminos (Silva L., 1959; Brener Z., 1963; Brener Z., 1975).

2.º CICLO BIOLÓGICO DEL *T. cruzi* EN EL HOMBRE

CICLO BIOLÓGICO DE *T. cruzi*



2.9 PATOGENIA:

El Parásito agrede al Hospedero de varias maneras, siendo una de las primeras formas, la destrucción de las células parasitada, entre ellas las del sistema mononuclear fagocítico y de otros tejidos, por otra parte las células de respuesta inflamatoria causan también un daño tisular considerable. En la cronicidad de la enfermedad, se observan lesiones causadas probablemente por fenómenos de autoinmunidad, así como reacciones de Hipersensibilidad tipo II, la cual se presenta en algunos individuos que desarrollan dichos procesos autoinmunes e Hipersensibilidad tipo III causada por los productos de desintegración de los parásitos y los tejidos dañados, que se depositan como complejos inmunes sobre estructuras tisulares tales como los glomérulos del riñón, activando el complemento vía clásica. (Brenner Z., 1975).

Los parásitos invaden gran cantidad de tejidos y órganos, tales como: corazón, cerebro, hígado, bazo, ganglios linfáticos, músculos, etc., produciendo lesiones y sintomatologías diversas.

2.10 CUADRO CLINICO:

A la penetración de *T. cruzi* en el organismo, sigue un período de incubación que suele durar entre 4 a 14 días, tiempo en el que los parásitos sufren las transformaciones morfológicas mencionadas y se introducen a las células.

Las manifestaciones clínicas que sufre el Hospedero vertebrado, particularmente el humano se pueden resumir de la siguiente manera:

ENFERMEDAD DE CHAGAS:

2.10.1 ADQUIRIDA

- 2.10.1.1. FASE AGUDA: - CHAGOMA DE INOCULACION
- COMPROMISO VISCERAL
- 2.10.1.2. FASE INDETERMINADA
- 2.10.1.3. FASE CRONICA: CARDIOPATIA CHAGASICA CRONICA
- 2.10.1.4. OTRAS FORMAS CLINICAS

2.10.2. CONGENITA

2.10.1 ADQUIRIDA (Pub Téc INDRE)

2.10.1.1. FASE AGUDA:

Existe un período de incubación que generalmente es asintomático y oscila de 4 a 14 días. Algunas veces cuando la transmisión fue por triatomíneos aparecen las manifestaciones de puerta de entrada con el signo de Romaña (complejo oftalmoganglionar) que consiste en una blefarítis indolora, bipalear, unilateral, eritemo-papulosa con edema elástico, reacción conjuntival y ganglionar satélite o bien chagomas de inoculación en otras partes del cuerpo, los que se pueden definir como nodulaciones duras, eritemo-papulosas que pueden presentar pequeñas vesículas. Estas lesiones no supuran y evolucionan lentamente (2 a 4 semanas).

El crecimiento de los ganglios linfáticos satélites es otro signo importante. En el caso del complejo oftalmoganglionar son palpables los ganglios periarticulares y los de las cadenas cervicales, cuando la puerta de entrada ocurrió en otra parte del cuerpo, los ganglios vecinos son los que reaccionan. La adenopatía puede persistir durante meses.

La fiebre es el signo más importante en esta etapa, observándose en el 95% de los casos agudos. La temperatura se eleva oscilando entre 37° y 38°C, con un perfil intermitente e irregular, generalmente con picos vespertinos. A veces puede ser continua y elevada, relacionándose su intensidad con la gravedad de la infección. Generalmente la fiebre se acompaña de cefalea, astenia, malestar general, mialgias, artralgias e hiporexia. Los niños frecuentemente se muestran irritables, observándose postración en los casos más graves. La duración del período febril guarda relación con la parasitemia, persistiendo de 2 a 4 semanas después de detectados los tripomastigotes en sangre. La caída de la curva térmica generalmente ocurre por lisis celular. El edema subcutáneo se observa en más de la mitad de los casos agudos clínicos, presentándose inicialmente en la cara y progresando hacia el tronco y extremidades. Es caliente, elástico e indoloro, generalmente discreto o moderado. Según Rassi y Neto se debe al incremento de la permeabilidad capilar periférica.

La Hepatoesplenomegalia se presenta en el 30-40% de los casos con repercusiones clínicas y ocurre en forma precoz pero discreta. El Hígado suele aumentar rápida e intensamente de volumen si se instala una insuficiencia cardíaca aguda.

La meningoencefalitis es rara y de pronóstico sombrío, se presenta principalmente en lactantes. En estos casos son comunes los fenómenos convulsivos generalizados, con crisis frecuentes o espaciadas, vómitos y afecciones sensoriales. En casos menos graves al compromiso del SNC se limita a una irritación meníngea fugaz manifestándose como contracturas o parálisis localizadas (Pub Téc INDRE)

El encéfalo puede presentar parasitismo de las células gliales y muy rara vez de las neuronas (Brenner Z., 1975).

La cardiopatía en la enfermedad de Chagas aguda parece ser la lesión anatomopatológica más constante, en pacientes que en vida presentan signos mínimos de compromiso cardíaco. En el pericardio se observa un aumento de líquido como consecuencia de una pericarditis fibrosa (Brenner Z., 1975).

Los casos graves de miocardiopatía chagásica aguda pueden evolucionar hacia la insuficiencia cardíaca congestiva, a veces, de instalación súbita y curso violento que conduce a la muerte en cuestión de horas o días.

El ECG suele ser normal en más de la mitad de los casos agudos, presentando apenas taquicardia sinusal.

El pronóstico en la fase aguda generalmente es bueno y el cuadro remite espontáneamente entre los 30 y 90 días posteriores a su instalación.

2.10.1.2. FASE INDETERMINADA:

Durante la fase indeterminada desaparece la sintomatología y el individuo se considera curado. Sin embargo, la serología es positiva y con frecuencia se les encuentran datos electro y ecocardiográficos que sugieren miocarditis. Según Laranja y col. se trata de la forma al más frecuente e importante desde el punto de vista epidemiológico. Se caracteriza por la positividad serológica en un individuo asintomático con electrocardiograma (ECG) y radiografías normales para corazón, esófago y colon. Un porcentaje elevado de este tipo de casos evolucionan a las formas cardíacas o digestivas después de este estado, aunque un número aproximado del 70% permanece indefinidamente en la "etapa indeterminada".

2.10.1.3. FASE CRÓNICA:

Esta fase se manifiesta en personas de 20 a 50 años. Puede ocurrir que en las fases iniciales el individuo sea hipo o asintomático, e inclusive el examen físico no revele ninguna anomalía o apenas una cardiomegalia discreta.

En esta fase el parasitismo y la parasitemia sufren un considerable descenso, y se hace difícil el hallazgo del agente etiológico en la sangre y en los tejidos (Brener Z., 1975).

El compromiso se centra fundamentalmente en el miocardio y en el tubo digestivo. En estos casos, se desarrollan enormes cardiomegalias por dilatación e hipertrofia del miocardio, con zonas de adelgazamiento de la pared ventricular que pueden ocasionar un aneurisma, sobre todo en la punta del corazón (Brener Z., 1975).

La miocardiopatía chagásica crónica (CCC) avanza insidiosamente hacia la insuficiencia cardíaca, pero aunque en las áreas endémicas frecuentemente se ve interrumpida por la muerte súbita debido a la fibrilación ventricular, alrededor del 40% de los casos muestran una evolución benigna permitiendo una sobrevida del enfermo hasta de 60 o más años de edad.

El daño comienza siempre en un período subclínico, con alteraciones del ECG, el cual generalmente indica un bloqueo completo de la rama derecha del Haz de His. (Brener Z., 1975). Si el paciente se hace sintomático entonces el cuadro clínico varía considerablemente de acuerdo al grado de insuficiencia cardíaca o al tipo de alteración del ritmo. Los síntomas más comunes son las palpitaciones y la disnea, precordalgias y síntomas originados por éstasis visceral, particularmente hepática.

En las fases finales de la insuficiencia cardíaca es común que junto con los signos de congestión general derecha, se instalen también manifestaciones de insuficiencia izquierda.

2.10.1.4. OTRAS FORMAS CLINICAS:

Las megavisceras (megaeófago y megacolon) son frecuentes en algunas regiones de Brasil, se deben a la disfunción motora de los segmentos del esófago y colon debido a la denervación parasimpática intramural. En México se han descrito ya varios casos de cada una de estas entidades clínicas, en los estados de Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Jalisco y Tabasco.

En la CCC existen otras alteraciones viscerales debidas a la acción directa del parásito, a la denervación, a la éstasis sanguínea, a los fenómenos inmunes y autoinmunes. Los órganos así afectados pueden ser estómago, intestino delgado (duodeno), hígado, vías biliares extrahepáticas, páncreas (que por ser una glándula además de endócrina, exócrina se ve afectado directamente cuando hay daño del SNC), bronquios, pulmón, tracto

urinario y además produce alteraciones secretoras a nivel de glándulas salivales y sudoríparas ya que éstas dependen directamente del SNC. La sialoadenopatía, es una hipertrofia bilateral de las parótidas que se manifiesta clínicamente por sialorrea, y es causada por la denervación parasimpática de la glándula.

2.10.2. CONGENITA:

El paso de *T. cruzi* al feto, durante la gestación determina un cuadro clínico caracterizado por el nacimiento prematuro, hepatoesplenomegalia y compromiso variable del SNC y del miocardio.

La enfermedad de Chagas congénita produce una elevada mortalidad, especialmente en aquellos niños que presentan la sintomatología al nacer. En otros, la causa inmediata del deceso suele ser una enfermedad concomitante sobre todo la bronconeumonía, dado que en la mayoría, se desarrolla una distrofia grave, con profundas alteraciones del sistema inmune.

2.11 DIAGNOSTICO:

La observación y aislamiento del parásito en muestras orgánicas del paciente, confirman el diagnóstico. Esto es fácil en la etapa aguda, pero muy difícil en la crónica. Por ello, durante esta etapa se consideran buenas alternativas para el diagnóstico las pruebas serológicas asociadas al ECG, al ecocardiograma, etc. Desde luego, en el diagnóstico son importantes los aspectos clínicos y epidemiológicos junto con los estudios de gabinete y de laboratorio.

2.11.1 DIAGNOSTICO DIFERENCIAL:

La enfermedad aguda puede ser confundida con varias enfermedades febriles, principalmente paludismo y kala-azar. Sugieren el diagnóstico las manifestaciones de puerta de entrada, la fiebre elevada continua con exacerbación vespertina de aproximadamente un mes de duración que suele tener dos picos en el día y acompañada de taquicardia independiente de la temperatura; coexisten edemas duros e incluso, anasarca que aparece frecuentemente.

2.11.2. ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS:

Los antecedentes del caso, el estudio de campo y la vivienda orientan y fundamentan el diagnóstico. En habitantes de las regiones endémicas debe pensarse en la posibilidad de tripanosomiasis crónica al identificar miocarditis, insuficiencia cardíaca y visceromegalias.

2.11.3. ESTUDIOS DE LABORATORIO:

En el período agudo de la enfermedad generalmente hay leucocitosis moderada con predominio de mononucleares (monocitos y linfocitos). La linfocitosis puede ser muy elevada, particularmente en niños. Los eritrocitos y la hemoglobina descienden a veces en forma importante, aunque por lo común sólo se aprecia anemia moderada. Ocurre además hipergammaglobulinemia.

El diagnóstico parasitológico está basado en las pruebas: directas, que demuestran la existencia de *T. cruzi*, y en las indirectas, que consisten en reacciones serológicas.

2.11.3.1. DIAGNOSTICO PARASITOLÓGICO DIRECTO:

2.11.3.1.1. Examen microscópico directo de sangre fresca: se usa en la fase aguda, es el método empleado para el diagnóstico rápido de las formas congénitas.

2.11.3.1.2. La gota gruesa: es un método para buscar parásitos sanguíneos, que requiere de hemolizar los eritrocitos, para que su acumulación no impida la observación de los parásitos.

2.11.3.1.3. El método de centrifugación de la sangre fresca o técnica de Strout: en donde se utiliza sangre venosa total o el suero. Se usa principalmente para la fase final de la etapa aguda cuando los parásitos ya no son tan abundantes en la sangre.

2.11.3.1.4. El xenodiagnóstico: basado en la multiplicación activa de *T. cruzi* en el tubo digestivo de los triatominos. El Xenodiagnóstico sirve para el diagnóstico de la infección en la fase aguda y crónica.

2.11.3.1.5. Hemocultivo.

2.11.3.1.6. Inoculación en animales de laboratorio.

2.11.3.2. DIAGNOSTICO PARASITOLÓGICO INDIRECTO (SEROLOGIA): es el diagnóstico inmunológico que evidencia los anticuerpos (Acs) en el probable infectado chagásico. Los métodos serológicos más utilizados son: HAI (Hemaglutinación Indirecta), RFC (Reacción de Fijación de Complemento), IFI (Inmunofluorescencia Indirecta), AD (Aglutinación Directa) y las técnicas inmunoenzimáticas. La RFC debido a sus dificultades técnicas y la tardanza de los resultados ha caído en desuso.

El antígeno utilizado en HAI, RFC y en algunas variantes de ELISA es el lisado de epimastigotes de *T. cruzi* provenientes de cultivo. En cambio, en la IFI, AD y en algunas de las Técnicas inmunoenzimáticas se utilizan epimastigotes de medio de cultivo (Brener Z., 1975).

3. ANTECEDENTES:

3.1 INTERACCION CELULA HOSPEDERA-PARASITO

Acerca de los factores que involucran la resistencia o susceptibilidad de la célula hospedera durante la infección por *T. cruzi* aún se sabe poco, por ello un análisis más detallado de las interacciones de la célula hospedera-parásito podría proveer los fundamentos para determinar los mecanismos de patogenia durante la infección.

Muchos investigadores estudiaron los mecanismos de penetración, desarrollo intracelular y destino del parásito en una gran variedad de células hospederas tanto fagocíticas como no fagocíticas, empleando técnicas de microscopía óptica y electrónica, obteniendo en algunas ocasiones resultados contradictorios.

Se sabe que *T. cruzi* requiere de una localización intracelular para evolucionar a su forma de amastigote, necesaria para la multiplicación del parásito en las células del hospedero mamífero. Así la interacción de las formas invasivas (tripomastigotes) y las células del hospedero, asume particular importancia para el establecimiento y diseminación de la infección.

En 1973 Dvorak y Hyde, realizaron uno de los primeros estudios al respecto, en el que investigan la relación de la célula hospedera de mamíferos vertebrados con el parásito en su estado de tripomastigote sanguíneo, para ello emplearon cultivos celulares secundarios de músculo esquelético de embrión bovino y la línea celular HeLa, donde observaron que los eventos durante la interacción *in vitro* de *T. cruzi* con las células del hospedero se podían clasificar en cinco fases, las cuales facilitarían la investigación de numerosos parámetros fisiológicos, siendo éstas:

- 1) Penetración de los tripomastigotes a la célula hospedera.
- 2) Transformación de los tripomastigotes a amastigotes.
- 3) Reproducción de los amastigotes.
- 4) Diferenciación de los amastigotes a tripomastigotes sanguíneos.
- 5) Muerte de la célula hospedera y liberación de los tripomastigotes (Dvorak J., et al, 1973; Hyde T., et al, 1973).

1) FASE DE PENETRACION:

Los tripomastigotes sanguíneos se adhieren al glicocálix de la célula hospedera, penetrando activamente y formando un surco en el plasmalema, posteriormente se dirigen hacia el citoplasma con movimientos rápidos del flagelo; aparentemente no existe una relación directa entre la locomoción de los tripomastigotes y la capacidad de infectar las células hospederas. Estas células pueden sufrir mult infecciones con un número promedio de 8-10 parásitos, lo que indica que la penetración de un parásito en la célula hospedera no impide la de otros. Por otro lado, el número y localización tisular de los parásitos varía en función de la cepa empleada, mientras que la variación en la capacidad de los tripomastigotes para penetrar diferentes tipos de células del vertebrado, está relacionada con su tropismo tisular (Dvorak J., et al, 1973; Hyde T., et al, 1973).

2) FASE DE TRANSFORMACION DE LOS TRIPOMASTIGOTES EN AMASTIGOTES:

Esta fase requiere aproximadamente de 3 h para que se lleve a cabo y comprende una transición morfológica de los tripomastigotes a amastigotes, en donde el primer cambio es un adelgazamiento gradual de la parte posterior del parásito, la cual se ve acompañada por un movimiento flagelar, en donde éste se dispone frecuentemente alrededor de su cuerpo, que migra a la región perinuclear de la célula hospedera; durante este proceso, la motilidad disminuye importantemente (Dvorak J., et al, 1973; Hyde T., et al, 1973).

3) REPRODUCCION DE LOS AMASTIGOTES:

Previo a la reproducción de los amastigotes, se observa que éstos persisten en forma latente en fase *lag* dentro del citoplasma de la célula hospedera por un periodo de tiempo de 26 a 44 h aproximadamente, durante el cual se presenta un incremento gradual en el tamaño del parásito. El núcleo del amastigote es típicamente observado cuando no se encuentra en división, sin embargo, cuando el parásito entra en división, el núcleo se hace indistinguible del citoplasma. El proceso se continúa por fisión binaria del cinetoplasto en un tiempo aproximado de 25 h; las divisiones subsiguientes ocurren asincrónicamente en la población y el número de generaciones producidas en promedio es de 9.

El número de parásitos presentes en la célula hospedera se encuentra regulado por su ciclo mitótico; las células con una carga baja de parásitos en su citoplasma pueden presentar una cario y una citocinesis normal, en la que la distribución de los parásitos en las células hijas es al azar. La carga moderada de parásitos inhibe la citocinesis aunque no la cariocinesis de la célula hospedera, lo que genera células con una mitosis atípica. Una

carga alta de parásitos inhibe tanto la carió como la citocinesis, lo cual quizá se deba a una obstrucción en la función normal del aparato mitótico. Por otra parte, el número de parásitos producidos es directamente proporcional al número de parásitos que penetraron en la célula (Dvorak J., et al, 1973; Hyde T., et al, 1973).

4) DIFERENCIACION DE LOS AMASTIGOTES A TRIPOMASTIGOTES:

Esta fase se inicia entre el 5º y 6º día post-infección, la población de parásitos no se diferencia sincrónicamente, por ello pueden ser encontradas todas las formas transicionales existentes entre los amastigotes y los tripomastigotes en una sola célula.

La diferenciación del parásito involucra una elongación gradual del cuerpo y del flagelo lo cual se denomina, progresión fusiforme (Dvorak J., et al, 1973). En las fases transicionales tempranas, se observa un estadio similar al de promastigote, en donde el cinetoplasto migra a la posición posterior del cuerpo y la membrana ondulante comienza a formarse; los resultados de la maduración generan la aparición de los tripomastigotes anchos, los cuales poco a poco darán origen a los delgados, durante esta fase el parásito llega a ser progresivamente más activo (Dvorak J., et al, 1973; Hyde T., et al, 1973).

5) FASE DE LIBERACION DE LOS TRIPOMASTIGOTES:

Aproximadamente a los 7 días post-infección, el citoplasma de la célula hospedera se encuentra lleno de tripomastigotes, se observa una degeneración del núcleo que presenta grandes agregados de cromatina y aparecen finos filamentos en el citoplasma los cuales se proyectan hacia la periferia de la célula limitando con la membrana celular. La salida del parásito de la célula hospedera muerta ocurre de manera extremadamente rápida (en menos de 1 min), sin embargo, no todos los parásitos logran salir del citoplasma. Si la célula infectada está en contacto con otra célula, la salida de los tripomastigotes puede resultar en una infección inmediata de las células adyacentes.

Continuando con la misma línea de investigación, en 1976 Nogueira y cols., estudiaron la interacción de los Mφs y otros cultivos de células no fagocíticas tales como la línea celular HeLa, cultivos secundarios de embrionfibroblastos y células L, con los estadios de tripomastigotes y epimastigotes, donde observaron tanto a microscopía óptica como electrónica, que los epimastigotes se adherían por el cuerpo a la superficie celular, iniciándose así el proceso de ingestión que tenía un tiempo de duración de 1 h, al final de este proceso se

formaba la vacuola parasit6fora donde se observaba a6n con movilidad al par6sito, minutos despu6s 6ste quedaba inm6vil y al cabo de 24 h ya no era posible hallar detalle morfol6gico alguno del epimastigote (Nogueira N., et al, 1976).

Con los tripomastigotes se observ6 un proceso de adhesi6n, ingest6n e internalizaci6n similar al anterior, pero difer6a en que los tripomastigotes eran capaces de sobrevivir a la interacci6n con la vacuola fagoc6tica de los Mφs y de multiplicarse en el citoplasma.

En los cultivos de c6lulas L, de embriofibroblastos y c6lulas HeLa, se encontr6 que los epimastigotes se adherieron a la superficie de la membrana celular, sin embargo su penetraci6n al citoplasma no se llev6 a cabo debido a que 6stas son formas no infectantes; en cambio las formas de tripomastigotes penetran activamente al citoplasma de estas c6lulas.

De este modo, se observ6 que la penetraci6n de epimastigotes y tripomastigotes a las c6lulas del hospedero mam6fero ocurr6a por fagocitosis, cuando se trata de una c6lula fagoc6tica tal como el Mφ ya sea libre o fijo y por la entrada o penetraci6n de los tripomastigotes a las c6lulas no fagoc6ticas.

Estudios posteriores realizados por Kierszenbaum y Wirth, aportaron datos a nivel molecular acerca de la interacci6n de los Mφs peritoneales de rat6n (MφPR) con el par6sito y determinaron que los Mφs sintetizaban y liberaban fibronectina (FN), para la que exist6a receptor de superficie de membrana espec6fico en ambos; estos receptores glicoproteicos eran capaces de modular la adherencia e internalizaci6n del par6sito (Wirth J., et al, 1984). La FN se encuentra presente no solo como una glicoprote6na de matriz extracelular y como material cementante en el tejido conjuntivo, sino tambi6n en los fluidos corporales tales como el plasma sangu6neo (participando en un n6mero considerable de interacciones de la superficie celular con el microambiente extracelular local). De esta forma, se ha observado que la FN del plasma humano (250 μg FN/ml de medio de cultivo) asociada a los tripomastigotes sangu6neos o a los MφPR durante una preincubaci6n de 1 h a 37°C, aumentaba significativamente la uni6n de la c6lula hospedera-par6sito y con ello su internalizaci6n; este efecto involucra un incremento en el porcentaje de MφPR asociados con el par6sito y en el n6mero de par6sitos/MφPR (Wirth J., et al, 1984).

En 1988 Ouassi y cols., interfirieron la invasión *in vivo* de fibroblastos murinos de la cepa BALB/c (3T3) por tripomastigotes, empleando péptidos sintéticos similares a FN, pero modificados en el sitio de reconocimiento cuya secuencia de unión se encuentra formada por los aminoácidos Arg-Asp-Ser. El péptido sintético más efectivo, poseía la secuencia Arg-Gli-Asp-Ser que se unía a los receptores de los tripomastigotes, evitando la adhesión del parásito a la célula hospedera, lo que se comprobó realizando un seguimiento de la parasitemia de los animales previamente inmunizados con el péptido sintético (Ouassi M., et al, 1980).

En 1974, Luban y Dvorak determinaron que el pH, la temperatura, la presión, el pase y mantenimiento del parásito en medios de cultivo *in vitro*, así como las alteraciones en el curso de la infección de cultivos de tejidos (como resultado de la manipulación de la temperatura) son condiciones biológicas que alteran la invasión de la célula hospedera por el parásito (Luban N., et al, 1974).

Por otro lado, se ha observado que los tripomastigotes metacíclicos delgados llenan una motilidad progresiva, sin embargo ésta no influye positivamente en su capacidad infectiva ya que estas formas no han completado su evolución intracelular y por lo tanto presentan una disminución en su capacidad para penetrar y reproducirse en un cultivo celular.

Además, se ha observado que algunas proteínas sintetizadas por el parásito incrementan la interacción célula hospedera-parásito y con ello la infectividad, por ejemplo, los tripomastigotes y amastigotes, pero no los epimastigotes (pues no es un estadio infectivo), sintetizan una proteína de superficie denominada Potenciador de la Infectividad de los Mφs (TcMIP), la cual se adiciona a la lista de proteínas sintetizadas por el parásito, tales como: TcTOX, Penetrina, Trans-sialidasa, Neuraminidasa, etc.

La trans-sialidasa participa en la generación de una molécula requerida para la invasión a la célula hospedera, esta enzima es una variación de las sialiltransferasas de las células eucarióticas y transfiere el ácido siálico de los conjugados sial. *T. cruzi* no sintetiza ácido siálico, sin embargo contiene la enzima que lo transfiere de los glicoconjugados de la célula hospedera al parásito. El ácido siálico es un hidrato de carbono cargado negativamente que se une a las glicoproteínas y glicolípidos y su presencia participa en el reconocimiento de las células. El ácido siálico ha sido asociado a numerosas interacciones ligando receptor; la expresión de la trans-sialidasa y la adquisición del ácido siálico por *T. cruzi* es relevante en la interacción del parásito con el

hospedero, lo que modifica la patobiología de la enfermedad. Se han identificado tanto los genes que codifican para la enzima como a la enzima en la superficie de los tripomastigotes sanguíneos y epimastigotes. Los genes corresponden a una familia que codifica para múltiples copias, numerosos miembros de esta familia génica son expresados de manera simultánea y únicamente pocos tienen actividad de trans-sialidasa. Todos ellos poseen secuencias consenso similares a las neuraminidasas bacterianas.

La trans-sialidasa es una enzima específica, remueve preferencialmente el α -2,3-ácido siálico unido a glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos, además de transferirlo a residuos de D-Galactosa. La transialidasa es una enzima única que parece jugar numerosos papeles en la supervivencia del parásito, tales como, invasión, escape de la vacuola fagolisosomal, resistencia a la lisis mediada por complemento, etc.

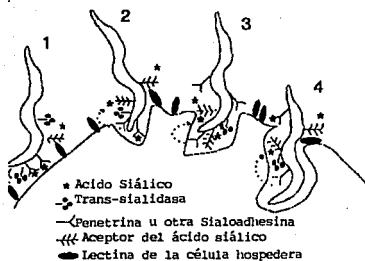
El mecanismo probable de la acción de *T. cruzi* durante su penetración a las células del hospedero mamífero es el siguiente [Schenkman S., et al, 1993 (figura 2)]:

Por otra parte, la proteína TcTOX es una toxina derivada de *T. cruzi* que hemoliza los glóbulos rojos formando un poro de membrana a pH 6, además participa en el escape del parásito de la vacuola fagolisosomal y su acción se facilita en presencia de la trans-sialidasa (Schenkman S., et al, 1993).

Además, se conoce que *T. cruzi* invade a las células del mamífero después de migrar de la matriz extracelular, estas actividades están mediadas por una proteína de 60 KDa expuesta en la superficie del parásito. Esta proteína promueve la adhesión selectiva de los tripomastigotes a tres componentes de la matriz extracelular: la heparina, el sulfato de heparán y la colágena, de manera que la proteína purificada se une a fibroblastos y cuando se adsorbe en plástico se promueve la adhesión y diseminación de estas células (Ortega-Barria E., et al, 1991).

Libby y col., describieron tanto *in vivo* como *in vitro* la actividad de la enzima neuraminidasa asociada a la superficie de los tripomastigotes, la cual en relación al grado de parasitemia remueve el ácido siálico de los glóbulos rojos de humano, de la superficie de las células miocárdicas y del endotelio vascular. Las macromoléculas que contienen ácido siálico son funcionalmente importantes y consideradas como sustratos potenciales para esta enzima. La neuraminidasa asociada a los tripomastigotes puede modificar por desialilación la superficie de las células intactas, de manera que la pérdida de los sialilconjugados de la superficie celular

Figura 2



Modelo de acción de la Trans-sialidasa durante la penetración de *T. cruzi* a las células del hospedero mamífero.

Los pasos del 1-4 indican la penetración de los tripomastigotes a las células no fagocíticas.

participa en la fisiopatología del hospedero. La desialilación de las células del hospedero mamífero puede activar el complemento vía alterna y provocar la destrucción tisular. Los residuos de ácido siálico en la superficie luminal del endotelio vascular pueden influenciar las interacciones de los glóbulos rojos con la pared de los vasos sanguíneos, lo que a su vez promueve la agregación plaquetaria y la adhesividad de los granulocitos al endotelio; por ello, la desialilación de la superficie endotelial contribuye a la trombosis en las arterias coronarias que se acompaña de una fibrosis cardíaca en el ratón infectado experimentalmente. Además, los residuos del ácido siálico pueden generar la adhesión selectiva de los linfocitos circulantes a células endoteliales venulares. Por su parte, los tripomastigotes vivos son capaces de liberar el ácido siálico de las células miocárdicas intactas, esta desialilación es selectiva puesto que las formas de amastigotes no presentan la actividad enzimática. Así que este mecanismo probablemente es precursor en el desarrollo de la enfermedad cardíaca tardía (Libby P., et al, 1986).

3.2 RESPUESTA INMUNE CONTRA *T. cruzi*

Algunos de los aspectos más fascinantes e integrativos de las enfermedades parasitarias son los diversos mecanismos que presenta la respuesta inmune para eliminar al parásito de la célula hospedera ya que ésta le sirve como medio de supervivencia y multiplicación.

Durante la respuesta inmune en la infección por *T. cruzi*, dos aspectos interrelacionados han sido motivo de estudio: uno es la naturaleza protectora de la respuesta inmune del hospedero contra el parásito y el otro es el análisis de la inmunosupresión que se presenta durante la fase aguda y crónica de la infección murina experimental. Además, este último se ha asociado con la función defectuosa de células T y Mφs.

De tal forma, los polimorfonucleares (PMNs) eosinófilos (Eos) y neutrófilos (Nos), así como los Mφs (células de Langerhans, de Kupffer, microgliales, mesangiales glomerulares, etc.) constituyen el sistema mononuclear fagocítico e intervienen directamente en la respuesta inmune inespecífica y en la específica (fase efectora) que se monta contra el parásito realizando principalmente tres funciones:

- 1) Tanto Mφs como PMNs Nos (microfagocitos), son capaces de fagocitar el material antigénico que penetra en el hospedero y oxidarlo por acción de sus enzimas lisosomales.
- 2) Los Mφs, células B, dendríticas, gliales, de Langerhans, interdigitantes, etc., pueden participar en la inducción de la respuesta inmune cuando actúan como células presentadoras de antígeno (APC), asociando péptidos del antígeno (Ag) a moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC II), que interactúa con el receptor del linfocito T o TcR (subpoblaciones de Linfocitos Th1 y Th2). La interacción MHC II-Ag-TcR se encuentra establecida por las moléculas CD3, CD4 y por las adhesinas e integrinas presentes tanto en el Mφ (ICAM-1 y LFA-3) como en el linfocito T (LFA-1, CD2).

Los linfocitos T se clasifican en función del patrón de síntesis de citocinas siendo los linfocitos Th1 los que liberan la IL-2 e INF-γ que activan y hacen proliferar a los Th2 que a su vez liberan IL-4, -5, -6, -8 y -10 y

- 3) Las células mononucleares (CMNs) que participan en la fase inespecífica y efectora de la respuesta inmune. A partir de estos conocimientos, surge la necesidad de determinar como se presentan estas interacciones celulares que son capaces de montar una respuesta inmune contra los diferentes estadios del parásito (tripomastigotes sanguíneos, epimastigotes y amastigotes).

Los primeros estudios *in vitro* que se realizaron al respecto fueron a microscopía óptica y electrónica en Mφs peritoneales de hámster, ratón y rata, para observar cómo era la interacción celular con los diferentes estadios de *T. cruzi* durante el proceso de infección (Milder R., et al, 1973; Milder R., et al, 1980; Teixeira de Pinho R., et al, 1981; Sanderson C., et al, 1979).

Investigaciones subsiguientes tomaron en cuenta los procesos bioquímicos y fisiológicos de los Mφs durante la infección (que conforman una de las principales esirpes celulares que participan en el proceso inflamatorio, debido a que liberan algunas de las citocinas pro-inflamatorias), encontrándose que son capaces de: interaccionar membrana-membrana e internalizar al parásito ya que poseen receptores específicos para tripomastigotes sanguíneos y amastigotes (MacCabe, R., et al., 1984), de procesarlo u oxidarlo, asociando algunos péptidos antigénicos con moléculas del MHC II y presentarlo a los linfocitos Th. También se encontró que los Mφs normales o inactivados eran menos eficientes que los activados por tloglicolato, BCG o endotoxinas (LPS) en la eliminación *in vitro* de *T. cruzi* en sus distintos estadios; por otra parte, se determinó que los Mφs activados eran particularmente eficientes en la eliminación de epimastigotes y amastigotes y menos eficientes contra los tripomastigotes sanguíneos. Los Mφs actúan por medio de sus enzimas lisosomales que se vierten en la vacuola parasitófara y cuyo principal contenido es el H₂O₂ (que afecta al parásito ya que es deficiente de la enzima catalasa), NO (Muñoz-Fernández M., et al, 1992) y en menor proporción superóxidos, iones oxhidrilo y oxígeno molecular (Nogueira N., et al, 1977).

ACCION DE LOS Mφs SOBRE CADA UNO DE LOS ESTADIOS DEL PARASITO.

Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar al Mφ uniéndose a su N-acetil glucosamina para posteriormente ser fagocitados (Snary D., et al, 1985). Los parásitos permanecen poco tiempo dentro de la vacuola parasitófara ya que son capaces de escapar de ésta hacia el citoplasma de la célula, sitio donde se diferencian a su estadio de amastigotes y se lleva a cabo su multiplicación, proceso que refleja una adaptación del parásito a los mecanismos de la respuesta inmune del hospedero.

La presencia tisular de los amastigotes así como de los demás estadios, inducen una respuesta inflamatoria cuya severidad esta en función de la cepa de *T. cruzi* y del estado de competencia del sistema inmune.

En el caso de los amastigotes la adhesión a los Mφs (aproximadamente 5 min después del contacto) sugiere la presencia de receptores de membrana que permiten la internalización del parásito por fagocitosis (8 min después de la interacción del MφPR con la superficie de los amastigotes) además de la penetración activa del parásito. La multiplicación de los amastigotes es inhibida en los Mφs activados inespecíficamente ya que oxidan al parásito en un tiempo aproximado de 4 h y disminuyen la infección de los Mφs 12 h después; un proceso similar se observa en los monocitos (Mφs).

Por otra parte, McCabe y cols., afirman que los amastigotes liberados de células infectadas son capaces de reinfestar otras células fagocíticas así como no fagocíticas y de multiplicarse intracitoplásmicamente, con lo que mantienen y amplifican la infección y la destrucción de células tanto *in vitro* (McCabe R., et al, 1984) como *in vivo* (Villalta F., et al, 1984).

Los Mφs de animales activados con endotoxinas o Ags relacionados, muestran una acción tripanosomícida que presenta una cinética de aumento progresivo en el período de postinmunización, mientras que los activados con BCG presentan una actividad tripanostática más que tripanosomícida (Nogueira N., et al, 1977).

Además se ha observado que los Mφs activados *in vitro*, sintetizan y secretan grandes cantidades de INF-γ y activador de plasminógeno, cuya función es activar a las proteínas C1 y C3 del complemento. La liberación de activador de plasminógeno se asocia a la presencia de una elevada actividad fibrinolítica (incrementada hasta 20 veces de su valor basal), lo que indica que esta proteasa neutra fue liberada al medio extracelular, por ello los Mφs activados con INF-γ que interactúan con el parásito cubierto con IgG son más eficientes en la eliminación del mismo ya que el opsonizado y el INF-γ inducen una acción citotóxica sinérgica por parte del fagocito (Plata F., 1984).

Así la acumulación de linfocitos y Mφs en el tejido infectado del hospedero es común, lo que indica que la inmunidad mediada por células juega un papel importante en la resistencia al parásito (Snary D., 1985).

PAPEL DE LOS LEUCOCITOS PMNs *IN VITRO* EN LA RESPUESTA INMUNE CONTRA *T. cruzi*.

Se ha observado que tanto los Eos como los Nos (aún a concentraciones muy bajas) pueden causar la lisis de altas concentraciones de epimastigotes. Estos PMNs presentan una actividad citotóxica similar, sin embargo

difieren en que los Eos muestran un efecto dependiente de Acs, mientras que los Nos no, aunque su toxicidad se incrementa aproximadamente 8 veces por la presencia de las inmunoglobulinas (López A., et al, 1978).

La cinética de activación de los Eos humanos se inicia durante la interacción con los amastigotes; así investigaciones a nivel bioquímico, demostraron la presencia de gránulos con una matriz positiva cuyo contenido es principalmente de peroxidasa y un núcleo cristaloides formado por la proteína básica mayor, además de una proteína catiónica eosinofílica y una proteína X, ambas secretadas cuando los Eos son estimulados. La proteína básica mayor destruye a los tripomastigotes sanguíneos, así como a los amastigotes a través del mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de Acs (CCDA). Durante este proceso intervienen además, la proteína catiónica y la X, al igual que la peroxidasa eosinofílica, las cuales aparecen aproximadamente 4 h después de la interacción del Eo con el parásito. Los gránulos de secreción del Eo son componentes importantes de su estado de activación ya que pueden deteriorar y/o destruir a los parásitos fagocitados, además de causar la muerte o el daño celular y/o tisular en los sitios de inflamación (Sanderson C., et al, 1979; Kierszenbaum F., et al, 1986).

Por lo que toca a la acción de los Nos durante la infección, los de humano poseen receptores de superficie para los amastigotes que interaccionan con la célula hospedera por más de 30 min, de tal forma que el parásito es fagocitado, internalizado en la vacuola fagocítica y finalmente, eliminado por la mieloperoxidasa y el H_2O_2 de los lisosomas; los receptores son reexpresados hasta que finaliza el periodo de digestión enzimática.

Los iones $O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} y el O_2 , denominados como intermediarios reactivos de la molécula de oxígeno, no juegan un papel importante en la eliminación del parásito por los Nos ya que éstos se acumulan en el sitio de inoculación y alrededor del tejido infectado; en algunos casos actúan como células efectoras en la CCDA en humanos y ratones, destruyendo a los tripomastigotes sanguíneos en presencia de Acs (Villalta F., et al, 1983). Con base en lo anterior, se puede concluir que la interacción del parásito-fagocito se encuentra en función de la cepa y estado del parásito, del estado de competencia del sistema inmune del hospedero y del tipo de fagocito al cual se enfrenta.

Así pues, para que se monte una respuesta inmune celular y humoral adecuada, se requiere de la interacción del MHC II de la APC asociada a un péptido antigénico y de la presencia y funcionalidad de los receptores del

linfocito Th o bien de la interacción directa del Ag con la Ig de superficie de los linfocitos B y de estas células con las interleucinas (ILs) liberadas por los linfocitos T, además de las monocinas de la APC (Ramos C., et al, 1978).

PARTICIPACION DE LOS LINFOCITOS DURANTE LA INFECCION.

Muchos estudios reportan un importante menoscabo transitorio de la respuesta inmune durante la fase aguda de la infección, fenómeno observado tanto en cepas de ratones resistentes (C57B1/6) como en las susceptibles (C3H) infectadas con altas y aún bajas concentraciones de diferentes cepas del parásito. El control del intenso parasitismo en la fase aguda de la infección depende del buen establecimiento de la respuesta inmune de las células T, lo cual paradójicamente se debe desarrollar al inicio de la infección (Curotto M., et al, 1990).

Así, Kierszenbaum y cols., determinaron que esta inmunosupresión se debe principalmente a la disminución en el número de los linfocitos T durante el nivel de máxima parasitemia, mostrando además una baja respuesta linfoproliferativa ante mitógenos (Con A y PHA), lo que quizá se deba a la presencia de un factor tripanosómico inmunosupresor (FIT) secretado al medio de cultivo, que inhibe la expresión del receptor para IL-2 con un efecto importante entre las 48 y 72 h post-infección. Tal efecto es reversible ya que cuando se deja de agregar a las células mononucleares aisladas de sangre periférica (PBMNCs) el sobrenadante del cultivo del parásito, éstas recuperan la capacidad proliferativa. El tratamiento del FIT con proteasas disminuye su actividad, por lo que se infiere que se trata de una proteína; su PM oscila entre los 30 y 100 kDa. Además se conoce que el FIT afecta directamente la expresión de los receptores de alta y baja afinidad para la IL-2 sin modificar la producción de IL-2, IL-1 o INF- γ . Esta inmunosupresión es aún más significativa cuando existe la interacción de la célula hospedera con el parásito (Kierszenbaum F., et al, 1990).

Recientemente Szein y cols., demostraron que además de una disminución en la expresión del receptor de IL-2 de las poblaciones de linfocitos Th y Tc, también hay una importante disminución en la expresión de la molécula CD3 (que participa en la formación del complejo TCR-CD3), CD4 y CD8 de los linfocitos Th y Tc (que participan en la interacción y adhesión de los linfocitos al MHC II-Ag y MHC I-Ag de la APC respectivamente; en la activación de las células T a través de la interacción con el complejo TcR-CD3 y en la modulación de la

activación), tal efecto solo fue observado cuando las células se encontraban en presencia de mitógenos (Stein M., et al, 1990).

Por su parte, la inhibición de la expresión de las moléculas CD3, CD4 y CD8 *in vitro* se observó a las 18 h post-infección, lo cual ocurre concomitantemente con una importante disminución en la proliferación celular tanto de los linfocitos humanos como de animales de laboratorio.

Por otro lado, los linfocitos B del bazo de ratones infectados se incrementan en número hasta alcanzar sus niveles máximos durante la fase aguda, lo que correlaciona con el cuadro de esplenomegalia, aunque se presenta una disminución en el número de células productoras de Acs (hasta un 60%) con respecto a grupos control (Hayes M., et al, 1987).

Posteriormente, Curotto y cols. determinaron que la respuesta linfoproliferativa específica contra los Ags de *T. cruzi* se lleva a cabo en los nódulos linfáticos desde el principio de la infección y durante la fase aguda, aún cuando las células del bazo no respondan al Ag ni a la estimulación con lectinas o LPS. La permanencia de la respuesta específica en nódulos linfoides demostró que la inmunosupresión no es general y que la respuesta linfoproliferativa se relaciona con la carga local del parásito (Curotto M. A., et al, 1990).

Las células del bazo siempre se inmunosuprimen durante esta fase, sin mostrar una correlación entre el inóculo y la vía de inoculación (se ha observado que la esplenectomía no altera el curso de la infección), mientras que la baja respuesta linfoproliferativa de los nódulos linfoides, se observa únicamente en ratones que se inoculan por la cola con una concentración elevada de parásitos ya que cuando la vía de inoculación es subcutánea y el inóculo grande, entonces los nódulos inmunosuprimidos son únicamente los más cercanos a la vía de inoculación.

La concentración elevada de Ag y la activación policlonal de los linfocitos B provocan la pérdida de la efectividad en la respuesta inmune humoral, lo que posiblemente participe en la etiología de la disminución en la respuesta de las células del bazo contra el parásito. El bazo es considerado como un órgano de tamizado para los parásitos circulantes y como una fuente de células de respuesta inmune, la activación policlonal se debe a un contacto inicial de los linfocitos B con el parásito y a uno posterior donde hay una activación

policlonal potencial debido a que el parásito aumenta en número, encontrándose tanto en el tejido como libre en la sangre (Ortiz-Ortiz L., et al, 1990).

Se debe hacer notar que si los parásitos invaden a los Mφs del hospedero y se multiplican intracelularmente el control del parasitismo podría quedar excluido únicamente a los linfocitos que migran de compartimentos inmunes no esplénicos, tales como los nódulos linfáticos (Curotto M., et al, 1990).

Así pues para concluir los principales efectos de la infección por *T. cruzi* en modelo murino, sobre la respuesta inmune son:

- a) Aumento en la actividad fagocítica de las CMNs.
- b) Disminución de la respuesta de linfocitos T y B a la estimulación con mitógenos.
- c) Disminución de la respuesta linfoproliferativa de células T causada por el decremento en la expresión del receptor para IL-2.
- d) Respuesta inmune humoral y celular inadecuada (Ag dependiente e independiente de linfocito T).
- e) Disminución de la toxicidad de los Mφs.
- f) Activación policlonal de linfocitos B.
- g) Alteración de los isotipos de inmunoglobulinas producidas ya que el parásito es capaz de inducir a la formación de Acs no líticos (IgG₁) y aunque el complemento se encuentre presente, el parásito es capaz de sobrevivir en la sangre debido a que se recubre con este isotipo de Ig no inmune a la cual se une fuertemente a través de una proteína específica de 52 kDa, por su fracción Fab (Cicarelli R. et al, 1989).
- h) Los parásitos tripomastigotes metacíclicos y de cultivo son capaces de liberar una proteína similar al factor acelerador del decaimiento de la C3 convertasa del complemento o DAF (Rimoldi M. T. et al, 1988).

Los efectos anteriores puedan deberse a los mecanismos de evasión de la respuesta inmune por el parásito tales como:

- a) Liberación de Ags solubles.
- b) Liberación de enzimas proteolíticas .
- c) Inducción de la activación policlonal.

d) Presencia de proteínas de choque térmico.

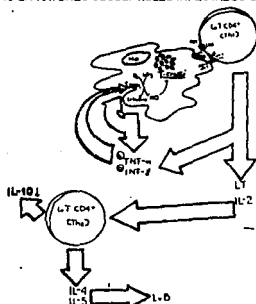
e) Inducción de la síntesis de Acs con tiempo de vida media baja.

f) Inhibición de la activación de los Mφs debido a la producción de IL-10 por las células Th2, la cual inhibe la síntesis y utilización del INF-γ durante la fase aguda de la infección (Silva J., et al., 1992). Se conoce que los Mφs activados con INF-γ y TNF-α, son capaces de eliminar o inhibir *in vitro* el crecimiento de las formas intracelulares de manera eficiente, incrementando la producción de los metabolitos reactivos del nitrógeno. La toxicidad de los óxidos del nitrógeno y del NO en particular, actúan inactivando las enzimas críticas para la replicación del DNA y las del ciclo de Krebs de la respiración mitocondrial, debido a la nitrosilación de los grupos prostéticos Fe-S del sitio activo de la enzima blanco (figura 3). Estudios recientes indican que el control de la infección intracelular con este protozoario por Mφs activados, puede ser regulado negativamente por las citocinas IL-4, -10 y TGF-β, que inhiben de forma dosis dependiente la síntesis de INF-γ (Gazzinelli R., et al., 1992). Por otro lado, se ha sugerido que el TGF-β y la IL-10 tienen efectos reguladores negativos sobre la resistencia a la infección en sistemas *in vivo*. Así, el TGF-β administrado durante la infección disminuyó la resistencia, observándose un incremento en la parasitemia y mortalidad de los ratones infectados (Sher A., et al., 1992). Efectos similares fueron reportados en un estudio de la infección de ratones susceptibles (B6) y resistentes (B6D2) con *T. cruzi*, donde se observó que la cepa resistente se convertía en susceptible cuando se trataba con Acs anti INF-γ. Además, se determinó que las células del bazo de los ratones B6 infectados producían IL-10 *in vitro*, mientras que las células del bazo de los ratones B6D2 no. Además se observaron expresiones recíprocas en la producción de la IL-10 e INF-γ, en ratones de la cepa CBA/N infectados con *T. cruzi*. Por otra parte, ratones hembra fueron susceptibles a la infección y mostraron un incremento en la producción de IL-10 y una disminución en la de INF-γ, mientras que los machos que poseen el gen XID fueron resistentes a la infección y expresaron grandes cantidades de INF-γ y bajas de IL-10. Así pues, la IL-10 también suprime la capacidad del INF-γ para activar a los Mφs y con ello inhibe la replicación intracelular del parásito (Silva J., et al., 1992).

En función de lo antes mencionado, podemos concluir que los principales mecanismos de eliminación del parásito por el sistema inmune del hospedero son:

FIGURA 3

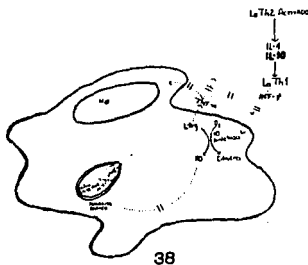
MECANISMO DE ACCION DE LA IL-10 EN RATONES SUSCEPTIBLES INFECTADOS CON *T. cruzi*



Inhibición de la actividad tumoricida y antimicrobiana de los Mφs:

- a) Indirectamente, a través de la inhibición de la producción de INF-γ por los células Th1, lo que impide la activación del Mφ.
 b) Directamente a través de la desactivación de los Mφs en presencia de INF-γ y en ausencia del TNF-α (acción autócrina).

MECANISMO DE INHIBICION DE LA SINTESIS DE OXIDO NITRICO POR EL Mφ A TRAVES DE LA IL-10



- a) Fagocitosis profesional.
- b) CCDA.
- c) Opsonización del parásito y fagocitosis.
- d) Lisis dependiente de Acs y fijación de complemento.
- e) Destrucción de las células parasitadas por el sistema mononuclear fagocítico (aumenta durante la fase aguda).
- f) Destrucción por los linfocitos Tc y NK de células parasitadas (Kuhn R., et al, 1977).

3.3 MECANISMOS DE PATOGENIA

Los mecanismos de patogenia en la enfermedad de Chagas, se presentan como un cuadro complicado y diverso tanto en el hombre como en los animales de experimentación. Se ha observado que solo algunos de los individuos infectados son susceptibles para desarrollar la enfermedad aguda que los conlleva a la muerte por una abrumadora parasitosis en los estadios iniciales de la infección, mientras muchos otros sobreviven a la infección inicial desarrollando las manifestaciones crónicas de la enfermedad meses o años después y otros más permanecen clínicamente asintomáticos desde el principio hasta el fin de ésta.

En años recientes, se han incrementado las evidencias de que los mecanismos inmunes contribuyen significativamente a la patología observada en la CCC y puede también estar implicada en las lesiones de denervación mioentrérica observada ocasionalmente en la forma crónica de la enfermedad.

La reacción cruzada de determinantes antigénicos que comparte el agente etiológico y el músculo estriado, las neuronas y algunos componentes de la membrana basal, se han descrito recientemente y su papel inmunopatogénico ya se ha esclarecido. La capacidad de *T. cruzi* para adquirir reversiblemente componentes de la superficie celular del hospedero también se ha reportado.

Las principales teorías que se manejan actualmente para explicar la patogenia de la enfermedad de chagas son las siguientes:

1) DESTRUCCIÓN DIRECTA DEL TEJIDO POR EL PARASITO Y/O LOS INFILTRADOS INFLAMATORIOS.

Las lesiones tisulares halladas en la forma crónica de la enfermedad de chagas son debidas a los efectos de la parasitosis, fundamentalmente a la ruptura del pseudoquiste que produce una reacción inflamatoria que se resuelve con la restitución del tejido normal por tejido fibroso. La completa remisión de la infección no esta absolutamente comprobada, por ello algunos individuos albergan al parásito durante toda su vida, teniendo episodios repetidos de infección tisular-ruptura del pseudoquiste-inflamación-fibrosis. Después de muchos años de este proceso continuo se presentan las manifestaciones fisiopatológicas de la forma crónica de la enfermedad de Chagas.

Esta teoría presupone la presencia continua de *T. cruzi* en la célula del hospedero mamífero y la consistente parasitosis del corazón.

Por otra parte, según Morales y cols. al infectar 41 ratones Swiss de 3 meses de edad, vía intraperitoneal, con dosis entre 10^2 y 10^5 tripomastigotes de la cepa Tulahuen y al reinocular 1 mes después con una dosis que fluctuaba entre 10^2 y 10^4 parásitos, determinaron diferentes alteraciones miocárdicas, desde infiltrados linfocitarios leves y focales en el intersticio hasta el reemplazo de miocitos por tejido conjuntivo, mientras que en el músculo esquelético se presentaron distintos grados de lesión histológica, desde la leve hasta extensos infiltrados linfoplasmocitarios con presencia de fibras necróticas y en ambos casos, de Ag tisular (Morales M., et al, 1987).

Las observaciones hechas por Morales y cols., fueron apoyadas con un estudio posterior realizado en 1988 por Younes, en el cual se examinaron histológica e inmunohistológicamente tejidos tales como músculo esquelético, corazón, hígado, bazo, cerebro y nervio siático provenientes de ratones infectados en fase aguda y crónica de la infección. Durante la fase aguda, los parásitos fueron observados en estos tejidos, mientras que durante la crónica, los nidos de amastigotes se hallaron con una frecuencia menor al 1% en las secciones de tejido analizadas por el método histológico, en tanto que por el método de IHQ se evidenció en un 11% la presencia de Ag parasitario en los infiltrados inflamatorios que aumentaban progresivamente con el tiempo. Estos hallazgos sugieren que la estimulación antigénica persiste a través de la fase crónica aunque los parásitos no sean morfológicamente detectables (Younes-Chenoufi A., et al, 1988).

En lo referente a la lesión tisular causada por los infiltrados leucocitarios inflamatorios, Molina y Kierszenbaum evidenciaron por medio de la técnica de IHQ los depósitos de los productos derivados del Eo en cortes de miocardios que habían sufrido infarto, endocarditis y miocarditis chagásica, encontrando que en las dos primeras patologías no se presentaban infiltrados leucocitarios de tipo eosinofílico ni productos derivados de estas células, mientras que en la miocarditis chagásica, se observó el inmunoprecipitado que evidenciaba la presencia de los productos del Eo, concluyendo con base a los resultados obtenidos que los Eos se encuentran directamente implicados en el agravamiento de la necrosis degenerativa del miocardio de pacientes con la enfermedad de Chagas ya que el grado de infiltración y la presencia de depósitos de sus productos de secreción fueron importantes (Molina H., et al, 1988).

Posterior a esta publicación, Molina y Kierszenbaum realizaron una investigación acerca de la activación de los Eos en lesiones miocárdicas agudas y crónicas para establecer si existía una correlación del agravamiento de la lesión con las proporciones de Eos y la liberación de productos de los gránulos. Encontraron que los Eos se presentaban en una proporción del 42-78% en áreas del músculo cardíaco con un patrón de células inflamatorias e infiltrados intersticiales asociado a la degeneración necrótica de las miofibras, en comparación con las cifras obtenidas para el caso de una miocarditis leve con miofibras conservadas en las cuales las cifras obtenidas fueron comparativamente inferiores (<28%), lo cual se determinó por el inmunoprecipitado de la proteína básica mayor y catiónica eosinofílica en las miofibras con lesiones chagásicas necróticas. De tal forma se concluyó que son los gránulos tóxicos de los Eos los que dañan a las células del mamífero además de los tripomastigotes sanguíneos y amastigotes (Molina H., et al, 1989).

2) DESTRUCCION DE LA INERVACION AUTONOMA DEL CORAZON

La acalasia del esófago y/o colón ocasionalmente ocurre en conjunción con la enfermedad crónica, donde la lesión característica es una destrucción parcial o total de los plexos mientéricos parasimpáticos (plexos de Meissner y Auerbach presentes en los órganos huecos) así como la reducción de un número considerable de neuronas.

Por otro lado, la destrucción de las células de los ganglios del corazón es un proceso que se resuelve por fibrosis, la cual se desarrolla tanto en presencia como en ausencia de células inflamatorias.

3) CARDIOMIOPATIA AUTOINMUNE INDUCIDA POR *T. cruzi*

3.1 RESPUESTA INMUNE ANTI-CORAZON EN HUMANOS Y EN LA ENFERMEDAD EXPERIMENTAL DE CHAGAS.

Una de las paradojas fundamentales de la enfermedad de Chagas es la destrucción grave de los órganos blanco en la ausencia de las formas intra o extracelulares del parásito, sin embargo en su lugar son hallados extensos infiltrados inflamatorios y el tejido propio del órgano se encuentra reemplazado por tejido fibroso. Estas observaciones sugieren la presencia de Acs anti-corazón, los cuales podrían jugar un papel importante en la patogenia de la enfermedad crónica de Chagas.

3.1.1) REACCION INMUNE HUMORAL ANTI-CORAZON

En 1974, Cossio y cols. reportaron la presencia de Acs en el suero de pacientes infectados con *T. cruzi* que fueron determinados por IFI y reaccionaban con el intersticio, estructuras vasculares y endoteliales (EVI) del corazón, mientras que en el músculo esquelético solo se encontraba una reacción positiva en el intersticio y estructuras vasculares. La reactividad del Ac EVI se encontró positiva por IFI en un 95% de los sueros de pacientes con cardiomiopatía chagásica y en un 45% de los individuos asintomáticos en la fase indeterminada de la enfermedad. Sin embargo, el suero de un gran número de individuos provenientes de áreas no endémicas y los de pacientes con otras enfermedades parasitarias con excepción de los de leishmaniasis visceral, no presentaban actividad del Ac EVI. Observaciones realizadas durante este estudio sugirieron que la patogenia de la miocarditis aguda involucra la invasión del miocardio por el parásito, sin embargo la patogenia de la CCC aparece muchos años después, por lo que se cree se involucra un mecanismo inmunológico: la presencia de una γ -globulina reactiva contra el endocardio y estructuras vasculares. Esta investigación reveló la existencia de una reacción cruzada entre el factor EVI y determinantes antigénicos en *T. cruzi* ya que la adsorción del suero con epimastigotes eliminó los Acs EVI, por lo que se concluye que la infección crónica y/o liberación continua de los Acs propios de los tejidos dañados puede ser el estímulo para la perpetuación de la respuesta autoinmune (Cossio P, et al, 1974).

Estudios posteriores de IF y microscopía electrónica demuestran la presencia de Acs autólogos en biopsias de las miofibras del músculo cardíaco y esquelético de pacientes con la infección. La proporción variable del daño tisular, era acorde a la aparente deposición *in vivo* de la inmunoglobulina, lo que sugirió una relación causa-efecto. Este autoanticuerpo es capaz de fijar el complemento, es por ello que el efecto observado sobre las miofibras fue de tal magnitud.

McCormick y cols., proponen que la principal causa del daño tisular en el músculo cardíaco fue una reacción autoinmune inducida durante la fase aguda de la infección. Tanto la respuesta inmune humoral como la respuesta autoinmune celular, se han reportado como los mecanismos implicados en la patogenia de la enfermedad (McCormick T., et al, 1989).

3.1.2) REACCION INMUNE ANTI-CORAZON MEDIADA POR CELULAS

Gusmao y cols., sugieren la participación de un fenómeno autoinmune como la etiopatogenia del daño difuso al miocardio en la CCC ya que el músculo cardíaco se observa invadido por infiltrados de CMNs (principalmente por Mφs y linfocitos) asociados a una destrucción masiva de las fibras, proceso que se resolvía por fibrosis todo lo cual ocurría en ausencia del parásito. Teixeira demostró que la destrucción de fibras del miocardio era por los linfocitos T, lo que sugirió que la respuesta autoinmune de estas células se disparaba por la participación de un Ag común entre *T. cruzi* y las células del hospedero. Se determinó que la reacción mixta de linfocitos autólogos (AMLR) de los pacientes con CCC manifiesta, poseía las propiedades clásicas de los mecanismos de la respuesta inmune tales como memoria y especificidad, observándose incrementados los valores de AMLR con respecto a los sujetos control de la misma área endémica (Barral A., et al, 1984).

Younes-Chennoufi y cols., contribuyeron con más evidencias al respecto ya que encontraron que las lesiones inflamatorias ocurrían durante la fase aguda de la infección y los infiltrados de granulocitos hallados en la fase crónica se atribuían a un mecanismo de DTH debido la persistencia del Ag en el tejido quizá como consecuencia de la lisis de las células infectadas o a la circulación de Acs que tienen la capacidad de reaccionar con la membrana plasmática del músculo esquelético, células endoteliales, neuronas o células de Schwamm del hospedero (Younes-Chennoufi A., et al, 1988).

3.2) TEORIAS DEL MECANISMO DE INDUCCION DE LA RESPUESTA AUTOINMUNE EN CORAZON:

3.2.1) AUTOINMUNIDAD PRODUCIDA POR LA ADSORCION DE LOS ANTIGENOS DE *T. cruzi* SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS CELULAS HOSPEDERAS CON LA SUBSECUENTE LIBERACION DE LOS ANTIGENOS PROPIOS.

Ribeiro dos Santos y Hudson, demostraron con un estudio *in vitro* que la ruptura del pseudoquiste y la liberación de los amastigotes provocaba que los Ags de este estadio fueran adsorbidos sobre la superficie de las células hospederas vecinas no infectadas. También encontraron que la adsorción de los Ags de epimastigotes o amastigotes en células de humano y ratón, las hacía vulnerables a la destrucción con suero hiperinmune de conejo anti-*T. cruzi* (SHIC) suplementado con complemento y a la lisis por un mecanismo de CCDA cuando las células con el Ag adsorbido eran enfrentadas a células de bazo de ratón (BALB/c) o bien a

esplenocitos infectados con *T. cruzi* no adherentes a la lana-nylon. Basándose en estos resultados Ribeiro dos Santos y Hudson postularon la siguiente teoría para tratar de explicar la patogenia de la CCC: "la ruptura de los pseudoquistes de los amastigotes en las fases tempranas de la infección liberan a los Ags de *T. cruzi*, los cuales se adsorben sobre la superficie de las células hospederas vecinas no infectadas, por lo que son modificadas por el parásito y posteriormente destruidas por la respuesta inmune humoral anti-*T. cruzi*, liberándose así los Ags propios que provocan una reacción autoinmune que contribuye a las lesiones patológicas halladas en la fase crónica de la enfermedad".

3.2.2) AUTOINMUNIDAD PRODUCIDA POR UNA REACCION CRUZADA ENTRE LOS ANTIGENOS DE *T. cruzi* Y LA CELULA HOSPEDERA

Las reacciones anti-corazón por células de humano y animales de experimentación contra el parásito, así como la observación de CMNs que reaccionaron positivamente a la prueba de factor de inhibición de la migración de linfocitos con Ags de corazón, genera la hipótesis de que el músculo esquelético y el cardíaco poseen un Ag en común con *T. cruzi*, lo cual podría ser causa de la patogenia de las lesiones cardíacas observadas en la CCC.

Acosta y Santos-Buch, demostraron que la reacción cruzada se relacionaba con la enzima adenosintrifosfatasa del retículo sarcoplásmico dependiente de calcio (SRA), presente en el músculo esquelético, cardíaco y en el interior de los flagelados. La SRA es una proteína de amplia distribución filogenética ya que se presenta en el músculo de animales representativos de la escala evolutiva con intervalos que abarcan desde los primates hasta los peces. Además se ha encontrado en 9 cepas de *T. cruzi* incluyendo algunas aisladas de animales silvestres de norteamérica.

4) OTROS ANTIGENOS DE REACCION CRUZADA PRESENTES EN LA CELULA HOSPEDERA Y EN *T. cruzi*, QUE INDUCEN LA PRODUCCION DE AUTOANTICUERPOS

4.1) LAMININA

La laminina es una glicoproteína de membrana basal que funciona como material de adhesión de las células epiteliales y endoteliales a la colágena tipo IV. Esta proteína contiene dos cadenas polipeptídicas, una ligera denominada B cuyo PM es de 220 kDa y una pesada o A de 440 kDa e hidratos de carbono en una proporción

del 13%. Recientemente se ha demostrado que, en el suero de humanos con enfermedad de Chagas tanto aguda como crónica y en el de monos rhesus infectados experimentalmente con el parásito, existen Acs del tipo IgM e IgG capaces de reaccionar con la laminina, pero no con otros purificados de tejido conjuntivo tales como colágena tipo I, III, IV y V, FN, sulfato de heparina (BM-1), otros proteoglicanos o condronectina. Sin embargo, se ha reportado la presencia de una(s) proteína(s) similar(es) a la laminina en las membranas de las diferentes familias *Trypanosomatidae*. Además, inmunocitoquímicamente se ha demostrado que una proteína similar a la laminina se encuentra localizada en ciertas áreas específicas de la membrana plasmática del género *Trypanosoma spp.*, esta proteína es estadio-específica y se presenta únicamente en tripomastigotes y amastigotes con una función celular definida, por lo que es posible que ésta actúe en los tripomastigotes facilitando la interacción y movilización con la célula hospedera a través de los pequeños vasos sanguíneos (Bretaña A., et al, 1986).

4.2) TUBULINA

Los microtúbulos del citoesqueleto de la célula hospedera en cultivo, observados durante la infección con tripomastigotes presentan una redistribución del citoesqueleto y una destrucción de las redes microtubulares en respuesta a la infección parasitaria en un período de 5 días, durante el cual los parásitos penetran a la célula y se localizan en la región perinuclear, en donde se multiplican y el número y distribución de los microtúbulos en la célula hospedera se modifican. Se cree que los parásitos pueden secretar enzimas que inician la despolimerización y/o modifican los microtúbulos de la región perinuclear, por lo que la distribución radial normal que se extiende desde el centro de la célula hacia la periferia es destruida encontrándose que los microtúbulos permanecen rodeando la zona de proliferación del parásito hasta su liberación como tripomastigote, observándose la destrucción total del citoesqueleto de la célula hospedera. Además, existe un amplio espectro de reacción cruzada entre las tubulinas (α y β) en los vertebrados, levaduras y protistas, en donde las isoformas de las tubulinas ya han sido identificadas. Por otro lado, únicamente en los tripanosomas han sido encontrados microtúbulos de localización endomembranal que lo cruzan a lo largo y el número de microtúbulos parece ser especie específica; estos microtúbulos subpeliculares son complementados por los del axonema flagelar. Los microtúbulos de los M ϕ s J-774, fibroblastos BSC-1 de riñón de mono verde y células

Vero, mostraron una reacción cruzada con los microtúbulos de *T. cruzi*, lo cual no sucede con *T. rhodosiense* y *T. brucei* cuando se emplea un Ac monoclonal anti- α o β tubulina (Paulin J., et al, 1988).

4.3) MIOSINA

Ratones de la cepa BALB/c y CBA/J infectados con *T. cruzi*, desarrollan la enfermedad crónica con la participación de linfocitos CD4⁺ que responden contra la miosina, lo cual puede deberse a:

- a) una reacción cruzada entre los Ags de *T. cruzi* y la miosina; o
- b) un fenómeno autoinmune que depende únicamente de la exposición previa de los Ags por el daño de las células miocárdicas.

Los autoanticuerpos pueden aparecer en las fases aguda y crónica de la enfermedad experimental y humana; durante la fase aguda asociados a la activación policlonal de células T y B que podría persistir hasta la fase crónica a consecuencia de un defecto generalizado en los mecanismos de tolerancia, por lo tanto, la autoantigenicidad de la miosina podría explicar la patogenia de la CCC (Rizzo L., et al, 1989).

4.4) SULFATIDOS

El 20% del peso seco de *T. cruzi* corresponde a moléculas lipídicas; los fosfolípidos como componentes naturales de las membranas biológicas pueden tener un papel importante en la relación célula hospedera-parásito.

La composición lipídica de los epimastigotes en fase logarítmica de crecimiento (día 7 y 8 de cultivo) es la siguiente:

Origina	1.9 \pm 0.6%
Lisolecitina	0.7 \pm 0.2%
Esfingomielina	3.8 \pm 0.9%
Fosfatidicolina	44.2 \pm 1.5%
Fosfatidilinositol	12.3 \pm 1.0%
Fosfatidiletanolamina	27.9 \pm 0.9%
Acido fosfatídico	4.2 \pm 0.9%
Cardiolipinas	2.1 \pm 1.1%
No identificados	2.9 \pm 1.2% (Oliveira M., et al, 1977).

Hakomori y cols., han aislado Ags de reacción cruzada del parásito con el SNC (mielina) y mucosa del tracto digestivo de mamíferos, dichos Ags pertenecen a la familia de los sulfolípidos o lípidos sulfatados, los cuales contienen hidratos de carbono y se clasifican en tres tipos: las sulfogalactosilceramidas ($(\text{H}^3\text{SO}_3)_2\text{LacCer}$), las sulfogangliotriolceramidas ($(\text{H}^3\text{SO}_3)_2\text{Gg}_3\text{Cer}$) y los sulfogalactosilidigliceridos (seminolípidos). Las reacciones químicas indican que el grupo sulfato de estos sulfolípidos es un componente esencial del epitopo reconocido por el Ac monoclonal VESP 6.2; los lípidos y glicolípidos normalmente actúan como haptenos, lo que hace posible que los parásitos probablemente ejerzan un efecto negativo en la regulación del sistema inmune ya que generan la expansión de clones de linfocitos autoreactivos. Así, se ha propuesto que la autoinmunidad en la infección crónica podría ser resultado de una desregulación del sistema supresor de las células T autólogas, o bien deberse a la presencia de Ags de reacción cruzada presentes tanto en el parásito como en la célula hospedera (Petry K., et al. 1988).

5) AUTOINMUNIDAD POR ACTIVACION POLICLONAL DE LOS LINFOCITOS B

Librado Ortiz Ortiz, afirma que en la infección por *T. cruzi* se observa una activación policlonal de linfocitos B a Ags no específicos, tales como glóbulos rojos, haptenos, Ags protéicos solubles, etc., lo que sugiere que la respuesta inmune por se puede jugar un papel importante en los procesos autoinmunes que se presentan en esta enfermedad. Durante el proceso autoinmune, se observa la presencia de Acs heterófilos anti-glóbulos rojos de borrego, chivo, equino, burro y ratón; Acs anti-proteínas solubles (IgG humana) y anti-haptenos (TNP); todos ellos son Acs de clase IgG_{2a} o IgG_{2b} de baja afinidad para los Ags de tejidos propios, pero que por ser tan persistentes pueden propiciar el desarrollo de la patología (Ortiz-Ortiz L., et al. 1980).

6) INMUNOSUPRESION INDUCIDA POR EL PARASITO

Como se había mencionado en el capítulo referente a la respuesta inmune contra *T. cruzi*, existe un factor inhibidor tripanosómico (FIT) el cual se encarga de inhibir la expresión del receptor para IL-2, CD3, CD4 y CD8, además de inducir a las células Th2 a la producción de un factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF o IL-10) tales como: IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, etc.; por otra parte, se ha observado una inducción de Acs no líticos del tipo IgG_4 , así como una unión de las inmunoglobulinas humanas a receptores específicos (Fc) en la superficie del tripanosoma (Kierszenbaum F., et al. 1990).

Rodríguez de Cuna y cols., encontraron que el Ac monoclonal (IgG₁) específico para un epítipo de superficie de membrana del parásito, favorece la invasión de las células hospederas *in vitro*, esto se debe a que *T. cruzi* en su estadio de tripomastigote sanguíneo posee un receptor para Fc de la IgG, en su superficie, que capacita al parásito para incrementar su infectividad siendo máxima cuando se emplean altas concentraciones de la inmunoglobulina. Además, se observó que la saturación del receptor para Fc de *T. cruzi* se presentaba a 0°C pero no a 37°C, por lo que se cree que:

- a) El parásito regula la expresión de los receptores para el Fc.
- b) La endocitosis del Fc-receptor se incrementa a 37°C.
- c) O bien, existe una combinación de los mecanismos a y b (Rodríguez de Cuna C., et al, 1991).

Gorelik y cols., determinaron la presencia de un Ac (IgG) en pacientes chagásicos, el cual reacciona específicamente con los receptores β_2 -adrenérgicos de los linfocitos, que pertenece a los β -agonistas e incrementa la producción de AMPc endógeno lo que genera inmunosupresión, sin embargo esta interacción depende de las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos. Por su parte, la activación de los receptores colinérgicos muscarínicos y β -adrenérgicos del linfocito T y B, se presenta por la unión de una IgG o el correspondiente F(ab')₂ proveniente de suero chagásico a una concentración igual a $5-8 \times 10^{-6}$ M, lo que no se observa con el empleo de IgG y el fragmento F(ab')₂ provenientes de un suero normal. Esta unión del Ac a los receptores colinérgicos y adrenérgicos ocurre en un sitio particular libre de interacciones cooperadoras o alostéricas. Los resultados de esta interacción se evidencian por el disparo en la célula de una señal de transducción, el incremento de AMPc. Con el F(ab')₂ de suero chagásico en una población de linfocitos T enriquecidos se observó un efecto bifásico, manifestado primero por una disminución en la producción de AMPc aproximadamente en 5 min y alcanzando posteriormente valores mayores a los del control. Sin embargo, en subpoblaciones de linfocitos Th se produce un incremento gradual en los niveles de AMPc, mientras que se observa una disminución en los valores basales en poblaciones de linfocitos Tc; además, con el empleo del F(ab')₂ del suero de ratones chagásicos, se incrementan los niveles de GMPc en las células Tc.

Las células B no muestran alteración de los niveles de AMPc cuando se aplica el fragmento F(ab')₂, ya que presentan receptores β -adrenérgicos, pero no colinérgicos muscarínicos en los que la adenilato ciclasa es menos

activa. Por otra parte, cuando se agregó el $F(ab')_2$ chagásico a una población de linfocitos Th y Tc, los niveles de GMPc se incrementaron en los primeros 10-15 min, sin embargo en las células B no hubo alteraciones. Además, la activación de los receptores para los neurotransmisores modifica la actividad de la fosfolipasa que activa el metabolismo del ácido araquidónico (AA); debido a ello la interacción de los receptores β -adrenérgicos con la IgG de sueros chagásicos se evidenció por la liberación de prostanoídes. Los prostanoídes (PGE_2 y TxB_2) son liberados como consecuencia de la activación de los receptores por los neurotransmisores en diferentes tejidos; son sintetizados a partir del ácido araquidónico.

Cuando a poblaciones de linfocitos T se les agrega $F(ab')_2$, se observa que grandes cantidades de PGE_2 y TxB_2 son liberadas, las células Tc solo producen PGE_2 , mientras que las Th sólo TxB_2 . La liberación de PGE_2 esta relacionada con la acción estimuladora del Ac en el receptor colinérgicomuscarínico, mientras que en la liberación de TxB_2 interviene el receptor β_2 -adrenérgico. La liberación de los Txs produce vasoconstricción y agregación plaquetaria, a diferencia de las prostaciclina (PGI_2) que son potentes inhibidores del agregado plaquetario, por lo tanto Txs y PGEs tienen una acción antagónica. Existen evidencias que sugieren que los linfocitos sintetizan y liberan la PGE_2 y TxB_2 en concentraciones hasta dos veces mayores de su valor basal, cuando son tratados con el $F(ab)_2$ proveniente de suero chagásico y si son enfrentados después a células atriales, *in vitro* se observa una disminución en la contracción de los atrios de un corazón murino normal, disparándose un efecto inotrópico negativo, por un incremento en la concentración de PGE_2 lo que no se observa con los linfocitos Th, los B y las células cardiacas murinas tratadas con el suero chagásico. Se cree que la PGE_2 actúa como una sustancia inmunorreguladora, inhibiendo la linfoproliferación y funciones secretoras por un aumento en la concentración de AMPc relacionado con la inmunosupresión en la enfermedad de chagas aguda. Por ello se afirma que la interacción de la IgG de suero chagásico con los receptores para los neurotransmisores de los linfocitos alteran su función normal, por lo tanto la respuesta inmune así como la función cardiaca podrían estar modificadas por los linfocitos (Gorelik G., et al, 1990).

3.4 DETECCION DEL PARASITO Y/O ANTIGENO TISULAR POR EL METODO DE IHQ

De los primeros intentos realizados para diagnosticar la enfermedad, se trató de implementar un método de diagnóstico tan sensible y específico como la IFI, el cual se pudiera realizar aún en los pequeños laboratorios de rutina y bancos de sangre de Brasil, que además fuera capaz de proporcionar datos sobre la seroprevalencia y estudios estadísticos de la seroepidemiología del país. En 1975 se empleó la técnica de IHQ para detectar la presencia del parásito en los pacientes, sin embargo no fue tan específica como se hubiese deseado ya que mostró reacción cruzada con los sueros de individuos con esquistosomiasis, malaria, leishmaniasis mucocutánea e histoplasmosis, razón por la cual no se le tomó la importancia debida como método diagnóstico (Ferreira A., et al, 1975).

No fue sino hasta 1983, cuando Crocker y Kuhn retomaron el empleo de esta técnica en la detección del parásito y/o Ag a nivel tisular y en lesiones inflamatorias secundarias en secciones de tejido incluidos en parafina, de ratones infectados en fase aguda, realizando un estudio comparativo entre la técnica de la inmunoperoxidasa y el complejo de la avidina-biotina-peroxidasa, siendo ésta última aproximadamente 5 veces más sensible que la primera ya que presentaba una reactividad positiva aún a grandes diluciones del suero hiperinmune contra *T. cruzi*. Esta técnica evidenciaba claramente las formas intracelulares del parásito aún en ausencia de procesos inflamatorios, a 40 y 100 aumentos, además de identificar también la presencia de un inmunoprecipitado en las lesiones inflamatorias, lo cual no era evidente en los cortes teñidos con H y E. Por ello, esta técnica se sugirió de gran valor en la investigación experimental y en el diagnóstico clínico, en donde se trataron de identificar pocos parásitos o bien fragmentos de éstos (Crocker B., et al, 1983).

En 1985 Barbosa identificó los amastigotes en cortes de tejido de ratón infectado en fase aguda y en tejidos de humano (primer trabajo realizado con material humano) tales como placenta y corazón durante la fase crónica de la infección, argumentando que en la fase aguda, la localización de los parásitos era relativamente sencilla debido a su gran número en el tejido, mientras que en la fase indeterminada y crónica la localización se hacía relativamente difícil y poco frecuente, sin embargo con la técnica de peroxidasa antiperoxidasa (PAP) se encontró en todos los casos reactividad positiva (Barbosa A., et al, 1985).

El siguiente trabajo fue realizado por Barbosa y cols. en el año 1986, en el cual se llevó a cabo un estudio comparativo entre el método convencional de tinción con H y E y el de IHQ de PAP para la investigación del parasitismo tisular en la CCC de humanos, encontrando muy superior el método de IHQ en la detección tanto de nidos y amastigotes aislados como del Ag adsorbido en la fase crónica de la infección. Este procedimiento validó la importancia del método para su introducción a nivel de las pruebas diagnósticas postmortem en el laboratorio (Barbosa A., et al, 1986).

El estudio anterior causó gran impresión en los círculos de investigación de la enfermedad de Chagas en Brasil, en donde se consideraba a esta enfermedad como una de las etiologías más frecuentes de miocarditis crónica, por lo que se realizó una investigación con el fin de comparar la sensibilidad y especificidad de las técnicas empleadas en su diagnóstico tales como: ECG, histología, IFD, IFI y la técnica de IHQ practicada en biopsias de corazón, llegando a la conclusión de que ninguna de ellas era cien por ciento sensible, ni cien por ciento específica, sin embargo la combinación de la ECG y la IHQ resultaron ser cien por ciento sensibles para el diagnóstico de dicha patología (Morales M., et al, 1967).

Por ello, se considera de gran utilidad aplicar esta técnica ya que durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas se pueden encontrar grandes agregados de parásitos que podrían ser evidentes cuando los tejidos son teñidos por la técnica de H y E o bien solo encontrarse focos inflamatorios en donde el parásito no se logra hacer evidente. Para ello se empleó en el laboratorio la técnica de IHQ, en la cual se toman en cuenta tanto parámetros morfológicos como antigénicos lo que hace de esta metodología una técnica sensible para la detección tanto de parásitos como de material antigénico.

4. MATERIAL Y METODOS:

4.1.1 CULTIVO IN VITRO DE *Trypanosoma cruzi* CEPA NINOA:

MEDIOS DE CULTIVO PARA *T. cruzi*:

1) MEDIO LIT:

NaCl	4.0 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄	6.0 g
Glucosa	2.0 g
Triptosa (difco u Oxoid)	5.0 g
Infusión de Hígado	5.0 g
Suero fetal bovino (SFB)	100.0 ml
Hemina (disolver en trietanolamina o NaOH, para obtener una concentración de 50 mg/ml)	25.0 mg
Agua bidestilada cbp	1000.0 ml

Preparación:

Disolver los componentes del medio de cultivo en agua bidestilada. Ajustar el pH a 7,2 con HCl concentrado. Realizar una filtración a través de un papel filtro Wathman, posteriormente prefiltrar el medio de cultivo a través de membranas de 0.45 µ de diámetro de poro en EKS-Seltz, bajo presión negativa o a través de filtros Millipore desechables bajo presión positiva. Finalmente esterilizar el medio de cultivo por filtración a través de una membrana de 0.45 µ, en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

4.1.2 MEDIO NAKAMURA (DIALIZADO):

Extracto de hígado o de carne	10.0 g
NaCl	4.0 g

Na ₂ HPO ₄	5.0 g
Agua destilada	500.0 ml
Sangre Humana tipo O	500.0 ml

Preparación:

Disolver las sales con el agua destilada.

Calentar un poco la solución.

Agregar el extracto de hígado y mezclar hasta solubilizarlo moviendo constantemente.

Ya sin calentar agregar la sangre poco a poco, mantener en agitación constante.

Colocar la mezcla en membranas de diálisis midiendo el volumen del contenido (aproximadamente 20 ml/membrana).

Colocar de 2 a 3 membranas de diálisis en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y agregar el doble de volumen del contenido en las membranas, de SSI.

Esterilizar el medio en autoclave.

Una vez esterilizado el medio, someter a prueba de esterilidad, incubándolo durante 24 h a 37°C.

OBTENCION DE LAMINILLAS CON EPIMASTIGOTES

1. A partir del medio de cultivo Nakamura, obtener los epimastigotes.
2. En un tubo de ensayo Pyrex con tapón de roca de 13 X 100 mm, verter aproximadamente unos 5 ml del medio de cultivo.
3. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 min (Beckman Model J 2-21 Centrifuge).
4. Lavar 3 veces el paquete celular con PBS 0.01 M, pH 7.2.
5. Reconstituir en PBS el paquete celular en una cantidad equivalente a 10 veces el volumen del botón.
6. Observar en el microscópio de contraste de fase con el objetivo de 25X y verificar que hayan aproximadamente de 10 a 25 parásitos/campo, de no ser así, ajustar la concentración.

7. Colocar una gota de la suspensión de parásitos sobre un portaobjetos esmerilado (dentro de una zona delimitada previamente con un lápiz con punta de diamante).

8. Dejar secar al aire.

9. Conservar en refrigeración a -20°C .

4.1.3 MEDIO M-16 (MEDIO DE CULTIVO PARA INDUCIR A LA METACICLOGENESIS):

NaCl	0.40 %
KCl	0.04 %
Na_2HPO_4	0.80 %
Glucosa	0.20 %
Triptona	0.12 %
Suero Bovino inactivado	2.50 %
Hemoglobina	2.00 %

Preparación:

Disolver todas las sales y la hemoglobina en agua destilada.

Ajustar el pH de la suspensión a 6.7 con HCl concentrado o NaOH 1 M, empleando un potenciómetro (Beckman Zeromatic II).

Filtrar la suspensión con papel filtro Wathman.

Filtrar la solución por presión positiva a través de un prefiltro colocado dentro de una unidad de filtración.

Filtrar 2 veces por una membrana de 0.45μ .

Filtrar en condiciones de esterilidad (en campana de flujo laminar), a través de un prefiltro seguido de un filtro de 0.45μ de diámetro de poro, contenidos en una unidad de filtración previamente esterilizada y recibir el filtrado en frascos estériles.

El medio de cultivo se somete a prueba de esterilidad, incubándolo durante 24 h a 37°C .

OBTENCION DE METACICLICOS IN VITRO:

Partir de un inóculo de 2×10^7 epimastigotes del medio BHI, que se transfieren a medio LIT.

Incubar a 29°C y cada 48 h, realizar pases hasta alcanzar una concentración de 8×10^7 células/ml.

Una vez obtenida esta concentración, centrifugar la suspensión de parásitos a 5000 g (centrifuga RT 6000 B), durante 10 min.

Eliminar el sobrenadante y lavar el botón con medio M-16.

Resuspender el paquete celular en M-16 a una concentración final de 2×10^7 células/ml.

Incubar la suspensión durante 5 días a 29°C .

Revisar el cultivo al quinto día y verificar que existan de un 70 a un 90% de tripomastigotes metacíclicos.

De ser así centrifugar a 5000 g durante 10 min.

Resuspender el paquete celular en un volumen igual de suero humano fresco.

Incubar la suspensión a 29°C durante 1 h, proceso durante el cual los epimastigotes susceptibles al complemento se lisan.

Transcurrida la incubación centrifugar a 800 rpm, 3 minutos.

Reposar el centrifugado durante 30 min, tiempo durante el cual los metacíclicos viables, comenzarán a desplazarse hacia el sobrenadante, quedando en el fondo del tubo los *detritus celulares* y en el sobrenadante los parásitos vivos.

Tomar el sobrenadante y trabajar con éste.

Si se desea obtener amastigotes, centrifugar nuevamente el sobrenadante y resuspender el paquete celular en el mismo volumen de medio LIT.

Incubar durante 5 días a 29°C .

Obtener los amastigotes centrifugando a 2000 g durante 1 minuto.

4.2 CULTIVO DE LINEAS CELULARES:

LAVADO DEL MATERIAL DE VIDRIO:

- a) Si el material es nuevo o tiene residuos de material seco, se debe colocar en una solución de etrán del 2-5% a ebullición durante 30 min. Enjuagar con abundante agua de la llave. Si el material no está muy sucio, continuar con el siguiente paso.
- b) Remojar en solución comercial de cloro (cloralex) 1:10 (solución preparada con agua de la llave) durante toda la noche.
- c) Enjuagar con agua corriente y remojar en HCl 1:60 (solución preparada con agua de la llave) durante toda la noche.
- d) Enjuagar abundantemente con agua corriente y si es necesario tallar con un escobillón de uso exclusivo para este material (nunca usarlo para detergente).
- e) Enjuagar de 3 a 4 veces con agua destilada.
- f) Secar en el horno y esterilizar.

MEDIO DE RPMI-1640 PARA CULTIVO DE CELULAS:

RPMI-1640 10X	10.0 ml
NaHCO ₃ al 7.5%	1.5 ml
Hepes 1 M, pH 7.2-7.3	2.5 ml
Suero fetal bovino inactivado	10.0 ml
Agua destilada estéril cbp	100.0 ml

Preparación:

RPMI-1640 10X:

Pesar 1.04 g del medio en polvo y disolverlo en 92.5 ml de agua destilada.

Filtrar con un papel filtro Wathman.

Esterilizar por filtración pasando el RPMI, a través de una membrana con diámetro de poro de 0.45 μ .

Hepes 1 M:

Pesar 11.6 g de Hepes y disolverlo en 50 ml de agua destilada.

Ajustar el pH con HCl concentrado o con NaOH 1 N a 7.2-7.3.

Esterilizar en autoclave.

NaHCO₃ al 7.5%:

Pesar 7.5 g de NaHCO₃ y disolver en agua destilada.

Esterilizar por filtración, con filtros millipore desechables de diámetro de poro de 0.45 μ .

Nota: si el RPMI en polvo no se encuentra suplementado con L-Gln, entonces a 99.0 ml del medio de cultivo preparado agregar 1 ml de L-Gln 100X.

CULTIVO DE LA LINEA CELULAR P-368 (Mφs HUMANOS):

- a) Sacar de la cámara de nitrógeno líquido las alícuotas de la línea celular.
- b) Descongelar las células colocando el vial en un baño maría a 37°C moviéndolas constantemente (se deben descongelar lo más rápidamente posible).
- c) Centrifugar la suspensión celular a 1000 g, durante 8 min (centrifuga RT 6000 B).
- d) Eliminar el sobrenadante en condiciones de esterilidad.
- e) Lavar las células con 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640.
- f) Centrifugar a 1000 g, durante 8 min.
- g) Agregar el medio de cultivo RPMI-1640.
- h) Resuspender las células.
- i) Transferir a una botella de cultivo Nunclon de 25 cm² (50 ml).
- j) Colocar las botellas horizontalmente y con el tapón bien cerrado en una incubadora a 37°C si el medio contiene Hepes; o bien con el tapón flojo en una atmósfera con el 5-6% de CO₂ y el 94-95% de aire estéril si no contiene Hepes.

k) Cambiar el medio cada vez que éste se acidifique y adquiera un color amarillo (aproximadamente cada tercer día).

l) Observar al microscopio invertido el cultivo (Zeiss West Germany), si la monocapa ya esta formada tripsinizar para hacer el pase celular a otra botella.

PASE CELULAR:

a) Decantar el medio de cultivo acidificado y agregar de 1 a 2 ml de una solución de tripsina-verseno al 0.05% estéril (IN VITRO). Dejar que la tripsina bañe a la células durante 30-45 seg rotando la botella lentamente.

b) Decantar la tripsina y repetir el paso anterior. Colocar la botella en la incubadora y observar cada 2 ó 3 min hasta que las células se desprendan de la superficie (dar ligeros golpes a la botella).

c) Agregar 10 ml de medio de cultivo y acabar de disgregar las células absorbiendo y expeliendo con una pipeta de 5 ó 10 ml. Colocar 2.5 ml de la suspensión de células en otra botella para cultivo y agregar 7.5 ml más de medio de cultivo; preparar 2 botellas de cultivo Nunclon de 50 ml. El pase realizado es de 1:4 lo cual significa que de una botella se diluyeron las células lo suficiente para tener 4 cultivos nuevos, o bien emplear solo 1 frasco de cultivo celular Nunclon de 75 cm² (260 ml).

d) Colocar las botellas horizontalmente e incubar.

e) Revisar los cultivos diariamente en el microscopio invertido.

CONSERVACION DE LA LINEA CELULAR (CONGELAMIENTO):

1. Centrifugar una concentración aproximada de 5×10^6 células/ml en tubos Falcon de 15 ml estéril a 4°C y a 3000 rpm, depositar el tubo con el paquete celular en hielo, eliminar el medio de cultivo y agregar 1 ml del medio para congelar (suero fetal bovino inactivado con 10% de DMS), enfriado previamente a 4°C. Realizar todo en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar.

2. Resuspender las células y transferirlas a una ampollita de plástico estéril con tapón de rosca (Bio-Freeze) para su congelación. Cerrar la ampollita tratando de no mojar la parte superior para evitar la contaminación.

3. Depositar las ampollitas en una gradilla e introducir ésta en una caja de poliestireno con tapa, de paredes de 14 mm de grosor aproximadamente.
4. Depositar la caja a -70°C durante 1 día y después transferir las ampollitas a una cámara de nitrógeno líquido.

OBTENCION DE Mφs INFECTADOS CON TRIPOMASTIGOTES METACICLICOS EN CUBREOBJETOS

- a) Esterilizar los cubreobjetos de 13 mm de diámetro con óxido nítrico.
- b) Colocar los cubreobjetos ya estériles en cajas multipozos (Multidisch 24 Wells, Nunclon Delta S).
- c) Realizar el pase celular de los Mφs P-388 de humano de la botella, a los cubreobjetos.
- d) Agregar medio de cultivo RPMI-1640 e incubar a 37°C, con una atmósfera del 5% de CO₂ y 95% de aire estéril.
- e) Cambiar el medio de cultivo diariamente.
- f) Cuando se obtenga la confluencia adecuada, proceder a la infección de los Mφs con tripomastigotes metacíclicos del medio de cultivo M-16, en una proporción parásito:Mφ de 1:1.
- g) Incubar los Mφs infectados a 37°C durante 2 horas, tiempo durante el cual el Mφ fagocita a los parásitos que se han adherido a su membrana.
- h) En condiciones de esterilidad lavar los pozos de la placa 3 veces con RPMI 1640.
- i) Incubar las cajas multipozos durante un tiempo aproximado de 120 h (5 días) en las condiciones antes referidas, ya que después de este tiempo el ciclo de vida del parásito es completado y se libera en forma de tripomastigote.
- j) Eliminar el medio de cultivo de las cajas multipozos, lavar 3 veces con PBS 0.01 M, pH 7.2 y finalmente fijar los Mφs con metanol absoluto.
- k) Los cubreobjetos con Mφs infectados se conservan en refrigeración a -20°C.

4.3 TÉCNICA DE IHQ PARA EL ANTICUERPO MONOCLONAL Y EL POLICLONAL:

4.3.1 Anticuerpo policlonal:

- a) Bloquear la peroxidasa endógena con una solución de Metanol- H_2O_2 (9 ml de metanol absoluto + 1 ml de H_2O_2 al 30%).
- b) Lavar las laminillas 3 veces en una solución amortiguadora de PBS 0.01 M, pH 7.2 (3 min cada lavado).
- c) Eliminar el exceso de solución amortiguadora con una gasa.
- d) Bloquear los sitios que pudieran generar un pegado inespecífico de los Acs, con una solución de albúmina sérica bovina (ASB) al 1% en PBS 0.01 M, pH 7.2.
- e) Lavar las laminillas una vez con solución amortiguadora de PBS.
- f) Secar las laminillas con una gasa.
- g) Agregar el Ac primario diluido en solución de ASB al 1% (Suero hiperinmune de conejo anti-epímaístigotes de *T. cruzi*).
- h) Incubar las laminillas durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- i) Lavar las laminillas tres veces con PBS.
- j) Secarlas con una gasa.
- k) Agregar el Ac secundario diluido en ASB al 1% (Ac biotinilado, anti-IgG de conejo, preparado en chivo).
- l) Incubar las laminillas durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- m) Lavarlas tres veces con PBS.
- n) Secarlas con una gasa.
- o) Agregar el sistema avidina peroxidasa.
- p) Incubar durante 1 h a Temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- q) Lavarlas 3 veces.
- r) Secarlas con una gasa.
- s) Agregar el sistema revelador DAB (3,3-Diclorofenil diaminobencidina) que contiene: 6 mg de DAB; 10 ml de solución amortiguadora Tris 0.05 M, pH 7.6 y 10 μ l de H_2O_2 al 30%.

- t) Incubar durante 10 min.
- u) Parar la reacción sumergiendo las laminillas en PBS.
- v) Contrateñir los tejidos con hematoxilina de Harris, durante 10 min.
- w) Lavar las laminillas con agua de la llave, eliminando el exceso de colorante.
- x) Montar con una resina a base de glicerol y polivinilo.

4.3.2 Anticuerpo monoclonal biotinilado:

- a) Bloquear la peroxidasa endógena con una solución de Metanol- H_2O_2 (9 ml de metanol absoluto + 1 ml de H_2O_2 al 30%).
- b) Lavar las laminillas 3 veces en una solución amortiguadora de PBS 0.01 M pH 7.2, durante 3 min cada lavado.
- c) Eliminar el exceso de solución amortiguadora con una gasa.
- d) Bloquear los sitios de pegado inespecífico de los Acs, con una solución de albúmina sérica bovina (ASB) al 1% en PBS 0.01 M pH 7.2, durante 30 min a temperatura ambiente.
- e) Lavar las laminillas una vez con solución amortiguadora de PBS.
- f) Secar las laminillas con una gasa.
- g) Agregar el Ac primario diluido en solución de ASB al 1% (Ac monoclonal biotinilado anti-amastigotes *T. cruzi* o 2C2).
- h) Incubar las laminillas durante 1 h o a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- i) Lavar las laminillas tres veces con PBS.
- j) Secarlas con una gasa.
- k) Agregar el sistema avidina peroxidasa.
- l) Incubar durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- m) Lavarlas 3 veces.
- n) Secarlas con una gasa.

o) Agregar al sistema revelador DAB (3,3-Diclorofenil diaminobencidina) que contiene: 6 mg de DAB; 10 ml de solución amortiguadora Tris 0.05 M pH 7.6 y 10 μ l de H₂O₂ al 30%.

p) Incubar durante 10 min.

q) Parar la reacción sumergiendo las laminillas en PBS.

r) Contrateñir los tejidos con hematoxilina de Harris, durante 10 min.







s) Lavar las laminillas con agua de la llave, eliminando el exceso de colorante.

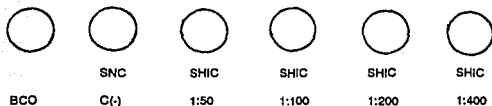
t) Montar con resina a base de glicerol y polivinilo.

NOTA: EN NINGUN MOMENTO DEBE PERMITIRSE QUE EL TEJIDO SE SEQUE, YA QUE ENTONCES SE PRODUCE UN PEGADO INESPECIFICO QUE GENERA UNA REACCION FALSA POSITIVA.

4.4 ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE IHQ:

Para realizar la estandarización de los sueros, se requieren laminillas de espiroastigotes empleadas como controles positivos y cubreobjetos con Mps infectados con amastigotes, utilizados como controles positivos del tejido.

					
BCO	SHIC C(-)	SHIC 1:50	SHIC 1:100	SHIC 1:200	SHIC 1:400



_ El blanco consiste en eliminar el Ac primario o suero hiperinmune de conejo anti-epimastigote de *T. cruzi* (SHIC) y en su lugar incubar las laminillas con PBS 0,01 M, pH 7.2.

- a) Para el Ac policlonal:

El control negativo [C(-)], consiste en eliminar el Ac primario (SHIC) y en su lugar incubar las laminillas de Mφs infectados y epimastigotes con Suero normal de conejo (SNC). (Figura 5).

- b) Para el Ac monoclonal biotinilado:

El C(-) consiste en emplear Mφs no infectados incubados con el Ac monoclonal anti-amastigotes.

- En las laminillas problema se ensayan diferentes diluciones del SHIC y del Ac monoclonal biotinilado, las cuales comprenden un intervalo de dilución de 1:50 a 1:400. (Figura 6).

- Para determinar el resultado de la estandarización:

Se elige la máxima dilución del Ac a la cual todavía se observa nítido el Inmunoprecipitado color sepia.

4.5 INFECCION DE RATONES DE LA CEPA BALB/c.

Se inocularon 20 ratones de la cepa BALB/c vía intradérmica con 10^3 tripomastigotes metacíclicos, en ambos cojinetes plantares de las extremidades posteriores.

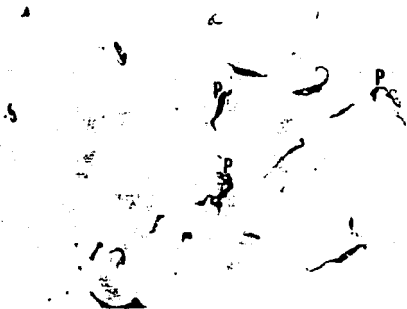
Los tripomastigotes metacíclicos fueron obtenidos de la orina de triatomas infectados con el parásito. Esta suspensión celular, se lavó tres veces en PBS 0,01 M, pH 7.2 y el paquete celular fue resuspendido en PBS a la concentración deseada.

Figura 5



Fotografía que muestra el blanco de reactivos en la técnica de IHQ. P = Parásitos de cultivo (400 aumentos)

Figura 6



Fotografía que muestra la reacción positiva con el SHIC a dilución 1:100. P = Parásitos de cultivo que presentan un inmunoprecipitado color sepia sobre la membrana y el cinetoplasto (400 aumentos).

4.6 CURVA DE PARASITEMIA

Se determinaron los niveles de parasitemia de tres ratones infectados cada tercer día durante 80 d, seccionando una porción de la cola del animal y tomando con una micropipeta 5 μ de sangre que era colocada entre porta y cubreobjetos. En el microscopio óptico (Leitz) se cuantificaba el número de parásitos hallados en todos los campos a 16X y posteriormente se obtenía el número total de parásitos/ml, realizando la siguiente operación:

$$\# P/ml = \# P \text{ cuantificados en } 5 \mu l * 1000 \mu l \text{ sangre}$$

5 μ l de sangre

Donde:

P/ml = número de parásitos por cada ml de sangre del animal

P cuantificados en 5 μ l = número de parásitos totales cuantificados en los 5 μ l.

Finalmente se realizó el promedio de los 3 resultados obtenidos y éstos se graficaron contra el tiempo de inoculación.

4.7 OBTENCION DE LOS ORGANOS DE LOS RATONES DE LOS GRUPOS CONTROL E INFECTADOS.

Materia biológico:

Se emplearon ratones jóvenes adultos de la cepa BALB/c infectados y no infectados, en los diferentes periodos de tiempo establecidos para el modelo.

Metodología:

Se obtuvieron los órganos de los ratones infectados, por medio de una evisceración *in situ* a diferentes tiempos postinoculación (Pi.), como se muestra en la Tabla 1:

TABLA 1

No. DE RATONES			ORGANOS					
NO INFECTADOS	INFECTADOS	TIEMPO Pi.	*P	ME	G	H	B	C
2	2	1 h	*	-	-	-	-	-
2	2	4 h	*	-	-	-	-	-
2	2	24 h	*	*	*	*	*	*
2	2	48 h	*	*	*	*	*	*
2	2	96 h	*	*	*	*	*	*
2	2	7 d	*	*	*	*	*	*
2	2	15 d	*	*	*	*	*	*
2	2	30 d	*	*	*	*	*	*

* P=PIEL

G=GANGLIO

B=BAZO

ME=MUSCULO

H=HIGADO

C=CORAZON

ESQUELETICO

- a) Forrar una tabla de unisel con papel de estrasa.
- b) Aseptizar el instrumental flameándolo.
- c) Prepararse para la disección del animal, colocándose los lentes de seguridad, guantes y cubrebocas.
- d) Descerebrar al ratón.
- e) Fijar las patas del animal sobre la tabla de unisel con afilares.

- f) Humedecer la piel del ratón con un algodón impregnado de agua para evitar que los órganos se contaminen con los pelos del animal.
- g) Estirar la piel del abdomen empleando las pinzas con dientes y estirarla para realizar una pequeña incisión en forma de ojal con las tijeras curvas.
- h) Tomar con los dedos índice y pulgar de la mano derecha, la parte proximal alrededor del ojal y con la mano izquierda la parte distal alrededor del ojal y tirar con fuerza en direcciones opuestas para desprender la piel del animal de manera rápida y sencilla.
- i) Una vez desprendida la piel realizar una incisión en el peritoneo para obtener el hígado y el bazo.
- j) Posteriormente se abre la caja torácica de donde se obtiene el corazón.
- k) La muestra de piel se obtiene de las zonas de inoculación (cojinete plantar de ambas extremidades posteriores).
- l) El ganglio se obtiene de la región del popliteo.
- m) La muestra del músculo estriado se obtiene de la pata trasera.
- n) Los órganos se fijan en formol al 10% o en solución de Bouin se incluyen en parafina y se cortan en el microtomo de rotación (Minot). Parte de los cortes son teñidos con H y E para microscopía óptica, y la otra parte se emplea para realizar la técnica de IHQ.
- o) Aseptizar el área de trabajo con iodo, luego con solución de antibenzal dejando que actúe durante unos minutos. Finalmente limpiar la zona.
- p) Incinerar los restos de los ratones.

4.8 TECNICA HISTOLOGICA DE RUTINA.

- a) Los fragmentos de los órganos obtenidos deben tener aproximadamente 1 cm³ de volumen.
- b) Fijar los tejidos en una solución de formol al 10% o de Bouin.
- c) Lavarlos en agua corriente y se colocarlos en las rejillas.
- d) Deshidratarlos con alcoholes del 70, 80, 90, 96, 98, 100 y 100%.
- e) Aclararlos con xilol.

- f) Infiltrar los tejidos en parafina líquida.
- g) Incluirlos en los cassettes.
- h) Rebejar el bloque y obtener los cortes en el microtomo de rotación Minot.
- i) Realizar la tinción del tejido por la técnica de H y E:
 - i.1 Desparafinar los cortes de tejido en xilol, durante 10 min.
 - i.2 Desparafinar los cortes de tejido en xilol, durante 10 min.
 - i.3 Hidratar los tejidos con alcohol-xilol, durante 2 min.
 - i.4 Hidratar de los tejidos con alcohol al 100 % durante 2 min, al 100% por 2 min, al 96% por 2 min y al 96% por 2 min.
 - i.5 Lavar los tejidos en agua corriente.
 - i.6 Teñirlos con hematoxilina de Harris, durante 3 a 5 min.
 - i.7 Lavarlos en agua corriente.
 - i.8 Sumergirlos en una solución de alcohol ácido al 1%, durante un par de segundos.
 - i.9 Lavarlos en agua corriente.
 - i.10 Sumergirlos en carbonato de litio, durante 30-50 seg.
 - i.11 Lavarlos en agua corriente.
 - i.12 Teñirlos con eosina amarilla, durante 2 a 4 min.
 - i.13 Deshidratar los tejidos ya teñidos en alcoholes del 96, 96, 100 y 100%, durante 2 min en cada uno.
 - i.14 Sumergirlos en Alcohol-Xilol, durante 2 min.
 - i.15 Sumergirlos en Xilol, durante 3 min.
 - i.16 Sumergirlos en Xilol, durante 3 min.
 - i.17 Montarlos con bálsamo de Canadá.

NOTA: antes de emplear la hematoxilina de Harris, debe ser filtrada.

Resultados:

Núcleos: azul oscuro.

Ribosomas: azul oscuro.

Citoplasma: rosa claro.

Músculo: rosa claro.

4.9 OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE LOS CORTES HISTOLOGICOS PARA LA TECNICA DE IHQ

- a) Realizar cortes de 6 μ de los bloques de tejido incluidos en parafina.
- b) Desparafinar los tejidos en una estufa a 54°C, durante 30 min.
- c) Sumergir las laminillas en los 2 recipientes de xilol del tren de tinción para H y E, durante 2 min.
- d) Sumergir las laminillas en etanol absoluto durante 2 min, después de lo cual quedan listas para su empleo en la técnica de IHQ.

4.10 TECNICA DE IHQ EN CORTES DE PARAFINA

Una vez que se estandarizó la técnica para epimastigotes y M ϕ s infectados con amastigotes, se emplean las mismas diluciones en los tejidos embebidos en parafina, de acuerdo con la técnica de IHQ:

- 1) Realizar la desparafinación e hidratación del tejido como se indica en el punto 4.9.
- 2) Realizar la técnica de IHQ como se indica en el punto 4.3.

Los órganos se procesaron de la siguiente manera (Tablas 2 y 3):

TABLA 2

a) Con el Ac policlonal (SHIC):

BCO	C(-)	TIEMPO P.I. Hs					DIAS			ORGANOS
		1	4	24	48	96	7	15	30	
*	*	-	-	*	*	*	*	*	*	CORAZON
*	*	-	-	*	*	*	*	*	*	MUSCULO
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	PIEL
*	*	-	-	*	*	*	*	*	*	GANGLIO
*	*	-	-	*	*	*	*	*	*	HIGADO
*	*	-	-	*	*	*	*	*	*	BAZO

TABLA 3

b) Con el Ac monoclonal biotinilado:

BCO	TIEMPO P.I. Hs					DIAS			ORGANOS
	1	4	24	48	96	7	15	30	
*	-	-	*	*	*	*	*	*	CORAZON
*	-	-	*	*	*	*	*	*	MUSCULO
*	*	*	*	*	*	*	*	*	PIEL
*	-	-	*	*	*	*	*	*	GANGLIO
*	-	-	*	*	*	*	*	*	HIGADO
*	-	-	*	*	*	*	*	*	BAZO

Se tomaron como resultados positivos, todos aquellos fragmentos de tejido que presentaban un inmunoprecipitado color sepia y la morfología característica del parásito en el estado intracelular de reproducción (amastigote o nidos de amastigotes) y/o la presencia de un inmunoprecipitado que denote la liberación de material antigénico.

De cada uno de los órganos que presentaron una reactividad positiva, se procesaron un promedio de 10 cortes para realizar un estudio semicuantitativo.

5. RESULTADOS

5.1 CURVA DE PARASITEMIA:

Se investigó la presencia del parásito en la sangre del animal desde el primer día de inoculación y a intervalos de tiempo aproximados de 72 h durante 80 días, tiempo en el cual ya no se observaron parásitos. Los datos obtenidos fueron los siguientes (Tabla 4):

Tabla 4

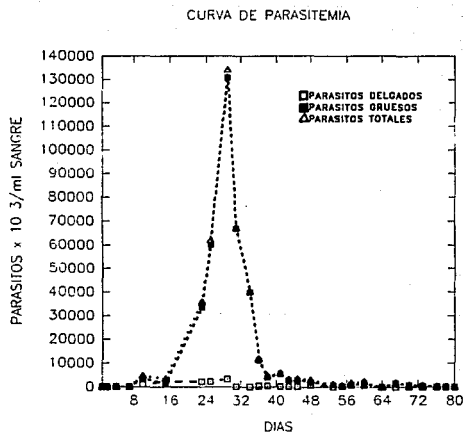
DIA P ¹	PROGRESION FUSIFORME		P ² TOTALES/miSANGRE
	P DELGADOS/ml	P GRUESOS/ml	
24 H	0	0	0
48 H	0	0	0
4 D	0	0	0
7 D	0	0	0
10 D	1 000	3 500	4 500
15 D	2 300	1 000	3 300
23 D	2 100	33 400	35 500
25 D	2 000	60 000	62 000
26 D	3 200	130 733	133 933
31 D	200	66 800	67 000
34 D	0	39 800	39 800
36 D	400	11 200	11 600
38 D	400	4 000	4 400
41 D	200	5 400	5 600
43 D	200	2 800	3 000
45 D	400	3 000	3 400
48 D	800	2 000	2 800
53 D	0	800	800
55 D	200	200	400
57 D	800	600	1 400
60 D	800	1 400	2 000
64 D	0	0	0
67 D	0	1 600	1 600
70 D	0	600	600
73 D	0	400	400
76 D	0	200	200
78 D	0	0	0
80 D	0	0	0

P¹ = POST-INOCULACION

P² = PARASITOS

Que proporcionaron la siguiente gráfica (Figura 4):

FIGURA 4



Donde el pico de parasitemia se registró el día 30 p.l. con 133 933 parásitos/ml de sangre del animal.

Durante los días previos al 10 p.i. no se encontraron parásitos, sin embargo, a partir de este día se detectaron 4 500, predominando las formas gruesas. El nivel máximo de parasitemia se presentó en el día 29 con 133 933 parásitos/ml de sangre. Después del día 60 p.i. no se detectaron formas delgadas, sin embargo, los gruesos persistieron; la parasitemia remitió en el día 78 p.i. (Tabla 4, Figura 4).

La gráfica muestra la tendencia de la parasitemia y no describe semi o cuantitativamente este parámetro.

5.2 OBSERVACIONES ANATOMOPATOLOGICAS DE LOS RATONES INOCULADOS CON TRIPOMASTIGOTES METACICLICOS:

Tabla 5

DIA PI	PARASITEMIA # P/ml SANGRE		HALLAZGOS ANATOMOPATOLOGICOS
	DELGADOS	GRUESOS	
1 H	0	0	NINGUNO.
4 H	0	0	NINGUNO.
24 H	0	0	NINGUNO.
48 H	0	0	NINGUNO.
96 H	0	0	NINGUNO.
7 D	0	0	ESPLENOMEGALIA E INFARTO GANGLIONAR.
15 D	2 300	1 000	LINFADENOPATIA (3mm DE DIAMETRO) HEPATOESPLENOMEGALIA.
30 D	3 200	133 733	LINFADENOPATIA (3 mm DE DIAMETRO) HEPATOESPLENOMEGALIA.

En lo que respecta a los hallazgos anatomopatológicos, a partir del día 7 p.i. se detectó una ligera esplenomegalia además de linfoma ganglionar aunque el parásito aún no se detectaba en sangre (posiblemente debido a la baja sensibilidad del método). Entre los días 15 y 30 p.i. se presentó una importante hepatoesplenomegalia y linfadenopatía (ganglio linfático regional) la cual correlacionaba con el inicio de la parasitemia y las altas concentraciones del parásito, respectivamente (Tabla 5).

5.3 OBSERVACIONES DEL TIPO DE INFILTRADO E HISTOPATOLOGIA EN LOS TEJIDOS TEÑIDOS CON HEMATOXILINA Y EOSINA:

Tabla 6

ORGANO	TIEMPO PI	HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS
MUSCULO ESQUELETICO	24 H	SIN ALTERACIONES.
	48 H	SIN ALTERACIONES.
	96 H	SIN ALTERACIONES.
	7 D	MIOSITIS LEVE.
	15 D	MIOSITIS MODERADA, NEURITIS, INFILTRADOS INFLAMATORIOS INTERSTICIALES Y PERIVASCULARES DE CMN, PRESENCIA DE NIDOS DE AMASTIGOTES.
	30 D	MIOSITIS GRAVE, PERINEURITIS, INFILTRADOS INFLAMATORIOS INTERSTICIALES Y PERIVASCULARES DE TIPO CRONICO, FIBRAS NECROTICAS CON Y SIN PARASITO, NIDOS DE AMASTIGOTES SIN INFILTRADO.

CORAZON	24 H	SIN ALTERACIONES.
	48 H	SIN ALTERACIONES.
	96 H	SIN ALTERACIONES.
	7 D	INFLAMACION PERIVASCULAR DE TIPO CRONICO.
	15 D	INFILTRADOS EXTENSOS INTERSTICIALES DE TIPO MIXTO, PRESENCIA EN AMBOS VENTRICULOS DE NIDOS DE AMASTIGOTES.
	30 D	MIOCARDITIS SEVERA SUBEPICARDICA, INFILTRADOS INFLAMATORIOS PERIVASCULARES E INTERSTICIALES DE TIPO CRONICO, PERIVASCULITIS, NIDOS DE AMASTIGOTES EN LA REGION APICAL Y VENTRICULAR MEDIA.
HIGADO	24 H	SIN ALTERACIONES.
	48 H	SIN ALTERACIONES.
	96 H	SIN ALTERACIONES.
	7 D	SIN ALTERACIONES.
	15 D	HEPATITIS REACTIVA, INFILTRADOS PERIVASCULARES EXTENSOS.
	30 D	INFILTRADOS INFLAMATORIOS PERIVASCULARES CRONICOS.
BAZO	24 H	SIN ALTERACIONES.
	48 H	SIN ALTERACIONES.
	96 H	SIN ALTERACIONES.
	7 D	SIN ALTERACIONES.
	15 D	HIPERPLASIA FOLICULAR.
	30 D	ESPLENITIS REACTIVA E HIPERPLASIA FOLICULAR.

GANGLIO	24 H	SIN ALTERACIONES.
	48 H	SIN ALTERACIONES.
	96 H	SIN ALTERACIONES.
	7 D	HIPERPLASIA FOLICULAR.
	15 D	HIPERPLASIA FOLICULAR.
	30 D	ARTERITIS LINFOCITICA E HIPERPLASIA FOLICULAR.
PIEL	1 H	CUADRO HEMORRAGICO, TEJIDO TEGUMENTARIO LESIONADO, INFILTRADOS INFLAMATORIOS LEUCOCITARIOS DE TIPO AGUDO.
	4 H	EXTENSOS INFILTRADOS INFLAMATORIOS LEUCOCITARIOS, DE TIPO AGUDO, GRANDES CONCENTRACIONES DE Mfós.
	24 H	INFILTRADOS SUBCUTANEOS DE PMNs (Nos).
	48 H	INFILTRADOS INFLAMATORIOS MIXTOS EN EL TEJIDO SUBCUTANEO, QUE SE EXTIENDEN HASTA EL MUSCULO.
	96 H	INFILTRADOS MIXTOS.
	7 D	INFILTRADOS INFLAMATORIOS DE TIPO CRONICO.
	15 D	INFILTRADOS INFLAMATORIOS PERIVASCULARES CRONICOS EN LA DERMIS.
	30 D	INFILTRADOS INFLAMATORIOS CRONICOS PERIVASCULARES Y PERINEURALES, NEURITIS.

Con base en los resultados de la tabla 6, se refiere al día 7 como el tiempo post-inoculación a partir del cual se observan patologías detectables, las cuales en su mayoría se manifiestan como lesiones inflamatorias; sin embargo, no es sino hasta el día 15 p.i. cuando se logran detectar nidos de amastigotes únicamente en el tejido muscular esquelético y cardíaco ya que tanto en hígado como en bazo, ganglio y piel no pudieron ser observados. Cabe señalar que en piel los infiltrados inflamatorios agudos se presentaron durante las primeras horas, evolucionando hacia el día 7 en tipo mixto para dar origen a infiltrados de tipo crónico a partir del día 15 y hasta el día 30 p.i.

5.4 ESTANDARIZACION DE LOS SUEROS Y DEL COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA EMPLEADOS EN LA
TECNICA DE IHO:

A) ESTANDARIZACION DEL ANTICUERPO POLICLONAL (SHIC ANTI-*T. cruzi*):

Se empleó el SHIC #84, el cual presentó un título de 1:32 por la técnica de IDD.

A partir de este suero se realizaron diluciones de 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400 con albúmina sérica bovina al 1% en PBS 0.01 M y pH 7.2, las cuales se probaron en las laminillas control de epimastigotes y en los cubreobjetos con M ϕ s de la línea P-388 de humano, infectados con tripomastigotes metacíclicos obtenidos *in vitro* del cultivo M-16.

Se obtuvo el siguiente resultado:

- a.1) Dilución 1:50. Se observó la presencia del inmunoprecipitado color sepia sobre la membrana y el cinetoplasto de los epimastigotes y amastigotes en el citoplasma de los M ϕ s.
- a.2) Dilución 1:100. Se observó la presencia del inmunoprecipitado en los epimastigotes y amastigotes.
- a.3) Dilución 1:200. El inmunoprecipitado se observó muy tenue en ambos casos.
- a.4) Dilución 1:400. Casi no se observó el inmunoprecipitado.

El Ac secundario biotinilado al igual que el complejo avidina-peroxidasa se emplearon a una dilución de 1:1000.

Se eligió la dilución 1:100, ya que fué la máxima dilución del Ac a la cual todavía se observaba claramente el inmunoprecipitado.

b) ESTANDARIZACION DEL ANTICUERPO SECUNDARIO O ANTI-IgG DE CONEJO PREPARADO EN CHIVO, BIOTINILADO [ANTI-RABBIT IgG (WHOLE MOLECULE) BIOTIN CONJUGATE ANTIBODY DEVELOPED IN GOAT, SIGMA B-9642. LOT 69F 8845].

El instructivo del equipo comercial sugiere, se utilice el Ac secundario-biotinilado en una dilución de 1:5000, por ello se ensayaron diluciones de 1:1 000, 1:2 000, 1:4 000, 1:5 000, 1:7 000 y 1:10 000.

utilizándose el SHIC a dilución constante de 1:100, y el sistema avidina-peroxidasa a concentración constante de 1:1000 se encontró adecuada la dilución de 1:1 000 del Ac biotinilado.

c) ESTANDARIZACION DEL SISTEMA AVIDINA-PEROXIDASA.

Se empleó el SHIC a dilución constante de 1:100 y el Ac biotinilado a dilución de 1:1 000. En el equipo comercial se sugiere la utilización del sistema avidina-peroxidasa a una dilución de 1:5000, por ello se probaron las siguientes diluciones: 1:1 000, 1:2 000, 1:4 000, 1:5 000, 1:7 000 y 1:10 000; encontrándose adecuada la dilución de 1:5000.

d) ESTANDARIZACION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-AMASTIGOTES DE *T. cruzi*.

Se ensayaron diluciones del Ac con un intervalo de 1:50 a 1:400 (1:50, 1:100, 1:200 y 1:400), directamente sobre los tejidos en donde previamente se evidenciaron los nidos de amastigotes en laminillas teñidas con H y E (corazón de 15 días pl) empleándose el complejo avidina-biotina-peroxidasa a las concentraciones óptimas, mencionadas anteriormente. Se encontró adecuada la concentración de 1:100 para el Ac monoclonal.

La técnica de IHQ quedó estandarizada para los epimastigotes y los amastigotes de los Mps, a las siguientes diluciones:

Suero hiperinmune de conejo = 1:100

Anticuerpo monoclonal = 1:100

Anticuerpo biotinilado = 1:1000

Sistema avidina-peroxidasa = 1:5000

5.5 PRESENCIA DEL PARASITO Y/O ANTIGENO EN CORTES DE TEJIDO SOMETIDOS AL METODO DE IHO CON EL ANTICUERPO POLICLONAL.

Tabla 7 (Figuras 7-17)

	P.I.	ORGANO						
		MUSCULO ¹	CORAZON	HIGADO ²	BAZO	GANGLIO	PIEL ³	
NIDOS DE AMASTIGOTES SIN INFILTRADO	15 D	++	+++	-	-	-	-	
	30 D	++++	++	-	-	-	-	
AMASTIGOTES AISLADOS SIN INFILTRADO	15 D	+	+	-	-	-	-	
	30 D	+	+	-	-	-	-	
ANTIGENO LIBERADO SIN INFILTRADO	15 D	-	-	-	-	-	-	
	30 D	-	-	-	-	-	-	
NIDOS DE AMASTIGOTES CON INFILTRADO	15 D	+	+	-	-	-	-	
	30 D	+	+	-	-	-	-	
AMASTIGOTES AISLADOS SIN INFILTRADO	15 D	+	+	-	-	-	-	
	30 D	+	+	-	-	-	-	
ANTIGENO LIBERADO CON INFILTRADO	15 D	-	-	-	-	-	-	
	30 D	-	-	-	-	-	-	
PMN O CMN CON REACTIVIDAD POSITIVA*	1 H	-	-	-	-	-	-	
	4 H	-	-	-	-	-	-	
	24 H	-	-	-	-	-	-	
	48 H	-	-	-	-	-	-	
	96 H	-	-	-	-	-	-	

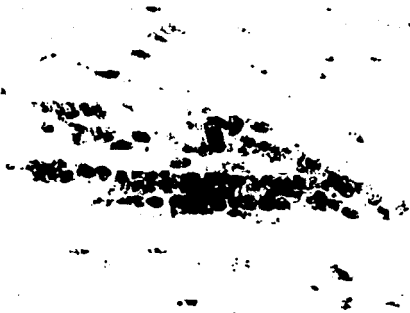
* REACTIVIDAD POSITIVA=PRESENCIA DEL INMUNOPRECIPITADO.

1 REACTIVIDAD POSITIVA INESPECIFICA EN EL TEJIDO ADIPOSEO, EN TODOS LOS TIEMPOS.

2 REACTIVIDAD POSITIVA INESPECIFICA EN LOS CANALICULOS BILIARES, EN TODOS LOS TIEMPOS.

3 REACTIVIDAD POSITIVA INESPECIFICA EN LAS VACUOLAS DE LAS GLANDULAS SEBACEAS, EN TODOS LOS TIEMPOS.

Figura 7



Fotografía del músculo cardíaco de ratón BALB/c, 15 días p.i. Se observa que la fibras cardíacas se encuentran invadidas por infiltrados inflamatorios que interactúan con los nidos de amastigotes. N = Nido de amastigote con reactividad positiva; I = Infiltrado inflamatorio (400 aumentos).

Figura 8



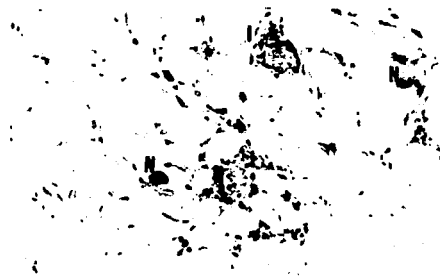
Fotografía del músculo esquelético de ratón BALB/c, 30 p.i. Se observa un nido de amastigotes rodeado por infiltrados inflamatorios. N = Nido de amastigote con reactividad positiva; I = Infiltrado inflamatorio (100 aumentos).

Figura 9



Fotografía del músculo esquelético de ratón BALB/c, 30 días p.i. Se observa un nido de amastigotes sin infiltrados inflamatorios en la periferia. N = Nido de amastigote con reactividad positiva (400 aumentos).

Figura 10



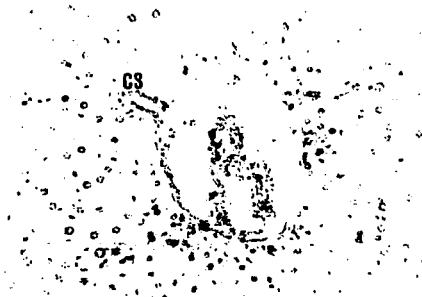
Músculo esquelético de ratón BALB/c, 30 días p.i. N = nidos de amastigotes con reactividad positiva; I = Infiltrados inflamatorios (160 aumentos).

Figura 11



Fotografía del músculo esquelético de ratón BALB/c, 30 días p.i. Se observa un nido de amastigotes infiltrado por células inflamatorias. N = Nido de amastigote; I = Infiltrado inflamatorio (400 aumentos).

Figura 12



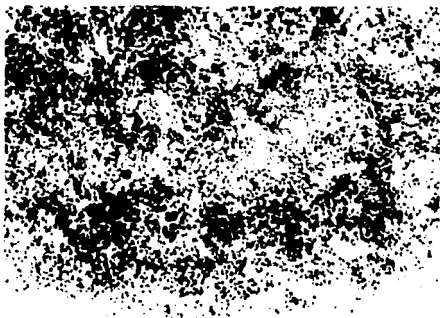
Fotografía del hígado de ratón BALB/c, 15 días p.i. Se observa que los canaliculos y/o sinusoides presentan una reactividad positiva inespecífica. CS = Canaliculo biliar o sinusoides con reactividad positiva (160 aumentos).

Figura 13



Fotografía del bazo de ratón BALB/c, 15 días p.i. No se encontró reactividad positiva (160 aumentos).

Figura 14



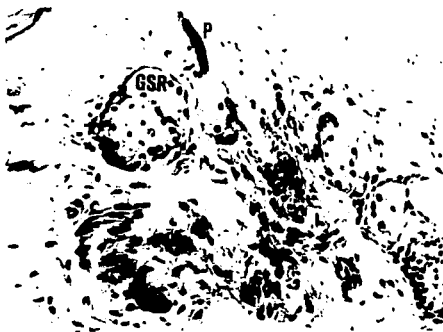
Fotografía del ganglio de la región del popliteo, 48 Hs p.i. No se encontró reactividad positiva (100 aumentos).

Figura 15



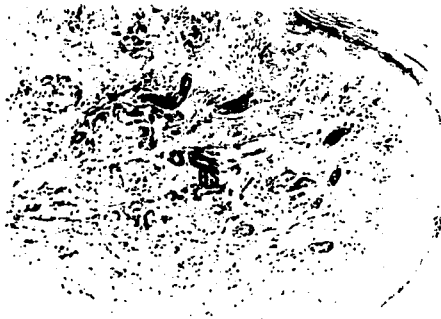
Fotografía de la piel del cojinete plantar (sitio de inoculación), 30 días p.i. Se encontraron extensos infiltrados inflamatorios de tipo crónico, sin embargo no se observó reactividad positiva. I = Infiltrados Inflamatorios (100 aumentos).

Figura 16



Fotografía de la piel del cojinete plantar, 15 días p.i. Se observa la presencia de glándulas sebáceas, folículo piloso y pelo con reactividad positiva inespecífica. GSR = Glándula Sebácea con reactividad positiva; FPR = Folículo Piloso con reactividad positiva y P = Pelo con una ligera reactividad positiva (100 aumentos).

Figura 17



Fotografía de la piel del cojinete plantar, 2 hs p.i. No se encontró reactividad, sin embargo se observaron abundantes infiltrados inflamatorios de tipo agudo y una gran cantidad de glándulas sebáceas (en proporciones mayores con respecto de los ratones no infectados). GS = Glándula Sebácea (100 aumentos).

Como se indica en la tabla 7 y en las figuras anteriores, fue entre el día 15 y 30 p.i. cuando se detectaron nidos de amastigotes en el músculo esquelético predominantemente durante el día 30, observándose de la misma manera en el músculo cardíaco durante el día 15 p.i. Es sorprendente el hecho de que la mayoría de los nidos se encontraban sin infiltrados inflamatorios sobre éstos o en la periferia y que sus células no presentaban Ag en el interior o bien adsorbido sobre las fibras. Como dato curioso se observa una reacción positiva "inespecífica" en el tejido adiposo del músculo esquelético, en los canalículos biliares y en las vacuolas de las glándulas sebáceas de la piel.

5.6 ESTUDIO SEMICUANTITATIVO DE IDENTIFICACION DEL PARASITO EN TEJIDOS TEÑIDOS CON HEMATOXILINA Y EOSINA Y SOMETIDOS A LA TECNICA DE IHC CON EL ANTICUERPO POLICLONAL:

No se detectó antígeno tisular en ninguno de los seis tejidos procesados, (ganglio linfático regional, piel, bazo, hígado, músculo esquelético y corazón) con el SHIC empleado a una dilución de 1:100; mientras que solo se identificó al parásito en su forma intracelular en el tejido muscular esquelético y en la víscera cardíaca, porción media y apical, en ambos casos a los tiempos de 15 y 30 días p.i.

Para la realización de este estudio semicuantitativo, se emplearon 10 cortes de cada uno de los órganos y de cada uno de los diferentes tiempos p.i., la observación se realizó en el Microscopio óptico (Leitz), con el objetivo de 16X (160 aumentos), obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 8 y 9):

Tabla 8

	ORGANO	MUSCULO ESQUELETICO
	TIEMPO PI	15 DIAS ¹ 30 DIAS ²
# TOTAL DE NIDOS/# CAMPOS ³	5/29	38/38
# DE NIDOS SIN INFILTRADO LEUCOCITARIO/# CAMPOS ⁴	4/29	28/38
# DE NIDOS CON INFILTRADO LEUCOCITARIO/# CAMPOS ⁵	1/29	8/38
# DE INFILTRADOS LEUCOCITARIOS/# CAMPOS	33/29	169/38
# DE INFILTRADOS LEUCOCITARIOS CON REACTIVIDAD/# CAMPOS ⁶	2/29	10/38
# DE INFILTRADOS LEUCOCITARIOS SIN REACTIVIDAD/# CAMPOS ⁶	31/29	179/38
REACTIVIDAD EN LOS CONTROLES	0/29	0/38

1 LOS VALORES OBTENIDOS CORRESPONDEN AL PROMEDIO DE 10 SECCIONES DE TEJIDO ANALIZADAS.

2 OBSERVACION A 160 AUMENTOS.

3 Figura 9

4 Figura 11

5 Figura 7

6 Figura 15

Tabla 9

	ORGANO	CORAZON	
	TIEMPO PI	15 DIAS	30 DIAS
# TOTAL DE NIDOS/# CAMPOS		11/16	4/15
# DE NIDOS SIN INFILTRADO LEUCOCITARIO/# CAMPOS		10/16	2/15
# DE NIDOS CON INFILTRADO LEUCOCITARIO/# CAMPOS		1/16	2/15
# DE INFILTRADOS LEUCOCITARIOS/# CAMPOS		30/16	57/15
# DE INFILTRADOS LEUCOCITARIOS CON REACTIVIDAD/# CAMPOS		5/16	4/15
# DE INFILTRADOS LEUCOCITARIOS SIN REACTIVIDAD/# CAMPOS		25/16	53/15

Las tablas 8 y 9 tienen como principal fin el destacar como mecanismos de daño tisular a la presencia de grandes nidos de amastigotes, de los cuales la mayoría se encuentran libres de infiltrados inflamatorios por lo que se reproducen y liberan destruyendo así las fibras. Por otra parte, se observa que las clínicas de aparición de los infiltrados inflamatorios generan curvas cuyo inicio se registra en el día 7 p.l., se incrementa hacia el día 15 y alcanza su máxima expresión en el 30; sin embargo, pocos de estos infiltrados son los que poseen células con material antigénico intracitoplásmico, por lo que se puede inferir que los infiltrados lejos de abatir la infección, causan un daño a su periferia.

5.7. ESTUDIO COMPARATIVO DEL METODO DE IHO EMPLEANDO EL ANTICUERPO POLICLONAL Y EL MONOCLONAL.

Se emplearon tres cortes de músculo esquelético y tres de la víscera cardíaca (segmento apical) de los tiempos de 15 y 30 días p.i., los cuales se sometieron a la técnica de IHO, utilizando la dilución de 1:100 tanto del anticuerpo policlonal como del monoclonal.

Los resultados fueron observados al microscópio óptico a 160 aumentos (Tabla 10 y 11).

Tabla 10

	ORGANO MUSCULO ESQUELETICO							
	TIEMPO 15 D				30 D			
	PC ¹	MC ²	COCIENTE		PC	MC	COCIENTE	
		PC	MC	PC	MC	PC	MC	
# TOTAL DE NIDOS/# CAMPOS	6/33	1/33	.18	.03	32/43	32/48 ^a	.74	.67
# NIDOS SIN INFILTRADO LEUCOCITARIO/# CAMPOS	5/33	1/33	.15	.03	25/43	26/48	.58	.54
# NIDOS CON INFILTRADO LEUCOCITARIO/# CAMPOS	1/33	0/33	.03	.00	7/43	6/48	.16	.13
# DE INFILTRADOS LEUCOCITARIOS/# CAMPOS	23/33	23/33	.70	.70	171/43	128/48	4.00	2.67
# INFILTRADOS LEUCOCITARIOS CON REACTIVIDAD/# CAMPOS	3/33	2/33	.09	.06	11/43	0/48	.26	.00
# INFILTRADOS LEUCOCITARIOS SIN REACTIVIDAD/# CAMPOS	20/33	21/33	.61	.64	160/43	128/48	3.72	2.67

1 = Anticuerpo policlonal

2 = Anticuerpo monoclonal

a = 26 nidos aparecen francamente marcados

3 nidos aparecen semimarcados

3 nidos aparecen sin reactividad

Tabla 11

	ORGANO CORAZON							
	TIEMPO PI 15 D				30 D			
	PC	MC	COCIENTE		PC	MC	COCIENTE	
		PC	MC			PC	MC	
# TOTAL NIDOS/# CAMPOS	9/17	8/16 ^b	.53	.50	4/16	4/17 ^c	.25	.24
# NIDOS SIN INFILTRADO LEUCOCITARIO/# CAMPOS	7/17	8/16	.41	.50	3/16	4/17	.19	.24
# NIDOS CON INFILTRADO LEUCOCITARIO/# CAMPOS	2/17	0/16	.12	.00	1/16	0/17	.06	.00
# DE INFILTRADOS LEUCOCITARIOS/# CAMPOS	38/17	51/16	2.24	3.19	68/16	51/17	4.3	3.00
# INFILTRADOS LEUCOCITARIOS CON REACTIVIDAD/# CAMPOS	9/17	0/16	.53	.00	4/16	2/17	.25	.12
# INFILTRADOS LEUCOCITARIOS SIN REACTIVIDAD/# CAMPOS	27/17	51/16	1.59	3.19	64/16	49/17	4.0	2.88

b = 6 nidos aparecen francamente marcados
 1 nido aparece semimarcado
 1 nido aparece no marcado

c = 3 nidos aparecen francamente marcados
 1 nido aparece semimarcado

En cuanto al estudio comparativo entre el Ac policlonal y el monoclonal (Tablas 10 y 11) podría pensarse que el empleo de un Ac monoclonal anti-amastigote debiera proporcionar una técnica altamente sensible en el reconocimiento de este estadio; sin embargo, debemos considerar que este Ac fue sintetizado contra la glicoproteína denominada Ssp 4 estadio específica y que quizá por ello no reaccionó con las formas transicionales de los amastigotes, o bien que fue sintetizado contra una cepa brasileña (Y) la cual podría tener una distinta distribución antigénica, encontrándose el Ag en el aislado mexicano como críptico. Estas aseveraciones se apoyan en el resultado del cociente de los parámetros determinados por el total de campos.

6. ANALISIS DE RESULTADOS

En la curva de parasitemia durante los días previos al 10 p.i. no se detectaron parásitos, debido quizá a la baja sensibilidad del método; a partir del día 10 p.i. se detectaron 4 500 parásitos, [1 000 delgados y 3 500 gruesos (Tabla 4, Figura 4)]. El máximo nivel de parasitemia se registró en el día 29 p.i. con 133 933 parásitos totales/ml de sangre del animal, siendo en su mayoría gruesos (130 733) y una pequenísima cantidad de éstos, delgados (3 200), lo que se fundamenta en el principio de progresión fusiforme del parásito (Dvorak J.A. et al, 1973), fenómeno que involucra un efecto en su capacidad infectiva. Después del día 60 p.i. no se detectaron parásitos delgados mientras que los gruesos persistieron, aunque en bajas concentraciones hasta el día 78 p.i.; finalmente la parasitemia remitió después de este tiempo. Los datos manifestaron que los parásitos gruesos son predominantes a lo largo de todo el curso de la parasitemia (Tabla 4, Figura 4).

La curva de parasitemia (Figura 4) describe pequeños picos debido a errores aleatorios del método de cuantificación. La gráfica tiene como único fin el mostrar una tendencia en los niveles de parasitemia del ratón de la cepa BALB/c y no una descripción semi o cuantitativa ya que para ello se requieren de determinaciones en al menos un lote de diez ratones en cada uno de los tiempos p.i. y para el presente trabajo sólo se emplearon tres.

Por otra parte, se realizó la caracterización de la cepa nina de *T. cruzi*, para lo cual se debían observar parámetros tales como: a) La infectividad de las formas de cultivo, b) la curva de parasitemia, c) la morfología de los tripomastigotes sanguíneos, d) la mortalidad, e) la patogenicidad, f) el tropismo tisular y g) el tipo de lesiones histológicas.

En lo que toca a la infectividad de las formas de cultivo, se comprobó a través de la parasitemia de los animales inoculados con tripomastigotes metacíclicos del cultivo M-16. En lo referente a la curva de parasitemia (Figura 4), se evidencia la aparición de parásitos alrededor del día 10, el pico de parasitemia en el día 29 y su desaparición alrededor del día 78 p.i. La morfología de los tripomastigotes se determinó en frotis sanguíneos teñidos con Wright, en los que se observaron ambas formas de parásitos: las delgadas y predominantemente las gruesas; la semicuantificación se realizó en 5 μ l de sangre. En cuanto a la mortalidad, ninguno de los animales murió dentro del lapso de tiempo en que se realizó la curva de parasitemia.

Correlacionando los datos de la curva de parasitemia con el tipo de lesiones anatómicas o histológicas (tabla 4, 5 y 6), se encontró que *T. cruzi* cepa niño (aislado mexicano) al parecer se comportaba como una cepa miotrópica, selectiva para fibras de tipo I del músculo esquelético que se caracterizan por ser estructuras donde la contracción es lenta y la tensión sostenida por lo que también son denominadas fibras lentas, son fácilmente estimuladas pero tienen una velocidad de conducción lenta (50-80 m/s) y están inervadas por axones pequeños, son ricas en mioglobina, por lo cual se les denomina fibras rojas y se encuentran altamente irrigadas (Fawcett D. W., 11a Edición). Estas fibras se presentan en más del 50% del tejido cardíaco y músculo esquelético que fueron las estructuras más dañadas durante la infección, debido al tropismo selectivo del parásito por estas fibras (aproximadamente cinco veces mayor que por las fibras del tipo II), que son destruidas progresivamente durante la fase crónica de la infección, tales aseveraciones son apoyadas por Cabeza & Laguens (Cabeza M. P., et al, 1988).

Con base en las características anteriores, *T. cruzi* cepa niño corresponde al biotipo III de acuerdo a la clasificación de Andrade, que describe como cepas de lenta multiplicación, de tardío pero alto pico de parasitemia (20-30 días p.i.) y de baja mortalidad después del día 50 p.i., con predominio de formas gruesas a través del curso de la infección y miotropismo el cual implica principalmente al músculo esquelético. Los prototipos son las cepas colombianas (Mem Inst Oswaldo Cruz, 1986).

ANÁLISIS ANATOMO E HISTOPATOLOGICO DE LOS ORGANOS.

En función del conocimiento del tropismo de la cepa y de su biotipo, se observó que las anatómicas e histopatológicas correlacionaban con los datos de clasificación de la cepa y con la aparición, máximo nivel y desaparición de los parásitos en sangre.

HIGADO (Tabla 6)

En Hígado (órgano que pertenece al sistema mononuclear fagocítico) a los tiempos de 1, 4, 24, 48, 96 h y 7 días p.i. no se encontró ninguna anomalía a nivel anatómico e histológico, sin embargo a partir del día 15 p.i. se observó hepatomegalia que al analizarse histológicamente presentaba un cuadro de infiltrados perivenulares extensos, mitosis atípicas y hepatitis reactiva. Debido a que el hígado es un órgano muy vascularizado que cada minuto recibe aproximadamente 400 ml de sangre de la vena porta y 100 ml de la arteria hepática en los

humanos que fluye por los sinusoides quedando expuesta a unas 1.2×10^7 células de Kupffer por cada gramo de tejido, este órgano se conoce como tamizador de la sangre. Se cree que durante la infección en el animal, se presenta la hepatomegalia como una patía secundaria a la insuficiencia cardíaca aguda (no determinada experimentalmente), que quizá se deba a que en esta fase se presentan el mayor número de nidos de amastigotes, que destruyen y necrosan las fibras cardíacas durante su proceso de reproducción y liberación además de la participación del infiltrado inflamatorio. Dicha insuficiencia cardíaca puede aumentar la presión en las venas que drenan al hígado y entonces los sinusoides quedan dilatados y producen un aumento del volumen hepático, aunado a una migración de Mφs libres y a la activación de las células de Kupffer para la eliminación del parásito; por otra parte, la presencia y participación de infiltrados inflamatorios en la destrucción del tejido hepático con células infectadas y no infectadas también se ha reportada en trabajos previos realizados con cepas mexicanas (Cárdenas R. L., et al, 1975) e internacionales (Koberlé F., 1961). Para el día 30 p.i. en el que se presentó el pico de parasitemia (133 933 parásitos/ml de sangre), se encontró una franca hepatomegalia, donde la imagen histológica correspondía a un tejido en cuyo parénquima se observaban vacuolas lipídicas abundantes, hepatocitos con mitosis atípicas e infiltrados inflamatorios perivasculares de tipo crónico, debido a la gran afluencia de sangre que tiene este órgano y porque en dicho fluido se encontraban los tripomastigotes o material antigénico que se depositan sobre la superficie de las células del endotelio vascular o del parénquima hepático provocando una reacción inflamatoria. En ninguno de los tiempos p.i. analizados, se encontró evidencia alguna del parásito o antígeno (Cárdenas R. L., et al, 1975; Koberlé F., 1961), fenómeno también observado por Cárdenas y cols. en su estudio con seis cepas mexicanas de *T. cruzi*.

BAZO (Tabla 6)

Es la masa de tejido linfático más grande del cuerpo, el parénquima consiste de dos tipos de tejidos: la pulpa blanca que básicamente es tejido linfoide (linfocitos que forman nódulos linfáticos denominados nódulos liniales o corpúsculos de Malpighi) y la pulpa roja (formada por senos venosos y cordones liniales o de Billroth los cuales consisten en glóbulos rojos, Mφs, linfocitos, células plasmáticas y granulocitos).

En los tiempos de 24, 48 y 96 h p.i. no se observaron alteraciones anatomohistológicas, lo cual coincide con la ausencia del parásito en sangre, sin embargo a los 7 días p.i. se presentó un cuadro de esplenomegalia,

quizá por la presencia de bajas concentraciones de tripomastigotes sanguíneos, los cuales fueron probablemente detectados por la población de Mφs residentes en los cordones esplénicos, aunque histológicamente no se observó ninguna anomalía. La esplenomegalia persistió durante los días 15 y 30 p.i.; en el análisis histológico a los 15 días p.i. se observó hiperplasia folicular y a los 30 días esplenitis reactiva asociada a hiperplasia folicular que correlaciona con los elevados niveles de parasitemia, este fenómeno según Fawcett parece deberse a que después de la introducción en el torrente circulatorio del parásito o antígeno aparecen linfoblastos proliferantes que aumentan en número durante uno o dos días y se van concentrando en la periferia de la vaina. En los días cuarto a sexto aparece un número creciente de células plasmáticas inmaduras. Al final de la primera semana comienza a disminuir el número de linfoblastos y de células plasmáticas inmaduras incrementándose el número de las maduras mientras el proceso se continúa hasta la segunda semana, en la que se observa esplenomegalia (Fawcett D. W., 11a. edición).

Por otra parte Librado Ortiz Ortiz y cols., afirman que el bazo es un órgano de tamizado para los parásitos circulantes y que además es una fuente de células de la respuesta inmune, por lo que la concentración alta de antígeno y la activación policlonal de los linfocitos B correlaciona con la esplenomegalia observada (Ortiz-Ortiz L., et al, 1980), en contraposición con lo encontrado en el trabajo realizado por Salazar y cols., donde se informan otros hallazgos tales como tejido linfático extracapsular, desorganización de la pulpa blanca, necrosis, disminución de megacariocitos, hipoplasia de pulpa blanca, hemorragias y congestión; manifestaciones no encontradas en las muestras observadas.

Finalmente, Koberle reportó la presencia de un "bazo aumentado" que presenta el aspecto de estar infectado, sin embargo, en ninguno de los tiempos se logró evidenciar al parásito y/o material antigénico.

GANGLIO LINFÁTICO REGIONAL (Tabla 6)

Durante los tiempos de 24, 48 y 96 h p.i. no se observó alteración morfo o histológica alguna, sin embargo a partir del día 7 y hasta el 30 p.i. se presentó linfadenopatía, en donde los ganglios aumentaban de tamaño hasta alcanzar una longitud de aproximadamente 3 mm, que correspondía a una imagen histológica a los 7 y 15 días p.i. de hiperplasia folicular y a los 30 días de arteritis linfocítica asociada a hiperplasia folicular, semejante a lo encontrado y descrito por Koberle (Koberle F., 1961). Esta patía, se encuentra íntimamente relacionada con la

aparición del parásito en sangre y linfa además del incremento en la concentración de células plasmáticas y linfocitos hallados durante el día 30 p.i. Estas histopatologías no correlacionan con las encontradas por Cárdenas y cols. (Cárdenas R. L., et al, 1975) ya que no se logró identificar al parásito, material antigénico libre, fagocitado o adsorbido, ni se observó necrosis; sin embargo reporta únicamente para la cepa El Capulín un incremento en el tamaño del ganglio.

MUSCULO ESQUELETICO (Tabla 6)

Partiendo del conocimiento de que se trataba de una cepa mixotrófica, se presuponía aún antes de conocer los resultados del estudio, que tanto el músculo esquelético como el cardíaco, eran los órganos principalmente afectados, lo que resultó positivo al analizar histológicamente una sección del músculo esquelético regional. En los tiempos de 24, 48 y 96 h p.i., no se presentó alteración alguna, sin embargo a los 7 días p.i. se observó una miositis leve, quizá por que el parásito se encontraba en la sangre a concentraciones no detectables por la metodología empleada y en la fase inicial de la colonización de las células hospedadoras del mamífero. Durante el día 15 p.i. se observó miositis moderada, neuritis, infiltrados inflamatorios intersticiales y perivasculares constituidos principalmente de PMNs y Mφs así como nidos de amastigotes, cuadro histopatológico que correlaciona con la detección de las formas sanguíneas y tisulares del parásito. Los infiltrados de PMNs y Mφs pueden causar la lisis sustancial de los amastigotes, así como deteriorar y/o causar la muerte o el daño celular y/o tisular en los sitios de inflamación (Sanderson C. J., et al, 1979; Kierszenbaum F., et al, 1980; López A.F., et al, 1978), situación también descrita por Kierszenbaum y cols., de la cual se concluye que los PMNs se encuentran directamente implicados en el agravamiento de la necrosis degenerativa de las fibras musculares y que el grado de infiltración y el depósito de sus productos de secreción son importantes, por lo que se genera un cuadro de miositis grave (Molina H. A., et al, 1988). Posteriormente los infiltrados de PMNs se transformaron en crónicos, (compuestos básicamente de CMNs) aumentando en número, efecto observado también por Molina y cols., donde refieren la presencia en el tejido de focos necróticos aislados y difusos, infiltrados inflamatorios con y sin fibras necróticas además de tejido preservado con infiltrados inflamatorios no significativos y nidos de amastigotes, cuadro también hallado durante el análisis de los tejidos en los tiempos de 15 y 30 días p.i. Todos los parámetros antes analizados proporcionan una clínica del tiempo involucrado en el desarrollo de

la gravedad de las lesiones, presencia de infiltrados inflamatorios, aparición del parásito en el tejido y su liberación de la célula hospedera infectada iniciando así un nuevo proceso de reclutamiento de células inflamatorias (Molina H.A., et al, 1988).

En el día 30 p.i. se observó miositis grave, perineuritis, infiltrados inflamatorios intersticiales y perivasculares de tipo crónico, fibras necróticas con y sin parásito, además de un mayor número de nidos de amastigotes sin infiltrado leucocitario, donde la gravedad del daño tisular se debía principalmente a la presencia del importante número de nidos e infiltrados.

La aparición de CMNs y su aumento en número esta estrechamente relacionado a la gravedad de la lesión (miositis grave, destrucción de las fibras y necrosis). Por otra parte se sugiere que, además de la destrucción del tejido por la presencia del parásito y los infiltrados inflamatorios, otro mecanismo de patogenia podría desarrollarse durante esta fase; una respuesta autoinmune de CMNs depositadas sobre las fibras no infectadas e infectadas y alrededor de los pseudoquistes más no sobre éstos (Barral A. P., et al, 1984).

Además existen evidencias fehacientes de que *T. cruzi* presenta cierto tropismo para fibras del tipo I presentes en el músculo esquelético, del que constituyen casi su totalidad por lo que el parásito es hallado ampliamente distribuido en este tejido (Cabeza M. P., et al, 1988).

Finalmente, Salazar y cols. describieron alteraciones histológicas similares a las mencionadas anteriormente con las cepas Teitlán y La Higuera, ambas mexicanas (Cárdenas R. L., et al, 1975).

CORAZON (Tabla 6)

Durante los tiempos de 24, 48 y 96 h p.i. no se observó ninguna alteración histológica, sin embargo en el día 7 p.i. se encontraron infiltrados inflamatorios perivasculares de tipo crónico, que correlacionaban con el inicio de la parasitemia y siendo el corazón una masa de tejido muscular que se contrae rítmicamente, donde las venas cava superior e inferior traen la sangre venosa desde el cuerpo a la aurícula derecha, pasando al ventrículo derecho, de donde es impulsada a través de los pulmones realizándose el intercambio gaseoso, para después ser llevada de nuevo a la aurícula izquierda y al ventrículo izquierdo para distribuirse por el cuerpo a través de todas sus ramas arteriales, podría pensarse que el parásito quizá libere algún antígeno o bien se trate de un producto de su degradación o metabolismo, que se deposita en el endotelio, endocardio y/o miocardio

provocando la presencia de infiltrados perivasculares o que simplemente sea esto un reflejo de un proceso de diapedesis.

Por otra parte la cepa ninoz al parecer es miotrópica, específica para fibras de tipo I por lo que no sería de sorprender la presencia de nidos de amastigotes en este órgano, los cuales se observaron a partir del día 15 en un número mayor que al día 30 p.i. En el día 15 p.i. también se encontraron infiltrados inflamatorios difusos, intersticiales mixtos con una ligera destrucción de las fibras resultado de las lesiones causadas por la reproducción y liberación del parásito (Younes-Chennouf A. B., et al, 1988) y particularmente por la persistencia de extensos infiltrados inflamatorios (Morales M. C., et al, 1987; Younes-Chennouf A. B., et al, 1988) cuya cinética de aparición inicia en el día 7 p.i. y aumenta progresivamente con el tiempo, estos hallazgos sugieren que la estimulación antigénica persiste a través de la fase crónica aunque los parásitos no sean morfológicamente detectables (Younes-Chennouf A. B., et al, 1988). Por otra parte, no se observó destrucción de fibras nerviosas (Molina H. A., et al, 1988).

Finalmente, en el día 30 p.i. se observó una miocarditis grave que fundamentalmente se debe a la destrucción de las fibras por los infiltrados inflamatorios perivasculares e intersticiales de tipo crónico y a la presencia de nidos de amastigotes en los ventrículos, que correlaciona con los niveles máximos de parasitemia. Dichos hallazgos fueron también encontrados en los trabajos de Koberle (1961), en los de Molina (1988) y en los de Cárdenas y cols. (1975) con las cepas Eslanzuela, Jojutía y el Capulín, todas provenientes de aislados mexicanos, en donde observaron focos necróticos, infiltrados inflamatorios con y sin fibras necróticas, tejido preservado y nidos de amastigotes en proporciones semejantes a las observadas en el presente trabajo.

Un número relativamente alto de CMNs, Nos y nidos de amastigotes fueron observados entre los días 15 y 30 p.i. Como es sabido las CMNs son las responsables de montar una respuesta inmune contra *T. cruzi*, mientras que los PMNs participan en la eliminación del parásito además de contribuir al agravamiento de la lesión.

Por otra parte, las lesiones cardíacas parecen desarrollarse con una cierta predisposición durante la fase crónica de la infección con cepas del biotipo tipo III, como ha sido observado con las cepas colombianas (Andrade S. G., 1990), donde *T. cruzi* muestra una capacidad peculiar para generar una miocardiopatía crónica en el ratón

sin embargo, el establecimiento de la infección crónica involucra factores tales como la cepa del parásito, la respuesta inmune del hospedero y la predisposición genética.

PIEL (Tabla 6)

La interacción inicial de las formas infectivas de *T. cruzi* y la célula hospedera en el sitio de inoculación particularmente ha sido poco estudiada debido a la rápida desaparición del parásito del sitio de inoculación. La interacción del parásito con la célula hospedera, la infectividad, multiplicación intracelular y el destino de los parásitos ha sido ampliamente estudiada *in vitro* (Dvorak J. A., et al, 1973; Hydo T. P., et al, 1973; Luban N. A., et al, 1974; Nogueira N., et al, 1976; Wirth J. J., et al, 1984; Ouassal M. A., et al, 1980) aunque por otro lado prácticamente no existen referencias concernientes de la interacción inicial y los eventos locales postinoculación en el mamífero *in vivo* (Younes-Chennoufi A. B., et al, 1988). En el presente trabajo tampoco fue posible esclarecer dicha interacción, debido a que no se detectó al parásito y únicamente se observaron infiltrados inflamatorios abundantes (Tabla 6).

El no haber localizado al parásito *in situ* pudiera deberse:

- a) A la elección del sitio de inoculación.
- b) A que al inocular al animal se lesionó el tejido por la introducción de la aguja, lo que permite una migración más rápida del parásito a través del tejido dañado.
- c) A la velocidad que desarrolla el parásito por el movimiento de su flagelo, incrementada significativamente por la imprimida durante el aumento de la presión sobre el émbolo de la jeringa y el pequeño orificio de salida de la aguja.
- d) A que algunos tripomastigotes escapan del sitio de inoculación a través de los vasos linfáticos como principal vía y otros lo hacen hacia vasos sanguíneos, evento que aumenta su probabilidad debido a que aproximadamente a las 3 ó 4 h de producida la lesión mecánica, se verifica un proceso de angiogénesis con capilares ya estructurados, a través de los cuales el parásito podría migrar fácilmente.
- e) A que quizá no hay reproducción local del parásito.
- d) A que algunos tripomastigotes son destruidos por los granulocitos y/o Mφs contenidos en el infiltrado inflamatorio.

En los tiempos de 1 y 4 h se observaron infiltrados inflamatorios leucocitarios de PMNs y hemorragia, pero no se evidenció al parásito ni material antigénico, el predominio de estas células en la reacción inflamatoria persiste hasta las 48 h.

A las 24 h se observaron infiltrados inflamatorios subcutáneos de PMNs, a las 48 y 96 h se presentaron infiltrados inflamatorios mixtos que se extendían hasta el músculo; a los 7 días se observaron infiltrados inflamatorios crónicos; en el día 15 se presentaron infiltrados inflamatorios perivasculares y crónicos en la dermis y en el día 30 p.i. se observaron infiltrados inflamatorios crónicos perivasculares así como neuritis. Se piensa que los infiltrados inflamatorios de CMNs en el día 30 p.i. pudieran deberse a una respuesta autoinmune celular contra algún antígeno persistente o de reacción cruzada del músculo del tejido tegumentario ya que estos infiltrados son en su mayoría perivasculares y se extienden hasta la epidermis.

En un trabajo previo realizado por Milder y Bijovsky (Bijovsky A. T., et al, 1988), se encontraron resultados similares con respecto a la clase de los infiltrados inflamatorios ya que a los tiempos de 1, 4, 24 y 48 h p.i. eran predominantemente de leucocitos PMNs, mientras que a los tiempos de 96 h y 7 días p.i. se observaron infiltrados inflamatorios mixtos con un incremento de CMNs maduras y finalmente a los 15 y 28 días p.i. se encontró una destrucción grave de las células hospederas en donde el infiltrado inflamatorio consistía básicamente de CMNs (plasmocitos y Mφs). Detectaron al parásito a las 6 h p.i. en la periferia de los PMNs, a las 24 h en el citoplasma de los Ncs, a las 48 h multiplicándose, a las 96 h ya había tripomastigotes libres, a los 7 días se observaron nidos de amastigotes en las fibras del músculo liso de los vasos sanguíneos, después del día 21 casi no observaron parásitos y a partir del día 28 éstos ya no se presentaron, situación que difiere con la presente investigación, quizá debido al inóculo o al sitio de inoculación elegido por Milder y Bijovsky (carrillo de hámster) ya que carece de vasos linfáticos por los cuales el parásito pudiese migrar, mientras que el sitio de inoculación en nuestro caso fue el cojinete plantar, donde sí existen vasos linfáticos y abundantes vasos sanguíneos.

En lo que respecta a la técnica de la inmunoperoxidasa complejo avidina-biotina, se sabe que es mucho más sensible que los métodos de inmunofluorescencia y las técnicas directas e indirectas de la inmunoperoxidasa, ya que el complejo avidina-biotina amplifica la señal. Esta técnica ofrece la ventaja de que las muestras con el

Inmunoprecipitado pueden ser montadas y almacenadas permanentemente ya que el inmunoprecipitado no desaparece ni se deteriora con el tiempo y los tejidos pueden ser contrateñidos lo cual provee de una información morfológica correlativa adicional (Current Protocols in Immunology, 1991).

Esta técnica fue elegida debido a que durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas se pueden encontrar grandes agregados de parásitos que son evidentes por medio de la tinción de H y E por que se diferencian morfológica y tintealmente de la estructura normal del tejido, sin embargo pueden existir muchas otras lesiones donde los parásitos se encuentran presentes y no se logran evidenciar por las técnicas de rutina. Por medio de la técnica de IHQ un pequeño número de parásitos o bien organismos individuales pueden ser identificados empleando los objetivos de 4 y 10X, lo que hace de la observación microscópica un proceso rápido y sencillo. El aumento en la capacidad de la identificación de los parásitos por medio de la IHQ se debe a que se toman en cuenta parámetros tanto morfológicos como antigénicos. Algunas de las lesiones inflamatorias pueden ser observadas con un contenido de material antigénico positivo, el cual no se evidenciaría por medio de la tinción de H y E, contribuyendo así en situaciones clínicas a la identificación de pocos parásitos o fragmentos de éste. En cuanto a la determinación del parásito y/o antígeno en cortes de tejido sometidos al método de IHQ con el Ac policlonal, a diferencia del trabajo de Younes-Chennouf acerca de la persistencia de los antígenos de *T. cruzi* cepa Y (biotemo tipo I) en las lesiones inflamatorias de ratones infectados en fase crónica (Younes-Chennouf A. B., et al, 1988), en esta investigación no se detectó la presencia de antígenos adsorbidos en ninguno de los tejidos ni de los tiempos analizados a pesar de haber empleado una metodología más sensible (complejo avidina biotina) que la realizada por Younes, en donde solo empleó el sistema de anti-Fab peroxidasa, aunque quizá la diferencia en la liberación de antígenos se deba al biotemo de la cepa empleada en cada caso (Tabla 7). Por los resultados anteriores se descartó la persistencia de antígenos en el tejido hospedero como uno de los mecanismos de patogenia del final de la fase aguda y de la fase crónica.

Los órganos que presentaron una reactividad positiva (inmunoprecipitado color sepia) fueron únicamente el músculo esquelético (ME) y el cardíaco (MC) y sólo en los tiempos de 15 y 30 días p.i. (Tabla 7). En el ME en el día 15 p.i. se observaron nidos de amastigotes sin infiltrados inflamatorios, que aumentaron significativamente en número hacia el día 30, lo que refleja una cinética típica para la cepas mitotrópicas (Molina H. A., et al, 1988),

participando en la destrucción tisular la reproducción y liberación del parásito como el principal mecanismo de las histopatologías.

También se observaron amastigotes aislados sin infiltrados inflamatorios en ambos tiempos p.i., aunque en proporciones casi insignificantes, dichos organismos individuales pueden propiciar el daño tisular por reproducirse y generar un nuevo nido. Resultó sorprendente el hallar muy pocos nidos de amastigotes y amastigotes aislados con infiltrados inflamatorios ya que normalmente estos infiltrados eran perivasculares e intersticiales y se encontraban lejos de cualquier interacción con los nidos y amastigotes aislados, esto llevó a pensar en que el segundo mecanismo de daño tisular involucrado en el agravamiento de la lesión que provocaba una degeneración de los miocitos eran los infiltrados inflamatorios que vertían sus contenidos enzimáticos destruyendo las fibras musculares.

En ninguno de los tiempos anteriores al día 15 p.i. se observó la presencia de CMNs o PMNs cuyo citoplasma presentase una reacción positiva.

En el MC se observó prácticamente el mismo patrón del ME sin embargo, los nidos de amastigotes sin infiltrados inflamatorios aunque predominantes sobre los que presentaron infiltrados, se observaron en número mayor en el día 15 y disminuyeron significativamente hacia el día 30 p.i. Los amastigotes aislados sin infiltrado permanecieron aparentemente constantes y en número muy bajo en ambos tiempos.

El daño más importante al tejido muscular cardíaco fue debido a la destrucción de las fibras por el parásito y principalmente a la destrucción y menoscabo de la viscera por los infiltrados inflamatorios, que tienen una cinética de aparición hacia el día 7 p.i. y aumentan gradualmente conforme al tiempo.

Por medio de esta técnica tampoco fue posible detectar al parásito o material antigénico adsorbido en el sitio de inoculación (piel del cojinete plantar) [Tabla 7], las razones sugeridas anteriormente podrían explicar este curioso fenómeno. No se puede pensar en que la técnica no fuese suficientemente sensible ya que logra detectar organismos individuales o fragmentos de éste, además de amplificar 4 ó 5 veces la señal.

Tampoco fue detectado parásito y/o antígeno tisular en ganglio linfático regional, bazo e hígado, lo que probablemente se deba al tropismo de la cepa empleada y a la vía de inoculación del parásito.

En los canaliculos y/o sinusoides del hígado se observó una reactividad positiva inespecífica, al igual que en el tejido adiposo del ME y en las vacuolas de la glándula sebácea, lo que quizá se deba a la presencia de Acs de reacción cruzada en el SHIC (fenómeno autoinmune producido por una reacción cruzada entre los antígenos de *T. cruzi* y la célula hospedera).

Algunos reportes hechos por Acosta y Santos-Buch, refieren la presencia de Acs de reacción cruzada entre el ME y antígenos del interior del flagelado (adenosintrifosfatasa del retículo sarcoplásmico dependiente de calcio o SRA). Según Fawcett (Fawcett D. W., 11a edición), la membrana que reviste los canaliculos biliares es un sitio de una gran actividad para esta enzima, lo que probablemente explicaría la reactividad inespecífica hacia este fragmento de tejido. Por otro lado Hakamori y cols. (Petry K., et al, 1988), demostraron la presencia de Acs que reaccionan contra un antígeno crítico de *T. cruzi* cuya composición química corresponde a un lípido sulfatado o sulfátido (sulfolactosil ceramida), presente también en los antígenos de la célula hospedera (mielina de las células del sistema nervioso central y mucosa del tracto digestivo). Los lípidos y glicolípidos normalmente actúan como haptenos, por ello probablemente los parásitos provoquen un efecto negativo en la regulación del sistema inmune, que permita la expansión de clones de linfocitos autorreactivas. Hipotéticamente proponemos que la reacción inespecífica observada en el canaliculo biliar, tejido adiposo y glándula sebácea, pudiera deberse a la presencia de Acs de reacción cruzada presentes en el SHIC que reconozcan la enzima SRA en el caso del canaliculo biliar o bien la presencia de sulfátidos en los tres casos (tejido adiposo, glándula sebácea y canaliculo biliar), lo que requiera someterse a comprobación.

El realizar un estudio semicuantitativo en los tejidos tratados por la técnica de IHQ, tuvo como objetivo el demostrar los principales mecanismos de patogenia, involucrados durante la infección por *T. cruzi*. En el caso del ME en el día 15 p.i. (Tabla 6) el número total de nidos por el número de campos analizados fue de 5 en 29, que correspondía a observar aproximadamente 1 nido por cada 5.8 campos analizados; en el día 30 p.i. se encontraron 36 nidos en 38 campos, lo que indica que se encontró 1 nido por cada 1.056 campos analizados, observándose que el número de nidos aumentó aproximadamente 5.5 veces; por otro lado 4 de los 5 nidos encontrados en el día 15 p.i. no se presentaban asociados a infiltrados leucocitarios lo que correspondía a hallar 1 nido sin infiltrado en cada 7.25 campos analizados, mientras que únicamente se observó un nido con infiltrado

leucocitario en los 29 campos. Para el día 30 p.i. se cuantificaron 28 nidos sin infiltrado en 38 campos analizados, lo cual indicaría que por cada 1.358 campos analizados encontraríamos un nido sin infiltrado, mientras que por cada 4.75 campos sería posible hallar un nido de amastigotes con infiltrado, tal relación nos lleva a pensar que se trata de un proceso quizá similar al observado en *Entamoeba histolytica* en el cual se secretan sustancias antiinflamatorias, que en nuestro caso serían liberadas alrededor del pseudoquiste y que impedirían la interacción de los infiltrados leucocitarios con el nido de amastigotes, aunque sería aventurado emitir dicha suposición ya que no existe referencia alguna sobre lo antes propuesto. En lo que toca al número de infiltrados leucocitarios por número de campos analizados para el tiempo de 15 días p.i. fue de 33 infiltrados en 29 campos revisados que corresponden a 10 infiltrados por cada 8.788 campos analizados; mientras que para el día 30 p.i. se encontraron 189 infiltrados en 38 campos analizados lo que significa que había 10 infiltrados por cada 2.011 campos analizados; estos resultados produjeron una cinética de aumento progresivo de los infiltrados que proporcionaron un incremento de 4.37 veces el número de infiltrados en el lapso del día 15 al 30 p.i. y de estos, sólo 2 de los 33 cuantificados en el día 15 aparecen con inmunoprecipitado, localizando un infiltrado con reactividad por cada 14.5 campos mientras que en el día 30 p.i. se hallaron 10 infiltrados con reactividad en cada 38 campos, proporcionando una relación de un infiltrado con reactividad por cada 3.8 campos; el número de infiltrados leucocitarios sin reactividad fue predominante. En el día 15 p.i. se determinaron 31 infiltrados por cada 29 campos, es decir 10 infiltrados por cada 9.355 campos y en el día 30, se cuantificaron 179 infiltrados por cada 38 campos es decir 10 infiltrados por cada 2.123 campos, dichos valores conservaron su relación de incremento en el número total de infiltrados, donde los que aparecen sin reactividad aumentan en proporción de 4.406 veces del día 15 al 30 p.i., lo que indica que los infiltrados inflamatorios lejos de participar eficientemente en la eliminación del parásito, potencian la destrucción y necrosis de las fibras musculares (Molina H. A., et al, 1988).

En el caso del MC los resultados prácticamente presentaron el mismo patrón, aunque el número total de nidos fue mayor durante el día 15 p.i. (Tabla 9) obteniéndose una relación numérica similar respecto al total de nidos en el ME en el día 30 p.i., mientras que la relación numérica del total de nidos hallados en el MC en el día 30 p.i. resultó ser ligeramente más elevada a la correspondiente del ME en el día 15 p.i. (Tabla 9). El número total

de nidos por el número de campos analizados fue de 11 en 16, lo que correspondía a observar aproximadamente 1 nido por cada 1.455 campos analizados en el día 15 p.l., sin embargo durante el día 30 p.l., se encontraron 4 nidos en 15 campos observados, lo que indica que se encontró 1 nido por cada 3.75 campos analizados, generando una disminución en el número de nidos de aproximadamente 2.58 veces; 10 de los 11 nidos encontrados en el día 15 p.l. se observaron sin infiltrado leucocitario lo que corresponde a hallar 1 nido sin infiltrado en cada 1.1 campos analizados, mientras que únicamente se observó un nido con infiltrado leucocitario en los 16 campos; para el día 30 p.l. se cuantificaron 2 nidos sin infiltrado y 2 con infiltrado en 15 campos analizados, lo cual indica que por cada 7.5 campos analizados encontraríamos un nido sin infiltrado y por cada 7.5 campos sería posible hallar un nido de amastigotes con infiltrado. El número de infiltrados leucocitarios por número de campos analizados en el MC presentó una cinética similar a la del ME, donde los infiltrados inflamatorios tienden a aumentar respecto del tiempo así, en el día 15 p.l. fue de 30 infiltrados en 16 campos, que corresponde a hallar 10 infiltrados por cada 5.333 campos analizados, mientras que para el día 30 p.l. se encontraron 57 infiltrados en 15 campos lo que significa que se observan 10 infiltrados por cada 2.6315 campos; estos resultados producen una cinética de aumento en el número de infiltrados de 2.027 veces, en el lapso del día 15 al 30 p.l.; de estos infiltrados sólo 5 de los 16 cuantificados en el día 15 aparecen con una reactividad positiva al Ac lo que equivale a encontrar un infiltrado con reactividad por cada 3.2 campos mientras que en el día 30 p.l. se hallaron 4 infiltrados con reactividad en cada 15 campos proporcionando una relación de un infiltrado con reactividad por cada 3.75 campos. El número de infiltrados leucocitarios sin reactividad fue predominante; así en el día 15 p.l. se determinaron 25 infiltrados por cada 16 campos, es decir 10 infiltrados por cada 6.4 campos y en el día 30, 53 infiltrados por cada 15 campos es decir 10 infiltrados por cada 2.83 campos, estos valores conservaron su relación de incremento, donde los infiltrados sin reactividad aumentaron en proporción de 2.26 veces.

Aunque aparentemente por la cifras registradas en la Tabla 8 el ME fue el órganos más afectado debido al número de nidos y al número de infiltrados inflamatorios, cuando se realizó el análisis de los resultados se encontró un mayor número de infiltrados sin reactividad en el MC que en el ME durante el día 15 p.l. y un mayor número de infiltrados totales durante en el día 15 en el MC.

En función del análisis de resultados, proponemos que los principales mecanismos de patogenia para ambos órganos son:

- 1) La destrucción directa del tejido por el parásito.
- 2) La presencia de infiltrados inflamatorios que agravan la severidad de la lesión, produciendo destrucción y necrosis en las fibras musculares esqueléticas y cardíacas
- 3) Probablemente una respuesta autoinmune celular ligeramente más acentuada en la viscera cardíaca, mediada por linfocitos T CD4* (Barral A. P., et al, 1984; Ribeiro dos Santos R., et al, 1992). Aunque muchos autores apoyan la teoría de una persistencia antigénica en las lesiones inflamatorias en ratones infectados crónicamente (Younes-Chennoufi A. B., et al, 1988).
- 4) Posiblemente un fenómeno de autoinmunidad producido por la adsorción de los antígenos de *T. cruzi* sobre la superficie de las células hospederas (Ribeiro dos Santos R., et al, 1992), sin embargo esto no fue observado ya que no se detectó al antígeno ni hubo reactividad del Ac contra las células propias del tejido, por lo que descartamos los dos últimos mecanismos de patogenia.
- 5) La presencia de Acs anticorazón, endotelio vascular e intersticio, que no se investigó en el presente trabajo, por lo que no se debe descartar esta posibilidad como un mecanismo de patogenia.

En el estudio comparativo del Ac monoclonal y policlonal (Tabla 10 y 11) se observó que con el empleo del policlonal se obtuvieron mejores resultados que con el monoclonal.

Aparentemente estos resultados parecerían contradictorios ya que podría pensarse que el empleo de un Ac monoclonal anti-amastigote debiera incrementar la sensibilidad de la técnica sin embargo, este Ac monoclonal reconoce una glicoproteína (Gp) de 84 kD denominada Ssp4, presente en la superficie de los amastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y (cepa brasileña) y aunque es una Gp estadio específica altamente conservada en muchas cepas del parásito e inmunodominante, debe tomarse en cuenta que el Ac fue sintetizado contra una Gp presente en una cepa brasileña (Andrews N. W., et al, 1989) y que en esta investigación se empleó una cepa mexicana (ninoa), lo cual podría sugerir una distinta distribución antigénica en la superficie del amastigote, por otra parte, los resultados obtenidos podrían ser reflejo no de la ausencia de este antígeno en nuestra cepa mexicana sino de que éste sea un antígeno críptico (Kirchhoff L. V., et al., 1984), razón por la cual no sea

fácilmente identificable. Quizá este fenómeno pudiera deberse a que la Gp inicia su expresión 24 h después de la transformación morfológica del tripomastigote que se redondea a la forma de amastigote, expresando totalmente la Gp a las 96 h después de su transformación; la Gp permanece en la superficie del parásito durante 24 h más aproximadamente, tiempo en el que inicia la expresión de las Gp Ssp1, Ssp2 y Ssp3 (presentes en los tripomastigotes sanguíneos) y la desaparición de la Sep 4 (Kirchhoff L. V., et al, 1984), razón por la cual quizá algunos nidos de amastigotes no presentaron una reactividad positiva.

7. CONCLUSIONES.

La cepa nina de *T. cruzi*, pertenece al biotipo III según Adrade, es una cepa mitotrópica que posee un tropismo específico por fibras del tipo I.

La inoculación con 2000 tripomastigotes metacíclicos vía subcutánea en ratones de la cepa BALB/c, presentó una curva de parasitemia que inició el día 15 p.i. con 3 300 Parásitos/ml de sangre del animal y un máximo de parasitemia en el día 29 con 133 933 parásitos predominando las formas gruesas. La remisión de la parasitemia se observó hacia el día 78 p.i.

En el día 7 p.i. se encontraron algunas anatomopatologías como esplenomegalia aunada a infarto ganglionar (en un solo ratón), lo que correlaciona con la previa aparición del parásito en la sangre.

Durante el día 15 p.i. se encontró una importante linfadenopatía en los ganglios linfáticos regionales (popliteo) en ambas extremidades posteriores, asociada a una evidente hepatoesplenomegalia que correlaciona con la parasitemia.

Hacia el día 30 p.i. se observó una importante hepatoesplenomegalia ya que estos órganos pertenecen al sistema mononuclear fagocítico y por ello participan activamente en la respuesta inmune inespecífica y específica contra el parásito.

Histológicamente los órganos más dañados son el ME y el MC debido al tropismo de la cepa del parásito, en ambos órganos se presenta una cinética de aparición del proceso inflamatorio similar, que inicia en el día 7 p.i. y asciende hacia el día 30. El infiltrado se encontró constituido en las primeras etapas (día 7) de leucocitos PMNs y en las finales de CMNs (día 15 al 30 p.i.). Estos procesos inflamatorios son fundamentalmente de tipo perivascular y/o intersticial.

Únicamente en el ME y MC en los tiempos de 15 y 30 días p.i. se detectaron nidos de amastigotes, en los demás órganos tales como bazo, hígado, ganglio linfático regional y piel no se observaron nidos de

amastigotes, parásitos aislados o antígeno parasitario. Sin embargo el se observó la presencia de infiltrados inflamatorios, que en el hígado se presentaban en el día 15 y permanecían hasta el día 30 siendo perivasculares y de tipo crónico, mientras que en piel se observaron desde la primera hora p.i. hasta el día 30 pasando un de tipo agudo durante las primeras 48 h, a mixto a las 96 h y finalmente a crónico hasta el día 30, localizándose principalmente en la región muscular e invadiendo en ocasiones la dermis.

Se determinó que la técnica de IHQ es de mayor utilidad que la histológica de rutina, en la localización de un pequeño número de parásitos y/o Ags ya que la primera produce un inmunoprecipitado color sepia que evidencia al parásito a tan solo 160 aumentos. Además es posible determinar la presencia de amastigotes aislados los cuales normalmente no se detectarían con la técnica de tinción de H y E ya que la técnica de IHQ emplea un criterio no solo morfológico, sino también antigénico.

En algunas lesiones inflamatorias, es posible observar un contenido de material antigénico positivo.

Entre las ventajas que ofrece la técnica de IHQ quizá la más importante, es la de poder emplear tejidos incluidos en parafina que han sido conservados durante un largo período de tiempo, además se puede emplear en todo tipo de tejidos y podría implementarse como un método diagnóstico de laboratorio.

Con el método de IHQ empleando el Ac policlonal y el monoclonal se determinó que, tanto el ME como el MC fueron los únicos órganos que presentaban formas intracelulares del parásito durante los días 15 y 30 p.i. y por lo tanto fueron los tejidos más afectados. Ambos órganos presentaban una gran cantidad de infiltrados inflamatorios que aparecieron en el día 7 y aumentaron progresivamente hasta el día 30 p.i.

El número de nidos con infiltrados leucocitarios fue casi insignificante con respecto al número de nidos que se presentaron aislados y que no entraron en contacto con los leucocitos, un fenómeno similar ocurrió con los infiltrados inflamatorios que presentaron una reactividad positiva.

En ningún órgano fue posible detectar la presencia de material antigénico adsorbido en el tejido.

No se logró detectar al parásito en el sitio de inoculación (piel) lo cual podría atribuirse a:

- a) Que el parásito escapa rápidamente del sitio de inoculación.
- b) Que no hay reproducción local del parásito.
- c) Que la velocidad de destrucción de los parásitos que quedan embebidos en el tejido es relativamente rápida.
- d) Que se requieren intervalos de tiempo menores para la obtención de la muestra de estudio.

Por otro lado se observó una aparente reacción de sensibilización al músculo de la epidermis para el día 15-30 en el sitio de inoculación a pesar de no haber Ag ni parásito.

Comparando la técnica de IHQ empleando el Ac monoclonal anti-amastigotes y Ac policlonal se encontró que, se obtuvieron mejores resultados con el policlonal que con el monoclonal.

En cuanto a los mecanismos de patogenia involucrados principalmente, se determinaron los siguientes:

- 1) Destrucción directa del tejido por el parásito.
- 2) Destrucción del tejido por la presencia de los infiltrados inflamatorios.
- 3) Probable reacción autoinmune de tipo celular, contra las fibras del músculo del tejido tegumentario y del muscular esquelético.
- 4) Probable presencia de Acs y/o antígenos de reacción cruzada.

Finalmente, con el empleo de la técnica de IHO se abren nuevas perspectivas de estudio y diagnóstico para la enfermedad de Chagas.

8. BIBLIOGRAFIA.

- Andrade S. G. INFLUENCE OF *Trypanosoma cruzi* STRAIN ON THE PATHOGENESIS OF CHRONIC MYOCARDIOPATHY IN MICE. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 85(1):17-27, 1990.
- Andrews N. W., Eistein M. & Nussenzweig V. PRESENCE OF ANTIBODIES TO THE MAJOR SURFACE GLYCOPROTEIN OF *Trypanosoma cruzi* AMASTIGOTES IN SERA FROM CHAGASIC PATIENTS. Am J Trop Med Hyg 40(1):48-49, 1989.
- Barbosa A. J. METODO IMUNOCITOQUIMICO PARA LA IDENTIFICACION DO AMASTIGOTAS DO *Trypanosoma cruzi* EM CORTES HISTOLOGICOS DE ROTINA. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 27(6):293,297, 1985.
- Barbosa A. J., Gobbi H., Lino B. T., Lages-Silva E., Ramirez L., E., Teixeira V. P. & Almeida H. C. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O METODO CONVENCIONAL E O METODO DA PEROXIDASE ANTI-PEROXIDASE NA PESQUISA DO PARASITISMO TISSULAR NA CARDIOPATIA CHAGASICA CRONICA. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 28(2):91-98, 1986.
- Barral A. P., Barral-Netto M., Rassi A., Rezende J. M. & Gusmao R. D. ENHANCEMENT OF THE AUTOLOGUS MIXED LYMPHOCYTE REACTION IN PATIENTS WITH CHAGAS' DISEASE. Am J Trop Med Hyg 33(6):1078-1083, 1984.
- Bijovsky A. T. & Milder R. V. ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF THE INTERACTION BETWEEN HOST CELLS AND *Trypanosoma cruzi* IN EXPERIMENTAL CHAGOMAS. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 82:704-708, 1988.
- Brener Z. Amer Tryp Res 318, 1975.
- Brener Z. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 5:220-224, 1963.
- Brataña A., Avila J. L., Arias-Flores M., Contreras M. & Tapia F. J. *Trypanosoma cruzi* AND AMERICAN *Leishmania spp*: IMMUNOCYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF A LAMININ-LIKE PROTEIN IN THE PLASMA MEMBRANE. Exp. Parasitol., 69:166-175, 1988.
- Cabeza M. P. & Laguens R. P. SELECTIVITY OF ALTERATIONS IN SKELETAL FIBERS IN CHRONIC CHAGAS' DISEASE OF THE MOUSE. Experimentia 44:14-16, 1988.
- Carcavallo R. D. ASPECTS OF THE EPIDEMIOLOGY OF CHAGAS DISEASE IN VENEZUELA AND ARGENTINA. Am Tryp Res 318, 1975.

- Cardenas R. L., Tay J. & Salazar S. P. CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS PRODUCIDOS EN EL RATÓN POR CEPAS MEXICANAS DE *Trypanosoma cruzi*. Rev Inv Salud Pública (México) 35:131-153, 1975.
- Ciccarelli R. M. & Lopes J. D. CHARACTERIZATION OF A PROTEIN FROM *Trypanosoma cruzi* TRYPOMASTIGOTES THAT CLEAVES NON-IMMUNO IgG BOUND THROUGH IST Fab FRAGMENT. J Immunol 142(5):1685-1690, 1989.
- Cossio P. M., Laguens R. P. Diez C., Szarfman A., Segal A. & Arana R. CHAGASIC CARDIOPATHY ANTIBODIES REACTING WITH PLASMA MEMBRANE OF STRIATED MUSCLE AND ENDOTHELIAL CELLS. Circulation 50(43):1252, 1974.
- Costa R. S., Monteiro R. C., Lehen A., Laure-Helene N. M. & Droz D. IMMUNE COMPLEX-MEDIATED GLOMERULOPATHY IN EXPERIMENTAL CHAGAS' DISEASE. Clin Immunol Immunopathol 58:102-114, 1991.
- Crocker B. P. & Kuhn R. E. IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF *Trypanosoma cruzi* IN TISSUES OF MICE WITH EXPERIMENTAL CHAGAS' DISEASE. Histochemistry 77:195-200, 1983.
- Curotto M. A., Barbara de Oliveira L. C., Lima G. C. & Abrahamsohn I. A. *Trypanosoma cruzi*: MAINTENANCE OF PARASITE-SPECIFIC T CELL RESPONSES IN LYMPH NODES DURING THE ACUTE PHASE OF INFECTION. Exp Parasitol 70:164-174, 1990.
- Current Protocols in Immunology, 1991.
- Dvorak J. A. & Hyde T. P. *Trypanosoma cruzi*: INTERACTION WITH VERTEBRATE CELLS *IN VITRO*. I INDIVIDUAL INTERACTIONS AT THE CELLULAR AND SUBCELLULAR LEVELS. Exp Parasitol 34:266-283, 1973.
- Estrada F. E. & Peralta Z. L. MANUAL DE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS, 1ª Edición, Editorial AGT EDITOR, S. A., México, D. F., 1982.
- Fawcett D. W., TRATADO DE HISTOLOGÍA, 11ª Edición, Editorial Interamericana-Mc-Graw Hill, Madrid Esp.
- Ferreira A. W., Camargo M. E. & Nakahara O. S. *Trypanosoma cruzi*: IMMUNOPEROXIDASE ANTIBODY TEST FOR SEROLOGIC DIAGNOSIS. Exp Parasitol 37:131-137, 1975.
- Gazzinelli R. T., Oswald I. P., James S. L. & Sher A. IL-10 INHIBITS PARASITE KILLING AND NITROGEN OXIDE PRODUCTION BY INF- γ -ACTIVATED MACROPHAGES. J Immunol 148(6):1792-1796, 1992.

- Gorelik G., Genaro A. M., Sterin-Borda L., González C. S. & Borda E. S. ANTIBODIES BIND AND ACTIVATE β -ADRENERGIC AND CHOLINERGIC LYMPHOCYTE RECEPTORS IN CHAGAS' DISEASE. *Clin Immunol Immunopathol* 55:221-226, 1990.
- Hayes M. M. & Kierszenbaum F. EXPERIMENTAL CHAGAS' DISEASE: KINETICS OF LYMPHOCYTE RESPONSES AND IMMUNOLOGICAL CONTROL OF THE TRANSITION FROM ACUTE TO CHRONIC *Trypanosoma cruzi* INFECTION. *Infect Immun* 31(3):1117-1124, 1987.
- Hyde T. P. & Dvorak J. A. *Trypanosoma cruzi*: INTERACTION WITH VERTEBRATE CELLS *IN VITRO*. II QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE PENETRATION PHASE. *Exp Parasitol* 34:284-294, 1973.
- Kierszenbaum F., Cuna R. W., Beltz L. A. & Szein M. B. TRYPANOSOMAL IMMUNOSUPPRESSIVE FACTOR, A SECRETION PRODUCT(S) OF *Trypanosoma cruzi* THAT INHIBITS PROLIFERATION AND IL-2 RECEPTOR EXPRESSION BY ACTIVATED HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS. *J Immunol* 144(10):4000-4004, 1990.
- Kierszenbaum F., Villalta F. & Tal P. ROLE OF INFLAMMATORY CELLS IN CHAGAS' DISEASE. III KINETICS OF HUMAN EOSINOPHIL ACTIVATION UPON INTERACTION WITH PARASITES (*Trypanosoma cruzi*). *J Immunol* 136(2):662-666, 1986.
- Kirchoff L. V., Hieny S., Shiver G. M., Snary D. & Sher A. CRYPTIC EPITOPE EXPLAINS THE FAILURE OF A MONOCLONAL ANTIBODY TO BIND TO CERTAIN ISOLATES OF *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 133(5):2731-2735, 1984.
- Koberlo F. PATOLOGIA Y ANATOMIA PATOLOGICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*:404-427, 1961.
- Kuhn R. E. & Mumane J. E. *Trypanosoma cruzi* IMMUNE DESTRUCTION OF PARASITIZED MOUSE FIBROBLASTS *IN VITRO*. *Exp Parasitol* 41:66-73, 1977.
- Libby P., Alroy J. & Pereira M. E. A NEURAMINIDASE FROM *Trypanosoma cruzi* REMOVES SIALIC ACID FROM THE SURFACE OF MAMMALIAN MYOCARDIAL AND ENDOTHELIAL CELLS. *J Clin Invest* 77:127-135, 1986.
- López A. F., Bunn M. M. & Sanderson C. J. THE LYSIS OF *Trypanosoma cruzi* EPIMASTIGOTES BY EOSINOPHILS AND NEUTROPHILS. *Int J Parasitol* 8:485-489, 1978.

- Luban N. A. & Dvorak J. A., *Trypanosoma cruzi*: INTERACTION WITH VERTEBRATE CELLS *IN VITRO*. III SELECTION FOR BIOLOGICAL CHARACTERISTICS FOLLOWING INTRACELLULAR PASSAGE. *Exp Parasitol* 36:143-149, 1974.
- Marques de Araujo S. & Chiari E. CARACTERIZACAO BIOLOGICA DE CLONES DAS CEPAS Y, CL E MR DO *Trypanosoma cruzi* EM CAMUNDONGOS C3H ISOGENICOS. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 83(2):175-181, 1988.
- McCabe R. E., Remington J. S. & Araujo F. G. MECHANISMS OF INVASION AND REPLICATION OF THE INTRACELLULAR STAGE IN *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 46(2):372-376, 1984.
- Mc Cormick T. S. & Rowland E. *Trypanosoma cruzi*: CROSS-REACTIVE ANTI-HEART AUTOANTIBODIES PRODUCED DURING INFECTION IN MICE. *Exp Parasitol* 69:393-401, 1989.
- Milder R. V., Kloetzel J. & Dane M. P. OBSERVATION ON THE INTERACTION OF PERITONEAL MACROPHAGES WITH *Trypanosoma cruzi*. I INITIAL PHASE OF THE RELATIONSHIP WITH BLOOD STREAM AND CULTURE FORMS *IN VITRO*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 15(6):386-392, 1973.
- Milder R. V. & Kloetzel J. THE DEVELOPMENT OF *Trypanosoma cruzi* IN MACROPHAGES *IN VITRO*. INTERACTION WITH LYSOSOMES AND HOST CELL FATE. *Parasitol* 80:139-145, 1980.
- aMolina H. A. & Kierszenbaum F. IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF DEPOSITS OF EOSINOPHIL-DERIVED NEUROTOXIN AND EOSINOPHIL PEROXIDASE IN THE MYOCARDIUM OF PATIENTS WITH CHAGAS' DISEASE. *Immunology* 64:725-731, 1988.
- Molina H. A. & Kierszenbaum F. KINETICS OF DEVELOPMENT OF INFLAMMATORY LESIONS IN MYOCARDIAL AND SKELETAL MUSCLE IN EXPERIMENTAL *Trypanosoma cruzi* INFECTION. *J Parasitol* 74(3):370-374, 1988.
- Molina H. A. & Kierszenbaum F. EOSINOPHIL ACTIVATION IN ACUTE AND CHRONIC CHAGASIC MYOCARDIAL LESIONS AND DEPOSITION OF TOXIC EOSINOPHIL GRANULE PROTEINS ON HEART MYOFIBERS. *J Parasitol* 75(1):129-133, 1989.
- Morales M. C. & Milei J. IMMUNOPEROXIDASE TECHNIQUE IN EXPERIMENTAL CHRONIC CHAGASIC MYOCARDITIS. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 29(2):67-75, 1987.

- Muñoz-Fernández M. A., Fernández M. A. & Fresno M. SYNERGISM BETWEEN TUMOR NECROSIS FACTOR- α AND INTERFERON- γ ON MACROPHAGE ACTIVATION FOR THE KILLING OF INTRACELLULAR *Trypanosoma cruzi* THROUGH A NITRIC OXIDE-DEPENDENT MECHANISM. Eur J Immunol 22:301-307, 1992.
- Nogueira N. & Cohn Z. *Trypanosoma cruzi*: MECHANISM OF ENTRY AND INTRACELLULAR FATE IN MAMMALIAN CELLS. J Exp Med 143:1402-1420, 1976.
- Nogueira N., Gordon S. & Cohn Z. *Trypanosoma cruzi* MODIFICATION OF MACROPHAGE FUNCTION DURING INFECTION. J Exp Med 146:157-171, 1977.
- Oliveira M. M., Timm S. L. & Costa S. C. LIPID COMPOSITION OF *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol 58(B):195-199, 1977.
- Ortega-Barria E. & Perola M. E. A. A NOVEL *Trypanosoma cruzi* HEPARIN-BINDING PROTEIN PROMOTES FIBROBLAST ADHESION AND PENETRATION OF ENGINEERED BACTERIA AND *Trypanosomes* IN TO MAMMALIAN CELLS. Cell 67:411-421, 1991.
- Ortiz-Ortiz L., Parks D. E., Rodríguez M. & Weigle W. O. POLICLONAL B LYMPHOCYTE ACTIVATION DURING *Trypanosoma cruzi* INFECTION. J Immunol 124(1):121-126, 1980.
- Ouassi M. A., Cornette J., Alchain D., Capron A., Gras-Masse H. & Tartar A. T. *Trypanosoma cruzi* INFECTION INHIBITED BY PEPTIDES MODELED FROM A FIBRONECTIN CELL ATTACHMENT DOMAIN. Science 234:603-607, 1980.
- Paulin J. J., Keith Ch. H. & Tarleton R. L. MONOCLONAL ANTIBODY TO α -TUBULIN RECOGNIZES HOST CELL AND *Trypanosoma cruzi* TUBULINS. J Protozool 35(1):123-129, 1988.
- Petry K., Nudelman E., Eisen H. & Hakamori S. SULFATED LIPIDS REPRESENT COMMON ANTIGENS ON THE SURFACE OF *Trypanosoma cruzi* AND MAMMALIAN TISSUES. Mol Biochem Parasitol 30:113-122, 1988.
- Plata F. SYNERGISTIC PROTECTION BY SPECIFIC ANTIBODIES AND INTERFERON AGAINST INFECTION BY *Trypanosoma cruzi* IN VITRO. Eur J Immunol 14:930-935, 1984.
- Publicación Técnica del INDRE No 8. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. Dirección General de Epidemiología, I.N.D.R.E.

- Ramos C., Lamoyl E., Feoli M., Rodríguez M., Pérez M. & Ortiz-Ortiz L. *Trypanosoma cruzi*: IMMUNOSUPPRESSED RESPONSE TO DIFFERENT ANTIGENS IN THE INFECTED MOUSE. *Exp Parasitol* 45:190-199, 1978.
- Ribeiro dos Santos R., Rossi M. A., Laus J. L., Silva J. S., Savino W. & Mengel J. ANTI CD4 ABROGATES REJECTION AND REESTABLISHES LONG-TERM TOLERANCE TO SYNGENEIC NEWBORN HEARTS GRAFTED IN MICE CHRONICALLY INFECTED WITH *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 175:29-39, 1992.
- Rimoldi M. T., Sher A., Heiny S., Lituchy A., Hammer C. H. & Joiner K. DEVELOPMENTALLY REGULATED EXPRESSION BY *Trypanosoma cruzi* OF MOLECULES THAT ACCELERATE THE DECAY OF COMPLEMENT C3 CONVERTASES.
- Rizzo L. V., Cunha-Netto E. & Teixeira A. R. AUTOIMMUNITY IN CHAGAS' DISEASE: SPECIFIC INHIBITION OF REACTIVITY OF CD4⁺ T CELLS AGAINST MYOSIN IN MICE CHRONICALLY INFECTED WITH *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* :2640-2644, 1989.
- Rodríguez de Cuna C., Kierszenbaum F. & Wirth J. J. BINDING OF THE SPECIFIC LIGAND TO Fc RECEPTORS ON *Trypanosoma cruzi* INCREASES THE INFECTIVE CAPACITY OF THE PARASITE. *J Immunol* 72:114-120, 1991.
- Romaña C. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 54:220224, 1963.
- Sanderson C. J. & Wanderley de Souza A. A MORPHOLOGICAL STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN *Trypanosoma cruzi* AND RAT EOSINOPHILS, NEUTROPHILS AND MACROPHAGES *IN VITRO*. *J Cell Sci* 371:275-286, 1979.
- Schenkman S. & Eichinger D. *Trypanosoma cruzi* TRANS-SIALIDASE AND CELL INVASION. *Parasitology Today* 9(6):218-222, 1993.
- Sher A., Gazzinelli R. T., Oswald I. P., Clerici M., Kullberg M., Pearce E. J., Berzofsky J. A., Mosmann T. R., James S. L., Morse III H. C. & Shearer G. M. ROLE OF T-CELL DERIVED CYTOKINES IN THE DOWNREGULATION OF IMMUNE RESPONSES IN PARASITIC AND RETROVIRAL INFECTION. *Immunol Rev* 127:183-204, 1992.
- Silva L. H. *P. Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1:99-118, 1959.

- Silva J. S., Morrissey P. J., Grabstein K. H., Mohler K. M., Anderson D. & Reed S. G. INTERLEUKIN 10 AND INTERFERON γ REGULATION OF EXPERIMENTAL *Trypanosoma cruzi* INFECTION. J Exp Med 175:169-174, 1992.
- Snary D. RECEPTOR AND RECOGNITION MECHANISM OF *Trypanosoma cruzi*. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 79:587-590, 1985.
- Szelein M. B., Cuna E. R. & Kierszenbaum F. *Trypanosoma cruzi* INHIBITS THE EXPRESSION OF CD3, CD4, CD8 AND IL-2R BY MITOGEN-ACTIVATED HELPER AND CYTOTOXIC HUMAN LYMPHOCYTES. J Immunol 144(9):3558-3562, 1990.
- Tay J., Gutiérrez Q. M., Salazar S. P., Castillo M. & Ortega G. M. ESTUDIO SOBRE SEIS CEPAS MEXICANAS DE *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inv. Salud Pública (México), 33:67-76, 1973.
- Tay J. EVOLUCION DEL *Trypanosoma cruzi* CEPA MEXICANA EN EL HOSPEDRO VERTEBRADO E INVERTEBRADO E *IN VITRO*. Revista de Salud Pública de México XXII(5):513-520, 1980.
- Teixeira de Pinho R., Kloetzel J. & Milder R. V. MACROPHAGE-TRYPANOSOME INFECTION. DEAD AND LIVE CELL SCORING. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 23(2):96, 1981.
- Velasco C. O. & Guzmán B. C. IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MEXICO. Rev Lat-amer Microbiol 26:275-283, 1986.
- Velasco C. O., Tay Z. J., Lara A. R., Gutiérrez Q. M. PARASITOLOGIA MEDICA. Editor: Francisco Méndez Cervantes, México, D. F., 1990.
- Villalta F. & Kierszenbaum F. ROLE OF INFLAMMATORY CELLS IN CHAGAS' DISEASE. II INTERACTIONS OF MOUSE MACHOPHAGES AND HUMAN MONOCYTES WITH INTRACELLULAR FORMS OF *Trypanosoma cruzi*. UPTAKE AND MECHANISM OF DESTRUCTION. J Immunol 133(6):3338-3343, 1984.
- Villalta F. & Kierszenbaum F. ROLE OF POLIMORPHONUCLEAR CELLS IN CHAGAS' DISEASE. I UPTAKE AND MECHANISMS OF DESTRUCTION OF INTRACELLULAR AMASTIGOTE FORMS OF *Trypanosoma cruzi* BY HUMAN NEUTROPHILS. J Immunol 131(3):1504-1510, 1983.
- Wirth J. J. & Kierszenbaum F. FIBRONECTIN ENHANCES MACROPHAGE ASSOCIATION WITH INVASIVE FORMS OF *Trypanosoma cruzi*. Amm Assoc Immunol 133(1):460-464, 1984.

• Younes-Chennouf A. B., Hontebeyrie-Joskowicz M. Tricottet V., Eisen H., Reynes M. & Sald G. PERSISTENCE OF *Trypanosoma cruzi* ANTIGENS IN THE INFLAMMATORY LESIONS OF CHRONICALLY INFECTED MICE. 82:77-83, 1988.