



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE UN
AISLAMIENTO MEXICANO DE *Trypanosoma cruzi* Y
DETECCIÓN DE ANTÍGENO POR MÉTODO
INMUNOHISTOQUÍMICO EN MODELO MURINO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

DAVID CRUZ ROBLES

MEXICO D. F.,



1994

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCIÓN ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo
revisado el trabajo de tesis que realiz^ó el pasante _____

CRUZ ROBLES DAVID

con número de cuenta 8206687-5 con el título: _____

" CARACTERIZACION BIOLOGICA DE UN AISLAMIENTO MEXICANO

DE Trypanosoma cruzi Y DETECCION DE ANTIGENO POR METODO

INMUNOHISTOQUIMICO EN MODELO MURINO "

Consideramos que reúne ___ los méritos necesarios para que pueda conti-
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de -

BIOLOGO .

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

FIRMA

DR. VICTOR MANUEL MONTEON PADILLA

Director de Tesis

M. EN C. FERNANDO RAMOS REYES

DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIERREZ

DRA. MARIA GENOVEVA GONZALEZ MORAN

Suplente

DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA

Suplente

Ciudad Universitaria, D.F., a 19 de Abril de 1994.

DEDICATORIA.

Dedico la presente tesis a todas aquellas personas que, de alguna manera, han influido en mi formación, tanto académica como personal.

A mis padres, Rosario y Luis, como una muestra de agradecimiento por el apoyo que me brindan constantemente.

A mis hermanos, Luis Martín, Miguel Ángel y Rosario Elisa; como aliciente para sus futuros logros y como un testimonio del ímpetu de superación que debemos tener.

A tí, Gabriela, como un logro más de nuestras vidas en la ardua tarea de ser padres, compañeros y amigos.

A ustedes, Marisol y Anita, de quien recibo muestras constantes de amor y cariño, para que algún día tomen la iniciativa de lograr mayores éxitos en su camino por la vida.

AGRADECIMIENTOS.

Al personal del Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", por las facilidades que me brindaron para la realización del presente trabajo, por todas sus enseñanzas y por la experiencia adquirida durante mi estancia ahí.

Al Dr. Pedro A. Reyes López, por darme la oportunidad de iniciar mi formación profesional en el campo de la inmunología experimental.

A Víctor M. Monteón, quien fue el director de esta tesis, por su paciencia, sencillez y compañerismo para todos los que laboramos en el laboratorio de inmunología del I.N.C.I.CH.

Al Dr. Alberto Aranda F. y a mis compañeros del Departamento de Patología del I.N.C.I.CH., por su comprensión, su apoyo y el tiempo que me ofrecieron para terminar el trabajo escrito de esta tesis.

Al Sr. Tomás Cruz M., al Biólogo Armando Zepeda R. y al Técnico Rodrigo Velázquez, por su valiosa colaboración en la impresión del material fotográfico que aquí se presenta.

INDICE

RESUMEN	V
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	13
III. OBJETIVO	24
IV. MATERIALES Y METODOS	25
IV.I. Parásitos	25
IV.I.1 Cultivo de parásitos.	25
IV.I.2 Seguimiento del aislado en ratón.	26
IV.I.3 Determinación de la parasitemia.	26
IV.II. Obtención de anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i>	27
IV.II.1 Obtención de antígeno de <i>T. cruzi</i>	27
IV.II.2 Inmunización de conejos y purificación de anticuerpo.	27
IV.III. Histología.	28
IV.III.1 Estandarización.	29
V. RESULTADOS	30
V.I Parásitos	30
V.I.1 Cultivo de parásitos.	30
V.I.2 Seguimiento del aislado en ratón.	30
V.I.3 Parasitemia.	31
V.II. Obtención de anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i> .	34
V.III. Histología.	36
V.III.1 Microscopía de Luz.	36
V.III.2 Inmunohistoquímica.	37
V.IV. Láminas y figuras.	39
VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES	45
VII. BIBLIOGRAFIA	53
VIII. APENDICE	64

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es exclusiva del continente americano. Fue descrita a principios de este siglo (1909) y hasta ahora no se conoce terapéutica alguna para la cura total de este mal. Existen grupos de investigación en diferentes países del continente americano que se dedican al estudio de esta enfermedad abarcando diversos aspectos de la misma como lo son la epidemiología, patología, profilaxis, diagnóstico, etc.; todos ellos encaminados a su control y posterior erradicación.

En este trabajo se analizó el aislado mexicano NINOA de *Trypanosoma cruzi* para conocer su comportamiento biológico "in vivo" en cuanto a tropismo, virulencia, formas sanguíneas, curva de parasitemia, etc.; además de realizarse un estudio histológico del proceso inflamatorio que se genera en ratones NIH al ser infectados con este aislado.

Para este fin, se obtuvo la curva de parasitemia que produce el aislado en los ratones arriba mencionados. Se analizaron tejidos como cerebro, bazo, corazón y músculo esquelético con la técnica histológica convencional de Hematoxilina-Eosina para observar la cinética del proceso inflamatorio que se desarrolló durante la infección. Se implementó una técnica inmunohistoquímica para la localización de parásitos o antígeno parasitario en cortes por congelación de los órganos ya mencionados. Esta última técnica se estandarizó desarrollando un anticuerpo policlonal contra el aislado Ninoa de *Trypanosoma cruzi* en conejo, que se aplicó como primer anticuerpo con el método clásico de Peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP) y en el complejo Biotina-Avidina-peroxidasa (ABC). El complejo ABC se aplicó modificando el uso de Avidina por Streptoavidina, con lo cual se potencializó la técnica amplificando la señal generada en el sitio de inmunorreacción.

Los resultados que se obtuvieron, muestran que el aislado Ninoa presenta una similitud con el Biodemo tipo III descrito por Andrade en 1984, esto es: es miotrópico, de virulencia baja, con formas sanguíneas gruesas y pico de parasitemia alrededor del día

30 post-inóculo. El análisis de la cinética inflamatoria reveló un tipo de infiltrado intersticial difuso y progresivo en músculo esquelético y de tipo focal perivascular y con un pico a los 32 días post-inóculo en músculo cardíaco, además de un nido de amastigotes en músculo esquelético a los 32 y 96 días post-inóculo.

Los hallazgos inmunohistoquímicos mostraron la presencia de antígeno del parásito en folículos linfoides de bazo, de una manera gradual, en los tiempos post-inóculo observados y en fibras nerviosas de músculo esquelético a los 96 días post-infección.

En este trabajo se caracterizó al aislado Ninoa de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. Los resultados obtenidos sugieren el uso de ratones singénicos en este tipo de análisis, además de un mayor número de ratones que permitan emplear técnicas estadísticas. Por otro lado, se logró la estandarización de una técnica sensible y específica para la detección del parásito o antígeno del mismo, en tejidos de ratón infectado y procesados por congelación.

I. INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad resultado de la infección por un protozoo flagelado: el *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad fue descrita en 1909⁽¹⁾, cuando en Minas Gerais, Brasil, Carlos Chagas descubrió en la sangre de una niña de la localidad un parásito flagelado y observó que existen dos estados de la enfermedad. Una fase aguda y una crónica.

La forma infectante de *T. cruzi* es el tripomastigote metacíclico, el cual es excretado del intestino posterior del vector al momento en que éste se alimenta del hospedero y los parásitos salen junto con las heces u orina de la chinche. Penetran al torrente sanguíneo del huésped por escarificaciones de la piel o por infección de las mucosas o conjuntivas (signo de Romana)⁽²⁾. Posteriormente, ocurre una penetración de células locales en donde pasan a un estadio intracelular obligado llamado amastigote. En esta fase, los parásitos se multiplican por fisión binaria y después de cinco días aproximadamente, rompen las células tisulares dando origen a una nueva fase del ciclo, el tripomastigote flagelado o sanguíneo. Esta forma del parásito es muy activa y visible en el torrente sanguíneo; además parasita diversos órganos entre los cuales destacan el corazón, esófago, intestino grueso y sistema nervioso periférico (Fig. 1) ⁽³⁾.

Los parásitos se transmiten al humano por diferentes insectos triatominos hematófagos con más de 100 especies en el Continente Americano; 36 de los cuales se relacionan directamente con el humano⁽⁴⁾.

Existen varios ciclos vector-hospedero en la transmisión del parásito: Doméstico, Peridoméstico y Selvático o Silvestre (Fig. 2). El ciclo Silvestre o selvático, ocurre exclusivamente entre mamíferos silvestres y el vector transmisor (triatominos de la Familia *Triatomineae*). El ciclo Peridoméstico ocurre entre mamíferos domésticos o silvestres, que habitan cerca de los hábitats humanos y se relacionan o entran en contacto con el vector hospedero, de tal suerte que estas chinches transmiten la infección adquirida de mamíferos silvestres a animales domésticos como perros, gatos, etc. o,

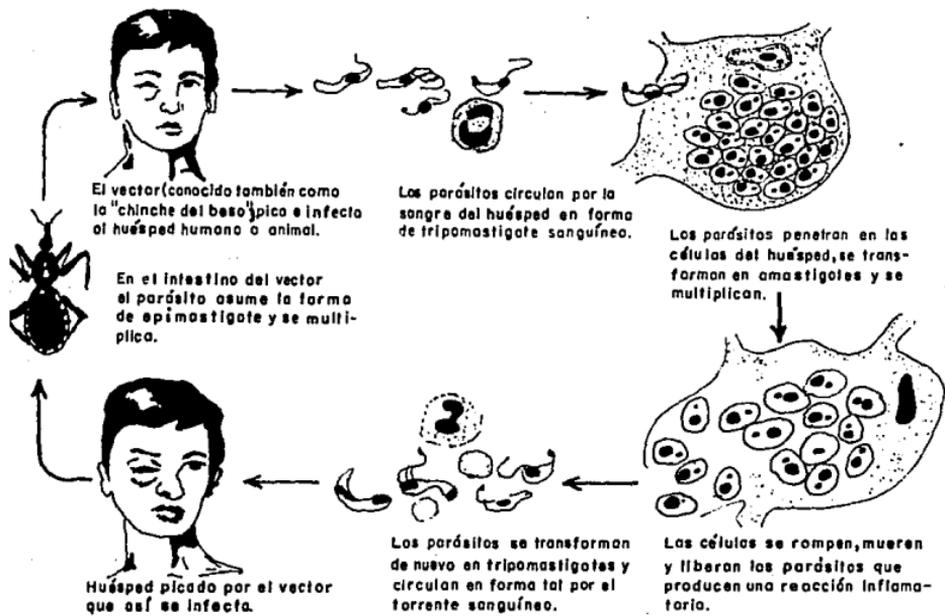


Fig. 1.- Ciclo de vida de *Tripanosoma cruzi* (Tomado de Netter, 1988).



Fig. 2.- Ciclos de transmisión de la Enfermedad de Chagas.

viceversa, adquirirla de animales domésticos y retroalimentar al ciclo silvestre. El ciclo Doméstico involucra al hombre y animales domésticos con el transmisor; aunque también puede interactuar con los otros dos arriba explicados. La transmisión también ocurre por infección congénita o transfusión sanguínea y un incremento importante se da por la migración masiva del área rural a urbana en áreas endémicas de esta enfermedad(5).

La enfermedad es originalmente una zoonosis asociada a mamíferos selváticos. Para darse en el humano, éste debe habitar, en primera instancia, en condiciones apropiadas para el desarrollo del vector: en zonas endémicas, cerca de regiones cálidas y en pueblos marginados y de escasos recursos con presencia del vector.

Una vez que se da la parasitosis en el humano, ésta cursa por una fase aguda y una crónica. La primera se caracteriza por niveles muy altos de parasitemia, gran cantidad de parasitismo tisular y clínicamente por fiebres, malestar general, adenomegalia, hepatomegalia y esplenomegalia; además, otras manifestaciones de esta fase incluyen el edema facial, miocarditis y meningio encefalitis, que es fatal especialmente en niños pequeños. La parasitemia se demuestra por observación directa de parásitos en preparaciones de sangre en fresco, frotis o xenodiagnóstico (Fig. 3). La fase aguda se mantiene por 4 a 8 semanas y aproximadamente el 10% de los casos son detectables por su sintomatología los cuales son, generalmente, niños pequeños(6).

La fase crónica sigue a la infección inicial con lesiones irreversibles después de 10 a 20 años. Un gran porcentaje permanece asintomático. Las formas clínicas más comunes de esta fase incluyen una forma cardíaca, una digestiva, mixta e indeterminada (latente). Es común encontrar formas cardíacas que se encuentran en grupos de edad adulta (entre 20 y 40 años de edad), que se caracterizan por presentar electrocardiogramas (ECG) con bloqueo completo de la rama derecha, hemibloqueo anterior izquierdo y bloqueo atrio ventricular asociado con crecimiento de ondas T y extrasístoles ventriculares; fallas cardíacas y muerte súbita. Se calcula que esta forma se presenta en un 27% de personas con infección crónica. Las formas digestivas se caracterizan por su movilidad dañina, megaesófago y megacolon y aparecen en el 3% aproximadamente de las personas

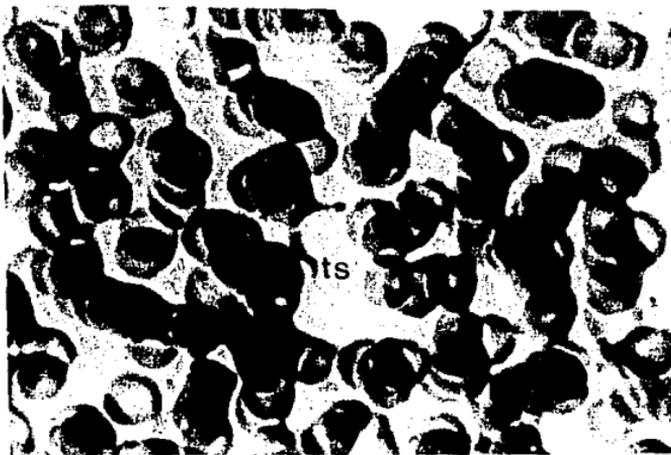


Fig. 3.- Parásito (ts) en frotis sanguíneo (Giemsa, 1,000X).

infectadas. Las formas latentes o intermedias se presentan en la mayoría de los pacientes (61% aproximadamente) y se caracterizan por no presentar sintomatología, ECG sin cambios ni anomalías digestivas; pero la serología es positiva. Las formas mixtas incluyen la combinación de formas cardíacas y digestivas (8%), además de haber también formas nerviosas con lesiones neuromotoras a nivel sistema nervioso periférico(6).

Por otro lado, la enfermedad de Chagas se limita al Continente Americano y particularmente a los países Tropicales y Subtropicales de Latinoamérica (Fig. 4). Algunos datos publicados se limitan a varias partes de esta región y se estima que de 15 a 20 millones de personas en áreas rurales y urbanas son infectadas por *T. cruzi*(7) y del 30 al 40 % de ellos desarrollan la fase crónica con manifestaciones clínicas(8).

La distribución, frecuencia y patología de la enfermedad varía de país en país y aún dentro de cada uno. También influyen las variaciones geográficas en la frecuencia y variaciones clínicas. La gente joven es la más afectada por infección aguda y la adulta padece la forma crónica de ésta.

En casi todos los países de América se estudian casos de la enfermedad de Chagas y constituye ésta un grave problema de salud pública. En Brasil, Argentina, Chile,

Fig. 4.- Enfermedad de Chagas en el Continente Americano(7).



 Tripanosomiasis Americana.

Venezuela, Panamá, Costa Rica, El Salvador y Guatemala se describen muchos casos de esta enfermedad(7).

Se estima que en Bolivia la incidencia de la infección se da en 20 mil casos por año debido a transfusiones sanguíneas(9). En las áreas endémicas de Brasil muere el 10% de pacientes de entre 25 y 65 años de edad por enfermedad crónica de Chagas(10).

En México, el estudio de esta enfermedad se remonta a los trabajos efectuados por Mazzotti desde 1936 (11); sin embargo, hasta 1940 se registraron los 2 primeros casos humanos comprobados parasitológicamente en el municipio de Teojomulco, Oaxaca, por Mazzotti (12) y de ahí hasta 1964 sólo se conocieron 4 casos humanos comprobados, revisados por Biagi y colaboradores(13), en diversos municipios de los estados de Yucatán, Estado de México, Sonora, Guerrero, Oaxaca y Nayarit, incluyendo 4 casos más mencionados por comunicación personal a Tay de Pérez Reyes en 1964 (14). De 1936 a 1979, se registraron un total de 148 casos de tripanosomiasis americana en diversas localidades de la República Mexicana (Fig. 5); y de 1977 a 1988 se estableció el diagnóstico de tripanosomiasis americana en 39 sujetos estudiados en el Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez(15), con lo cual se aumentó el interés por esta enfermedad y se abordaron aspectos de relevante importancia como lo son los reservorios del parásito y sus transmisores directos al humano.

En este sentido, se sabe que los principales reservorios naturales del parásito detectados en la República Mexicana son: *Didelphis marsupialis*, Tlacuache; *Dasylops novemcinctus maximus*, Armadillo; *Canis familiaris*, Perro(14) y *Rattus norvegicus*, Rata(16). En 1979, Tay y colaboradores(17) encontraron en Jalisco dos reservorios naturales más: *Mus musculus* y *Sciurus vulgaris* (Ratón y Ardilla) y reportaron resultados negativos en *Canis familiaris* (Fig. 6). Estas especies presentan una amplia distribución en la República Mexicana, por lo que se aumenta el riesgo de mantener los ciclos de transmisión, en presencia del vector infectado, en cualquier parte del territorio nacional.

Así mismo, se trabaja ampliamente en el campo de los transmisores de este mal, desde los trabajos de Mazzotti, Biagi y Tay; en los cuales se informa que los

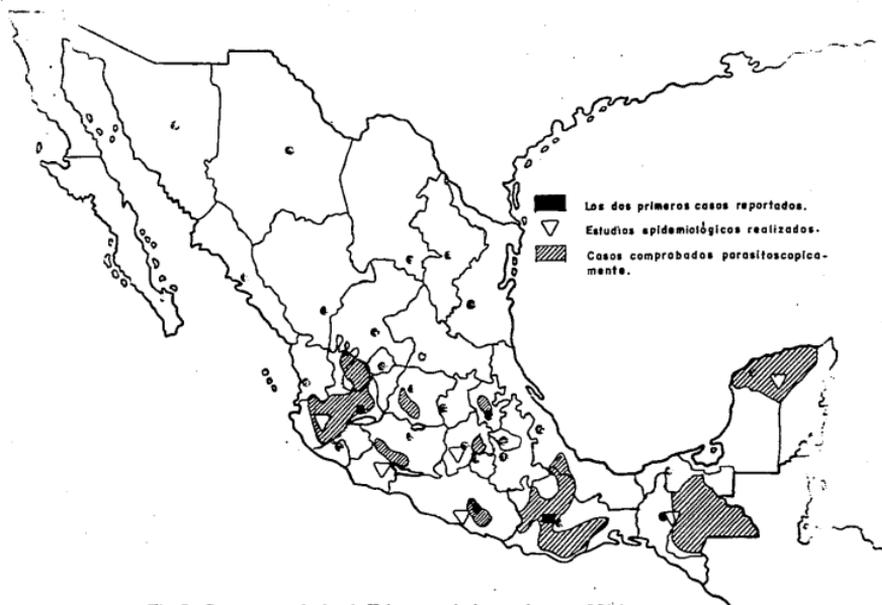


Fig. 5.- Casos comprobados de Tripanosomiasis americana en México⁽¹⁴⁾.

insectos hemípteros de la familia *Triatominae* son los causantes de la transmisión de la enfermedad. Dichos insectos se encuentran ampliamente distribuidos en México, aunque la mayoría de ellos se ubican en la vertiente del Pacífico y en altitudes de 0 a 1800 metros sobre el nivel del mar(14), lo cual indica que las zonas endémicas de la enfermedad abarcan un gran territorio sobre el área nacional, pues ocupan casi 2/3 partes de la misma (Figura 7).

En la República Mexicana se conocen 6 géneros de triatóminos que actúan como transmisores de la enfermedad de Chagas: *Triatoma* con 36 especies y subespecies distribuidas en la República; *Dipetalogaster* con la especie *maximus*; *Rhodnius prolixus*; *Paratriatoma* con las especies *hirsuta cuspidatus*, *h. yumanensis* e *h. kamiensis*; *Panstrongylus geniculatus* y *Eratyrus cuspidatus*, estos dos últimos en Veracruz (Figura 8). Estos triatóminos se colectan en forma silvestre, en madrigueras de animales silvestres e incluso en casas-habitación rurales o en el momento preciso en que se alimentan con sangre en personas dormidas(14).

Como puede observarse, la enfermedad de Chagas adquiere mayor importancia a medida que avanza el conocimiento de su problemática y patogenicidad, además de todos los aspectos que involucra una enfermedad de esta índole como lo son la clínica, epidemiología, distribución, frecuencia, aspectos socio-económicos, etc.. Sin embargo, algunos autores opinaron que esta enfermedad no es muy importante debido a la poca virulencia que encontraron en algunos aislados mexicanos del parásito(17). Salazar y colaboradores, en 1978(18), realizaron un trabajo comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas mexicanas de *T. cruzi* en ratones blancos. En este trabajo, los resultados reflejaron que sólo en el aislado "La cruz", obtenido del transmisor *Triatoma barberi*, se encontró muy baja virulencia; pero en las tres restantes: "Santa Catarina" y "Zacoalco", aisladas del mismo transmisor, y "Apodaca", obtenida de un caso humano, se presentaron altos niveles de parasitemia que concuerdan con los hallazgos histológicos e incluso se reportaron daños a nivel de sistema nervioso central e hígado que son poco habituales en estudios realizados con aislados mexicanos. Así mismo, diversos trabajos

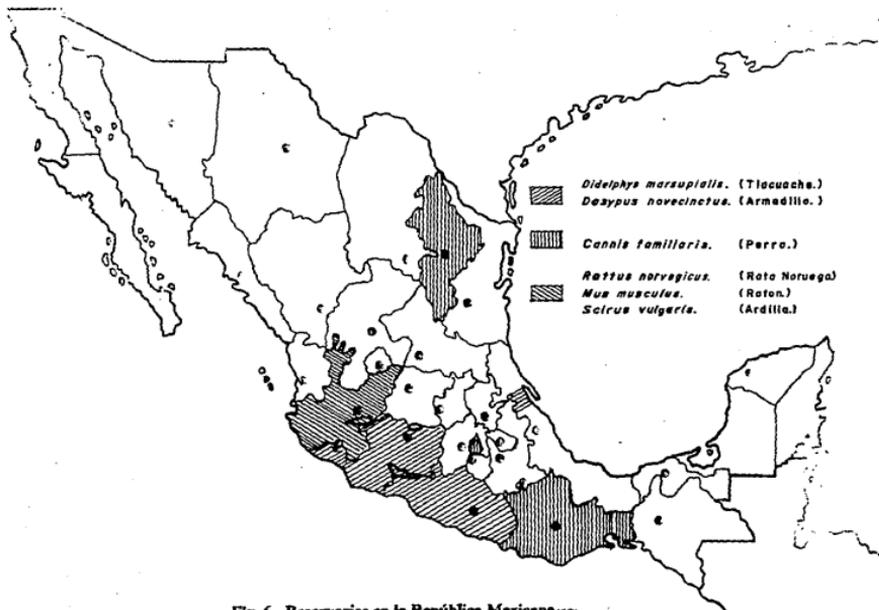


Fig. 6.- Reservoirios en la República Mexicana, 1977

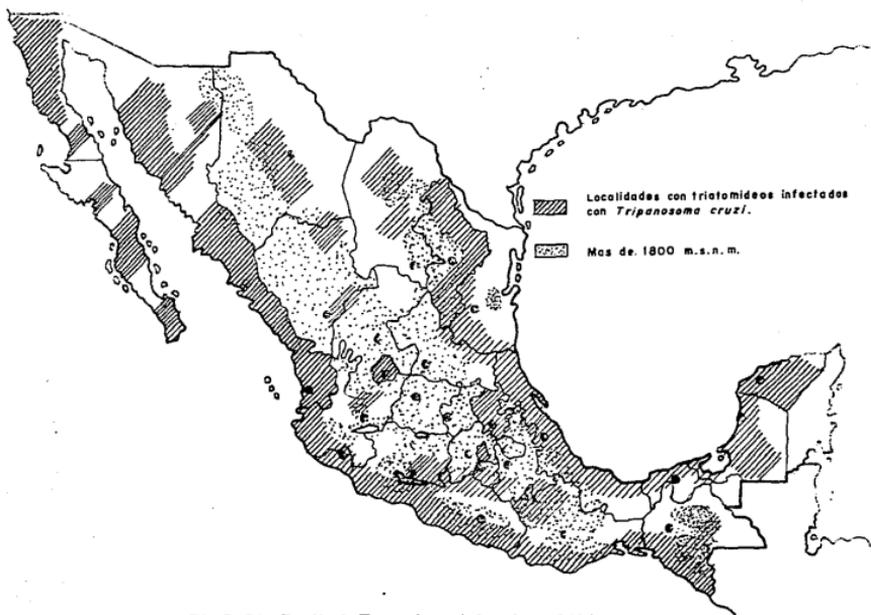


Fig. 7.- Distribución de Transmisores infectados en México(14)

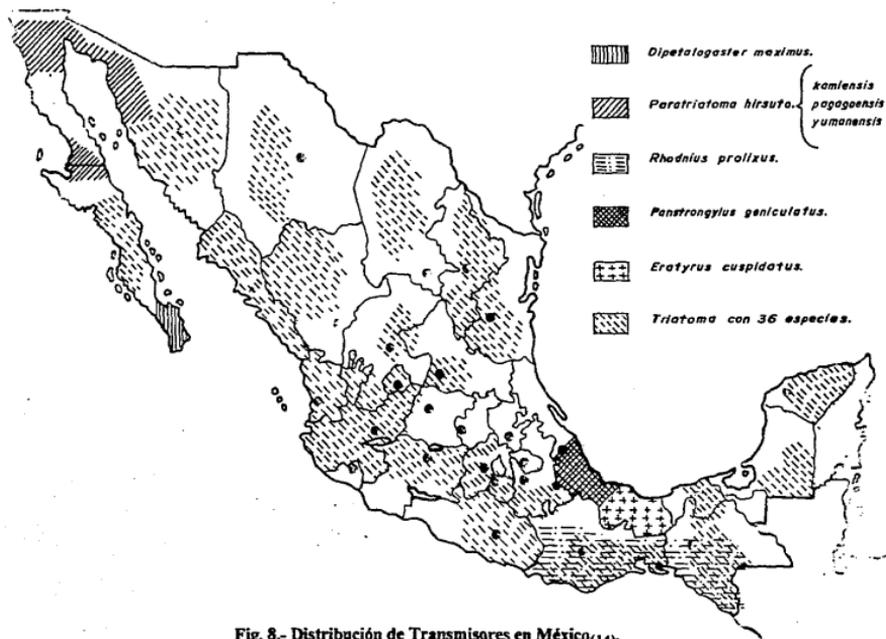


Fig. 8.- Distribución de Transmisores en México(14)

realizados en varias localidades del territorio nacional, demuestran la importancia de esta enfermedad, no sólo en cuanto a mostrar su existencia, sino también, encaminados a estudiar los ciclos de transmisión del parásito(19).

En este sentido, Goldsmith y colaboradores, en 1973(20), informaron de algunos hallazgos encontrados en el estado de Oaxaca en estudios serológicos realizados en donadores de sangre, en los cuales reportaron seropositividad hacia antígeno de *T. cruzi*. Monteón y colaboradores, en 1985(21), realizaron un trabajo en bancos de sangre de varios hospitales de la Ciudad de México y zona conurbada, analizando la serología de los donadores. En este trabajo se esperaban resultados negativos hacia antígeno de *T. cruzi* debido a las condiciones desfavorables para el desarrollo del vector transmisor; sin embargo, se encontró el 1% de seropositividad en donadores de sangre debido a la marcada afluencia de donadores rurales hacia estos hospitales, aumentando el riesgo de infección por transfusión sanguínea. De esta forma, el estudio de la enfermedad de Chagas comenzó a dar un giro importante en este país, con lo cual se abarcaron ya diferentes aspectos. En 1978, Reyes realizó una revisión de esta enfermedad enfocándola en el campo inmunológico. Encontró que no existe una resistencia natural en contra del parásito en el humano, pero sí la hay adquirida al inducirse una respuesta inmune celular y humoral en varios mamíferos estudiados incluyendo al hombre; la fase aguda de esta enfermedad se limita, probablemente como resultado de la respuesta inmune generada, además de que la forma crónica puede ser resultado de la respuesta inmune del huésped, y no propiamente un efecto directo del parásito. También observó que no existe una inmunoprofilaxis adecuada contra la enfermedad a pesar de estudiarse este aspecto con muy poco éxito (22).

Actualmente, los estudios que se realizan en torno a esta enfermedad, utilizan técnicas avanzadas como lo es la biología molecular, en donde se elaboran trabajos comparativos para diferenciar aislados del parásito usando el mapeo genético y la clonación de los mismos.

II. ANTECEDENTES

La implementación de un método inmunocitoquímico específico para la demostración de amastigotes de *T. cruzi* en tejido, se utilizó primeramente por Andrade y colaboradores(23), en estudios sobre la tripanosomiasis experimental, a través de la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Sin embargo, a pesar de la ayuda que esta técnica aporta en cuanto a la confirmación de la naturaleza antigénica de muestras sometidas a la microscopía de rutina, es necesario ayudarse de tinciones especiales para confirmar el hallazgo de supuestas figuras fluorescentes cuando se sospecha de parasitismo en algún tejido y, aún en estos casos, la identificación del parásito se torna difícil, debido a factores como el nivel y plano de corte que presenta el parásito y que se confunde fácilmente con algún elemento celular u otro parásito difícil de identificar, como en el caso de *Toxoplasma* y *Leshmania*. Debido a lo anterior, se buscó un método inmunohistoquímico sensible y específico para la demostración de *T. cruzi* en tejidos procesados rutinariamente para microscopía de luz. La técnica de Inmunoperoxidasa, con sus diversas modificaciones como la Peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) o el complejo Biotina-avidina-peroxidasa (ABC), ofrece grandes ventajas sobre los sistemas convencionales de histología y aún sobre la inmunofluorescencia.

La inmunoperoxidasa, tiene la característica de emplearse en tejidos frescos (cortados en criostato) o en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina, con lo cual se aventaja en mostrar una imagen estructural muy conservada de los tejidos y, por consiguiente, se aumenta el panorama morfológico; además, es sensible y presenta una amplificación de la señal de hasta 10 veces más que la inmunofluorescencia. La tinción es perdurable por largo tiempo, en comparación con la inmunofluorescencia directa o indirecta en la cual la tinción perdura sólo por algunos días en condiciones de refrigeración (Tabla 1).

Tabla 1.- Comparación entre Técnicas Inmunohistoquímicas.

CARACTERISTICA	IMUNOFLUORESCENCIA	P A P	A B C
TEJIDO USADO	Fresco o embebido en parafina.	Fresco o embebido en parafina	Fresco o embebido en parafina
MOLECULA GENERADORA DE LA SEÑAL.	Isotiocianato de Fluoreceína	Peroxidasa	Peroxidasa
DURACION DE LA SEÑAL	10 a 20 días en refrigeración	Permanente	Permanente
MANEJO DE LAMINILLAS	Delicado	Normal	Normal
EQUIPO USADO PARA SU OBSERVACION	Microscopio óptico con Luz U.V.	Microscopio óptico	Microscopio óptico
OBSERVACION DE ESTRUCTURAS Y SEÑAL	Estructuras opacas y difusas Señal nítida.	Estructuras y señal bien definidas	Estructuras y señal definidas y nítidas.
COLORANTES CONTRASTANTES	Azul de Evans	Cualquier contraste	Cualquier contraste.
SENSIBILIDAD	+++	+++	+++
AMPLIFICACION DE LA SEÑAL	+	++	+++

Así pues, varios autores recurren a la inmunoperoxidasa para investigar más aspectos a cerca de la enfermedad de Chagas, ya sea en trabajos de investigación básica o en técnicas para apoyar el diagnóstico de esta enfermedad en el humano

En 1983, Croker y Kuhn⁽²⁴⁾ compararon dos procedimientos inmunohistoquímicos para la detección de *Trypanosoma cruzi* en tejidos de ratón con enfermedad chagásica experimental: Peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) y el complejo Biotina Avidina-peroxidasa (ABC) (Fig. 9). En este trabajo, se resalta la importancia de las técnicas inmunohistoquímicas y las ventajas que se obtienen de ellas en la búsqueda de parásitos,

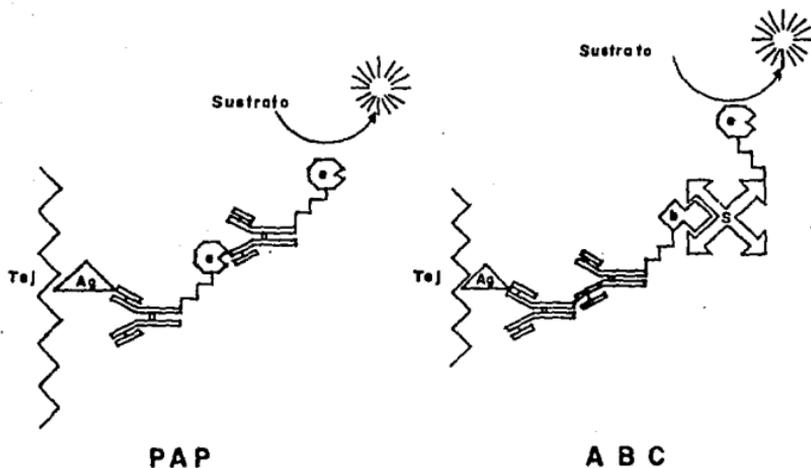


Fig. 9.- Esquematización de los sistemas PAP y ABC modificado. (Ag) antígeno; (e) enzima; (b) Biotina; (S) Streptoavidina; (Tej.) Tejido.

como este hemoflagelado, en comparación con las técnicas histológicas convencionales de hematoxilina-cosina; además, se observa que el complejo ABC es más sensible que la técnica de PAP, ya que se pueden emplear altas diluciones del antisuero para detectar no sólo agregados del parásito, sino también a individuos aislados o antígeno del parásito depositado en alguna estructura tisular. Así pues, con estas técnicas se observa una gran especificidad de la reacción, con la cual se tiene la certeza de mostrar al parásito o fragmentos de él en ausencia de inflamación e incluso en lesiones con gran infiltrado inflamatorio en las que puede ser difícil su hallazgo. Por otro lado, también detectan cuales son los daños por efecto directo del parásito y cuales aparecen como efectos o causas secundarias por toxinas, shock, debilitación crónica o enfermedad autoinmune. Barbosa, en 1985(25), utilizó tejidos de pacientes chagásicos crónicos y de animales en la fase aguda de la enfermedad embebidos en parafina para probar el método PAP con antisueros específicos producidos en conejo contra las cepas Y, CL y Ernestina de *T. cruzi* como primeros anticuerpos y como control positivo cultivos de macrófagos

peritoneales de ratón infectados con tripomastigotes de las mismas cepas y que 2 días después presentaron gran número de amastigotes intracelulares. Como controles negativos usó estos mismos amastigotes intracelulares tratados con suero normal de conejo como primer anticuerpo. En este trabajo, se logró evidenciar amastigotes con un alto grado de especificidad y nítido contraste con las estructuras circunvecinas en todos los tejidos tratados con los antisueros contra las tres cepas del parásito; además, se observó fácilmente a amastigotes aislados o formando nidos con bajos aumentos del microscopio óptico (80X), lo cual facilita la búsqueda del parásito y reduce el número de laminillas estudiadas para el diagnóstico. Por otro lado, las diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas, mostraron ser antigénicamente semejantes, al presentar el mismo patrón de tinción en todos los casos, lo cual sugiere que estas cepas comparten algún componente antigénico específico de el parásito, al igual que ocurre al emplear anticuerpos policlonales en la búsqueda de *Leshmania*(26). En 1986, el mismo Barbosa y colaboradores(27) retomaron este método para aplicarlo en tres autopsias con muerte por Cardiopatía Chagásica Crónica y realizaron un estudio comparativo entre el método convencional de Hematoxilina-eosina (H-E) y la PAP en cortes seriados de corazón fijados en formol e incluidos en parafina. Como controles positivos usaron tejidos de ratón infectado con la cepa Y del parásito que disecaron en la fase aguda de la enfermedad. Como control negativo, trataron a estos tejidos de ratón con suero normal de conejo como primer anticuerpo; o amortiguador de fosfatos salino, como blanco. Al analizar sus resultados observaron, por el método de H-E, un nido de amastigotes por cada veinte cortes revisados con una seguridad del 100 %; en cambio, con la PAP, visualizaron mas de un nido por corte con la misma seguridad que el otro método, con lo cual corroboraron las ventajas que ofrece la PAP en cuanto a la identificación y cuantificación del parásito "in situ". Sin embargo, Morales y Miley, en 1987(28), realizaron un estudio comparativo entre diferentes técnicas para diagnosticar la miocarditis chagásica crónica en modelo murino, como lo son la electrocardiografía, microscopía de luz (H-E), inmunofluorescencia directa (IFD) e indirecta (IFI) y la

inmunoperoxidasa. Utilizaron ratones inoculados con entre 10 y 10⁵ tripomastigotes de la cepa Tulahuén de *Trypanosoma cruzi* y los sacrificaron a 6 y 9 meses post-inóculo. Tomaron los registros electrocardiográficos antes del sacrificio y disecaron corazón y músculo esquelético para el procesamiento y aplicación de las demás técnicas. Después de analizar sus resultados, llegaron a la conclusión de que los registros electrocardiográficos y la microscopía de luz son las técnicas por las cuales demuestran más cambios patológicos y, por tanto, son las más adecuadas para establecer el grado de daño en la enfermedad de Chagas crónica. La inmunofluorescencia y la inmunoperoxidasa son altamente sensibles en músculo esquelético y no tanto en corazón. Por otro lado, al comparar las técnicas entre sí, concluyeron que ambas técnicas inmunológicas (IFI y PAP) mostraron una gran correlación con los hallazgos patológicos evidenciados por ECG y corroborados por microscopía de luz.

Por otro lado, la caracterización biológica de aislados de *T. cruzi* es importante debido a que existen variaciones epidemiológicas y clínicas que se relacionan con las diferencias existentes en los aislados o subpoblaciones del parásito, además de su prevalencia en ciertos órganos y tejidos. Así pues, Andrade₍₂₉₎, en una reunión internacional de investigadores sobre esta enfermedad realizada en 1985 en Panamá, diseñó un protocolo común en el que se adoptaron métodos estandarizados para la clasificación y análisis epidemiológico que determinaran la asociación entre cepas de *T. cruzi* y variedad clínica y geográfica en la enfermedad de Chagas. De esta forma, la caracterización morfológica y funcional de las cepas de *T. cruzi* se estudia en modelos "in vivo", tomando en cuenta como parámetros: la morfología del parásito, inducción de parasitemia (pico de parasitemia), rangos de multiplicación (curva de parasitemia) y patogenicidad (mortalidad y tropismo); con lo cual se construyeron tres patrones diferentes o Biodemos que tipifican diferentes tipos de cepas (Tabla 2). Este tipo de clasificación ayuda a identificar con mayor rapidez a los diferentes aislados, aunque de una manera general. Sin embargo, actualmente se realizan trabajos más finos encaminados a la caracterización y clasificación de este parásito en diferentes

subpoblaciones, al usar análisis de restricción de endonucleasas del DNA ubicado en los minicírculos del cinetoplasto del parásito⁽³⁰⁾ y análisis isoenzimáticos (zimodemos) como una herramienta más en este quehacer. De esta manera, se creó un protocolo de análisis rápido en fragmentos del DNA de los minicírculos del cinetoplasto de *T. cruzi* que se usa rutinariamente en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular del Instituto FIO CRUZ en Rio de Janeiro, Brazil, con el cual se detectó, en ratones y de

Tabla 2.- BIODEMOS₍₂₉₎

CARACTERISTICA	TIPO I	TIPO II	TIPO III
PARASITEMIA	Alta	Media	Baja
PICO DE PARASITEMIA (DIAS POSTINOCULO)	9-10	12-20	20-30
MORTALIDAD	100 %	40 %	10 %
FORMAS SANGUINEAS	Delgadas	Anchas	Gruesas
TROPISMO	Macrofagotrópica	Miotrópica	Miotrópica
VIRULENCIA	Alta	Media	Baja
PROTOTIPO (CEPAS)	Y, Berenice Peruviana	12 F	CL, MR, Colombiana
ZIMODEMO	Z1, Z2, Z3	Z2	Z1
SUSCEPTIBILIDAD CON NIFURTIMAX Y BENZNIDAZOLE	50 - 100 %	0 - 100 %	0 - 20 %
COMPORTAMIENTO EN RATON SINGENICO (Balb/c)	Susceptible	Resistente	Susceptible

manera experimental, la coexistencia de infección mezclada con cepas diferentes (Y y T) y en el cual observaron que el proceso de aislado del parásito influye en el tipo de cepa que prevalezca en la composición final de la mezcla de las mismas⁽³¹⁾.

Por otro lado, se compararon los patrones biotímicos e isoenzimáticos en distintas poblaciones de parásitos en Bambuí (Minas Gerais, Brazil), en los cuales se encontró que algunos zimodemos pueden ser compatibles con cierto tipo de biotimo, pero en forma individual, cada zimodemo se comporta de manera diferente y puede compartir características biotímicas combinadas, con lo cual se creó la necesidad de incluir análisis isoenzimáticos y de secuenciación de nucleótidos del DNA del cinetoplasto de *T. cruzi* para tener una base científica bien apoyada en la clasificación de subpoblaciones del parásito, así como de caracterizar perfectamente a los aislados que comúnmente se emplean en los laboratorios de investigación básica y tener, además, un centro de referencia que sea confiable. En este sentido, y usando la clasificación de Andrade por Biotimos junto con ensayos inmunológicos y moleculares, se elaboraron varios trabajos que caracterizan, tanto aislados de parásitos, como clones de cepas ya documentadas como la Y o Peruviana de alta infectividad en ratones^(32,33,34), o también aislados provenientes de animales silvestres^(35,36,37). En cuanto a los aislados mexicanos, se sabe que presentan una marcada heterogeneidad en diversas propiedades biológicas; sin embargo, son pocos los trabajos que se generan al respecto. Así pues, la comunidad científica de investigadores mexicanos dedicados al estudio de esta enfermedad, hacen esfuerzos para unificar criterios en reuniones nacionales que abarcan diferentes puntos de estudio en torno a este mal. De tal modo, en la III Reunión Nacional de Chagas, celebrada en el Instituto Nacional de Cardiología " Ignacio Chávez" en Octubre de 1992⁽³⁸⁾, se presentaron cuatro trabajos que tratan de la importancia de clasificar y tipificar aislados mexicanos de *T. cruzi*. Pérez Reyes⁽³⁹⁾ mostró la semejante infectividad obtenida con tripomastigotes metacíclicos derivados del vector y de medios de cultivo, al usar el aislado CID de *T. cruzi* (caso humano de Oaxaca); mientras que un grupo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, realizó tres tipos de estudios. Hernández⁽⁴⁰⁾ analizó, a nivel molecular, el polimorfismo de aislados mexicanos comparándolos con cepas referidas de Sudamérica al usar variaciones isoenzimáticas y polimorfismos en los espaciadores no transcritos del DNA ribosomal de los mismos y

encontrar correlación entre el polimorfismo y el área geográfica en donde se colectó el aislado. Por otro lado, Espinosa⁽⁴¹⁾, del mismo centro de investigación, caracterizó bioquímicamente, a nivel proteasas, a los epimastigotes de los aislados C4 y NINOA, encontrando heterogeneidad a este nivel y, en el aislado NINOA, una actividad enzimática que abarcó un amplio rango de pH, lo que posiblemente facilite la estancia del parásito en los diferentes microambientes que suele parasitar. A nivel de metacicloogénesis, López Olmos⁽⁴²⁾ analizó la metamorfosis del parásito "in vitro" en los aislados Z21 y NINOA de *T. cruzi* y obtuvo resultados diferentes en la transformación del parásito entre cada aislado al usar diferentes medios inductores de metacicloogénesis.

Por otro lado, existen algunos artículos que describen cualitativamente los tipos celulares de las lesiones con infiltrado inflamatorio en el humano^(43,44,45,46) y en la enfermedad de Chagas experimental^(47,48,49). Sin embargo, se conoce muy poco de la cinética del desarrollo de estas lesiones inflamatorias, pues en la mayoría de los artículos se reporta el número de los diferentes tipos de células inflamatorias en lesiones miocárdicas de pacientes Chagásicos⁽⁵⁰⁾ y se define la composición de infiltrados celulares en lesiones con diversos grados de gravedad; pero no se hacen conclusiones a cerca de la cinética del proceso inflamatorio, debido a que se desconoce el tiempo exacto del inicio de la infección al trabajar con casos humanos.

Molina y Kierszenbaum, en 1988⁽⁵¹⁾, utilizaron un modelo murino para examinar la cinética del desarrollo de lesiones inflamatorias en músculo y miocardio en la infección experimental con *T. cruzi*. Usaron ratones blancos Cri-CD-1(ICR)BR de cuatro semanas de edad para la producción de parásitos de la cepa Tulahuén y ratones CBA/J singénicos de la misma edad para los estudios histológicos. En dicho experimento infectaron a los ratones por vía intraperitoneal con 20,000 trypomastigotes metacíclicos y los ratones control con medio de cultivo RPMI-1640. Sacrificaron 6 ratones infectados y 4 control a diferentes tiempos postinfección para su análisis histológico y diseccionaron de los mismos: corazón, músculo cuádriceps femoral y músculo gastroneumio. Los resultados que obtuvieron en este trabajo, revelan que las células mononucleares (MNC) son las

primeras células inflamatorias que se acumulan e incrementan a medida que se agravan las lesiones tanto en miocardio como en músculo esquelético y posteriormente aparecen los neutrófilos. Esto propone que las MNC pueden montar una respuesta inmunológica contra el parásito al reclutar neutrófilos, después de participar en la limpieza de parásitos y trozos de tejido; sugiriendo entonces que los neutrófilos contribuyen al daño tisular. También observaron que el número de células inflamatorias aumentó con respecto a la gravedad de la lesión, lo cual sugiere la utilización de estas células para evaluar la gravedad de la lesión en términos numéricos; aunque entonces se deba hacer un estudio más detallado de la cinética de inflamación con tiempos de observación más cortos para poder obtener mayor número de datos y el estudio sea más confiable.

Por otro lado, los daños causados en la fase aguda de la enfermedad son explicados por la presencia del parásito en tejido. Sin embargo, en la fase crónica la patogénesis es difícil de explicar, pues el daño celular se asocia a infiltrado linfocitario sin presencia del parásito(52,53), por lo cual se generan varias hipótesis que tratan de explicar este fenómeno. Una de ellas propone un mecanismo patológico llamado Toxigénico, en la cual se postula que el parásito puede liberar ciertas toxinas que causan daño neuronal(53). En 1974, Koberle(54) propuso que el daño a tejido es causado indirectamente por el parásito en la fase crónica. Ribeiro Dos Santos en 1980 y 1981(55,56,57), realizó una serie de experimentos con cultivos celulares de mamíferos (cardiocitos), a los cuales infectó con tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* durante 24 horas. Lavó los cultivos y los mantuvo viables para medir, a diferentes tiempos, la presencia de antígenos asociados a la membrana de estos por IFI. En dicho experimento, encontró la presencia de antígeno parasitario en la membrana de cardiocitos parasitados y no parasitados desde las 96 horas post-inóculo hasta la finalización del experimento (día 10 post-inóculo). Estos resultados indican la presencia de antígenos solubles en el medio que pueden adsorberse a la superficie de las células, con lo cual se propone que el daño se produce por hipersensibilidad en los tejidos involucrados. Posteriormente, en un estudio más completo realizado en 1985, Araujo(58) encontró antígeno en la membrana de células infectadas y

no infectadas, así como también que una población rica en linfocitos T de ratón infectado con *T. cruzi*, fue capaz de reconocer antígeno adsorbido en la superficie de células parasitadas y no parasitadas y destruirlas. Esto sugiere que la hipersensibilidad es un mecanismo accesorio de la patogénesis y no la única o principal causa de daño. Así mismo, existen diversos trabajos encaminados a conocer el mecanismo de patogenicidad de esta enfermedad que usan modelos murinos de diversas susceptibilidades a la infección por *T. cruzi*, por ejemplo: González y colaboradores en 1987⁽⁵⁹⁾, emplearon ratones Rockland que presentan parasitemia persistente y escasos amastigotes en tejido cuando se infectan con *T. cruzi*. Encontraron miositis y neuritis intramuscular con desinervaciones a los 4 y 12 meses postinfección, con un proceso de reinervación lento que indica la presencia de un mecanismo de homeostasis dentro de la patogenia de esta enfermedad.

Otro mecanismo de patogenicidad dentro de ésta enfermedad, el Autoinmune, sugiere que puede existir un tipo de reactividad cruzada entre antígenos del parásito y del huésped. Este mecanismo lo propuso Cossio^(60,61) cuando, en 1974, encontró un tipo de anticuerpos, en sueros de chagásicos, capaces de tener reactividad hacia endotelio de vasos sanguíneos, intersticio y endocardio. Este tipo de anticuerpos, a los cuales denominó EVI, fueron analizados por IFI en hígado y corazón de humano, bovino y ratón, resultando positivos en 24 de 25 pacientes chagásicos. Sin embargo, estudios posteriores basados en este concepto de autoinmunidad, demostraron que los anticuerpos "EVI" no son característicos de la enfermedad de Chagas, pues también se encontraron en otro tipo de enfermedades e incluso en un 2% de individuos sanos⁽⁶²⁾.

En este sentido, Khoury y colaboradores, en 1983⁽⁶³⁾, reportaron la naturaleza heterofílica de los anticuerpos EVI, pues estos presentaron reactividad sólo hacia tejidos animales y no hacia tejido cardíaco humano, además de que esta reactividad se perdía al adsorber los sueros con eritrocitos, extracto de hígado y riñón de cobayo. En 1984, Borda⁽⁶⁴⁾ encontró que la IgG de individuos chagásicos asintomáticos, estimulaba la tensión y frecuencia de la contracción del atrio de la rata. La reactividad disminuía al

adsorber el suero con eritrocitos de guajolote, que son ricos en adrenorreceptores β -1; y al adsorber con eritrocitos de cobayo no había pérdida de la reactividad, por lo cual, estos anticuerpos eran independientes de los EVI y tal vez participaban como bloqueadores "naturales" β -1 adrenérgicos; aunque ahora se pone en duda su participación en la patogenia chagásica, pues dañan la función cardíaca, pero provienen de individuos chagásicos asintomáticos. Gattass y colaboradores⁽⁶⁵⁾ dudaron de la teoría autoinmune de daño tisular en la enfermedad de Chagas, al inmunizar ratones con fracciones de epimastigotes y tripomastigotes sanguíneos de distintas cepas de *T. cruzi* para obtener linfocitos T y realizar un ensayo celular proliferativo en presencia de células accesorias de ratón singénico normal irradiado. Utilizaron como antígenos las distintas fracciones del parásito y tejido cardíaco de ratones sanos singénicos e isogénicos. Ellos encontraron incorporación de Timidina tritiada cuando usaron como antígeno tanto las fracciones de *T. cruzi*, como el extracto de tejido cardíaco isogénico y concluyeron que la reactividad hacia antígenos de corazón es un efecto aloreactivo mas que una respuesta autoinmune contra estructuras propias; además enfatizaron la importancia de emplear animales singénicos para estudios que comprueben autoinmunidad.

Como se puede observar, es de suma importancia la caracterización de los aislados mexicanos de *T. cruzi*, para conocer más a cerca de la enfermedad de Chagas. Es por esto que, en el presente estudio, se trabajó con el aislado mexicano NINOA, debido a la amplia utilización de dicho aislado en la realización de trabajos de investigación básica y clínica en diversos centros de investigación.

III. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es: caracterizar "*in-vivo*" al aislado mexicano NINOA de *Trypanosoma cruzi*. Estandarizar una técnica inmunohistoquímica altamente sensible que ayude a detectar al parásito o antígeno del mismo e inferir algunos mecanismos de patogenicidad de esta enfermedad, mediante el análisis de la cinética del proceso inflamatorio observado por microscopía de luz.

IV. MATERIALES Y METODOS

IV.1. PARASITOS

IV.1.1 Cultivo de Parásitos:

Se utilizó el aislado NINO A de *Trypanosoma cruzi*. Dicho aislado se obtuvo de un caso Chagásico agudo en el estado de Oaxaca (donado por el Dr. Máximo Cortés de la E.N.C.B. del I.P.N.) y se mantuvo en medio de cultivo bifásico de Infusión de corazón y cerebro (BHI) enriquecido con 10% final de Suero Fetal Bovino (SFB) y Solución salina al 0.85% como fase líquida. El agar se preparó como sigue:

BHI	3.7	g.
Agar Nutritivo	2.3	g.
Dextrosa	1.0	g.
Agua destilada	100.0	ml.

El medio de cultivo, la solución salina y el material de vidrio, como pipetas pasteur y pipetas serológicas, se esterilizó en autoclave por calor húmedo a 15 lbs. de presión durante 15 minutos y enfriamiento lento (Apéndice 1).

Los parásitos se resembraron cada 10 días en medios de cultivo nuevos, observando entre cada resiembra su viabilidad y estado axénico por medio de microscopía óptica (Apéndice 2).

IV.1.2 Seguimiento del aislado en ratón:

Se obtuvieron tripomastigotes metacíclicos en medios de cultivo de 2 a 3 semanas de edad de la siguiente manera: se homogenizó y decantó la fase líquida del medio de cultivo en tubos de plástico estériles para centrifugación. Se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 2 ml de suero normal de ratón o humano para inocular a 4 ratones NIH con 0.5 ml de esta mezcla por vía intra peritoneal. El número de tripomastigotes inoculados fue aproximadamente de 1×10^6 . Después de un mes post-infección, se verificó la presencia del parásito en sangre periférica del ratón por observación directa, en preparaciones en fresco, vistas al microscopio óptico.

Se mantuvo la infección en ratón al tomar una muestra de sangre de ratón infectado, por punción cardíaca, e inocular aproximadamente de 1×10^4 a 1×10^5 tripomastigotes sanguíneos a ratón sano, por vía intraperitoneal. Esto mismo se realizó periódicamente cada mes.

IV.1.3 Determinación de la parasitemia:

Se obtuvieron tripomastigotes sanguíneos de sangre periférica de ratón, para infectar a 8 ratones NIH con aproximadamente 50 mil parásitos vía intraperitoneal.

Se tomó una muestra de sangre de la cola de cada uno de estos ratones a los siete días post-infección, con el fin de contar el número de parásitos por mililitro de sangre en cámara de Neubauer o hemocitómetro⁽⁶⁶⁾ (Apéndice 3).

Se procedió a realizar un muestreo igual al anterior con un intervalo de 2 a 3 días entre ellos para construir la curva de parasitemia de este aislado.

IV.II. OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-*Trypanosoma cruzi*:

IV.II.1 Obtención de antígeno de *T. cruzi*:

Se utilizaron epimastigotes de cultivo del aislado Ninoa de *T. cruzi* de aproximadamente 2 semanas de crecimiento, los cuales se concentraron por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y el botón se lavó 3 veces con amortiguador de fosfatos salino (PBS 10mM pH=7.2), por resuspensión y centrifugación de éste a la misma velocidad y tiempo anterior. Posteriormente, se procedió a la sonicación de los parásitos agregando, al concentrado, inhibidores de proteasas (Fenil-metil-sulfonil fluoruro {PMSF} 5mM en alcohol isopropílico al 7%, Ac. ϵ -aminocapróico 10mM en PBS y Acido Etilendiaminotetracético {EDTA} 10mM en PBS)^(67,68). La sonicación se realizó en cama de hielo y a 100 watts por 10 segundos, de 5 a 7 veces, con sonicador Lab-sonic modelo 15-10 de Braun. El término de la sonicación se determinó cuando no se encontraron parásitos completos a la observación en el microscopio óptico.

IV.II.2 Inmunización de conejos y purificación de anticuerpo.

Se inoculó un conejo adulto con antígeno completo de *T. cruzi* (100 μ g de proteína en cada ganglio popliteo en presencia de adyuvante completo de Freud). Después de un mes post-inóculo, se reestimuló el sistema inmune del animal por inoculación subcutánea con antígeno del parásito (1mg) mas 1 ml. de adyuvante incompleto de Freud. Este tipo de inóculo se aplicó en tres ocasiones más cada 15

días(69). Después de tres semanas del último estímulo, se tomó una muestra de sangre del conejo para titular el anticuerpo generado por éste, con la técnica de Inmuno difusión doble(70) (Apéndice 4). Una vez que se alcanzó un título del anticuerpo de 1:16, se procedió a sangrar a el animal por punción cardiaca para obtener el mayor volumen de sangre posible, la cual se centrifugó a 3000 g por 10 minutos para obtener el suero. La purificación del anticuerpo así generado, se realizó por el método de precipitación de proteínas con solución saturada de sulfato de amonio(71)(Apéndice 5), para obtener inmunoglobulinas clase G de conejo anti-*Trypanosoma cruzi*; y cromatografía en columna por intercambio iónico (71) con DEAE-52 celulosa (Apéndice 6).

Posteriormente se procedió a la detección y cuantificación de la concentración de proteínas por el método U.V. 280 nm y Lowry (72) (Apéndice 7).

IV.III. HISTOLOGIA

Se utilizaron ratones hembras de la cepa NIH (no singénica), adultos, de aproximadamente 30g. de peso en todos los ensayos.

Como control negativo se usaron 8 ratones sanos inoculados con su misma sangre por vía intraperitoneal. Otros 8 ratones sanos se inocularon por la misma vía con 50,000 parásitos aproximadamente del aislado NINOA (tripomastigotes sanguíneos), obtenidos de ratones infectados.

Todos los ratones se sacrificaron por parejas a diferentes tiempos post-inóculo (16, 32, 48 y 96 días), de los cuales se disectó: cerebro, bazo, corazón y músculo esquelético estriado de la pata posterior derecha de cada ratón. Dichos órganos se procesaron individualmente para microscopía de luz y para hacer cortes por congelación (en fresco).

Se usaron los métodos convencionales de histología para el proceso de los tejidos para microscopía de luz. Se utilizó la técnica de Hematxilina-eosina(73) para teñir los tejidos y observar su patrón morfológico (Apéndice 8).

Para detectar la presencia del parásito o antígeno del mismo en cada órgano, se empleó la técnica inmunohistoquímica de peroxidasa de rábano(74) y el complejo Streptavidina-Biotina-peroxidasa(75). Se utilizó, como primer anticuerpo, el suero hiperinmune de conejo anti- *T. cruzi* conjugado con peroxidasa para el primer caso. En el segundo caso, el suero hiperinmune de conejo anti-*T. cruzi* fue seguido por un segundo anticuerpo de cabra biotinado anti-conejo y el conjugado Streptoavidina-peroxidasa. En ambas técnicas se usó como cromógeno el sustrato Aminoetil-carbazol y se contrastaron los tejidos con hematoxilina de Harris (Apéndice 9).

IV.III.1 Estandarización

Para estandarizar las técnicas inmunohistoquímicas se utilizaron laminillas con epimastigotes de *T. cruzi* fijados con una mezcla 1:2 de metanol al 70% y Acetona respectivamente, durante 10 minutos; cortes por congelación a 4 µm de corazón de ratón sano e infectado y frotis sanguíneos de humano sano. Estos últimos sirvieron como control de especificidad y del bloqueo de peroxidasa endógena, la cual se controló al tratar las muestras con H₂O₂ (Peróxido de Hidrógeno) al 3% en Metanol Absoluto.

En cada ensayo realizado, se utilizó una laminilla de frotis sanguíneo humano como control de bloqueo de peroxidasa endógena, tres laminillas con epimastigotes de *T. cruzi*, de las cuales una se trató con PBS 10 mM pH= 7.2; otra, con suero normal de conejo al 1% en el mismo amortiguador y la última, con suero hiperinmune de conejo anti-*T. cruzi* diluido en el mismo amortiguador, como primer anticuerpo. Las diluciones empleadas del primer anticuerpo fueron: 1:40, 1:80 y 1:200.

La aplicación de la técnica ABC se realizó con un equipo comercial para primer anticuerpo de conejo (ZYMED Histostain-sp. Cat. No. 95-6543), con el sistema de streptoavidina-biotina-peroxidasa. Se realizaron los mismos ensayos que con la técnica PAP, probando las siguientes diluciones del primer anticuerpo: 1:1000, 1:5000 y 1:10000.

V. RESULTADOS

V.I. PARASITOS

V.I.1 Cultivo de parásitos.

Los parásitos cultivados "in vitro", se mantuvieron viables durante el tiempo de experimentación. Se notó claramente el cambio de estadio de epimastigote a tripomastigote metacíclico (Lámina I, figura 10), en cuanto a la forma y motilidad del organismo. Los epimastigotes se observaron gruesos y lentos y los tripomastigotes metacíclicos, delgados y muy activos.

V.I.2 Seguimiento del aislado en ratón.

Se detectó la presencia del parásito en frotis de sangre periférica de ratón a 250 y 400 aumentos (Lámina I, figura 11). Se notó una gran motilidad y forma alargada característica del tripomastigote sanguíneo, el cual resiste a la destrucción por activación de la vía alterna del complemento^(76,77).

Una vez comprobada la presencia del tripomastigote sanguíneo en las muestras de sangre periférica, se mantuvo la infección en ratón por inoculación intraperitoneal de 0.5 ml. de sangre infectada tomada por punción cardiaca de ratones chagásicos.

V.I.3 Parasitemia

Para construir la curva de parasitemia del aislado Ninoa de *T. cruzi*, se realizaron muestreos seriados de cuatro ratones a la vez y a diferentes tiempos, para después obtener la media de estos valores y poderlos graficar.

La Tabla 3 presenta los resultados que se obtuvieron por ratón infectado y muestreado a diferentes tiempos post-inóculo. Existen diferencias en el número de parásitos detectados en cada ratón a un mismo tiempo de muestreo. Estas diferencias indican que el parásito aislado se comporta de manera diferente a nivel individual, o que existen variaciones por cuestiones técnicas; sin embargo, el comportamiento que se observa a través del tiempo, también en forma individual, es semejante, pues aumenta el número de parásitos en cada ratón con respecto al tiempo post-inóculo hasta cierto nivel de parasitemia, presenta un decremento de aproximadamente la mitad y después decrece rápidamente hasta no detectarse parásitos circulantes. (Fig. 12)

En la Tabla 4 se resumen los datos que se obtuvieron en promedio del grupo de ratones que se describen arriba. Se observa que el número de parásitos se duplica progresivamente en cada tiempo post-inóculo analizado, hasta el día 20 aproximadamente; luego presenta un aumento mas lento hasta el día 27 post-inóculo; se duplican nuevamente y llegan a su máximo crecimiento al día 31 post-inóculo, para decrecer en un tercio de su número en el día 34 post-inóculo. Presentan una fase estacionaria de 4 días y cae la parasitemia rápidamente del día 41 al 48 post-inóculo. Sin embargo, al analizar el error estándar que presentan estos datos, se observa una gran dispersión de los mismos, sobre todo en el pico de parasitemia y en los días 38 y 41 post-inóculo. En este último, el error estándar es de casi 100,000 parásitos.

En la figura 13 se grafican los datos de la tabla 4. En esta figura se observa claramente la gran dispersión de datos que refleja el error estándar calculado para cada tiempo post-inóculo analizado. Se observa que el pico de parasitemia fluctúa entre 250 y 350 mil parásitos circulantes al mes post-inóculo en ratones NIH.

Tabla 3.- Parasitemia por Ratón.
(Parásitos por 10^4 /ml.)

Días Postinóculo	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4
7	2	2.5	2	0
11	2	2.5	2	3
14	2.5	6.25	2.5	10
17	4	10	6.25	15
20	6.25	10	7.5	21.2
24	6.25	8.75	11.2	22.5
27	18	21	13.5	16.5
31	21	27	27	45
34	18	18	18	26
38	30	10	21	24
41	16.5	4.5	43.5	3
45	4.5	1.5	16.5	4.5
48	0	0	4.5	0

Fig. 12.- Parasitemia por Ratón (NINOA).

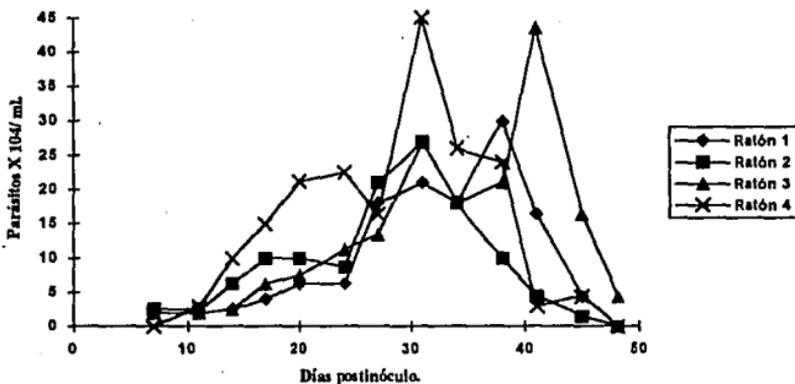
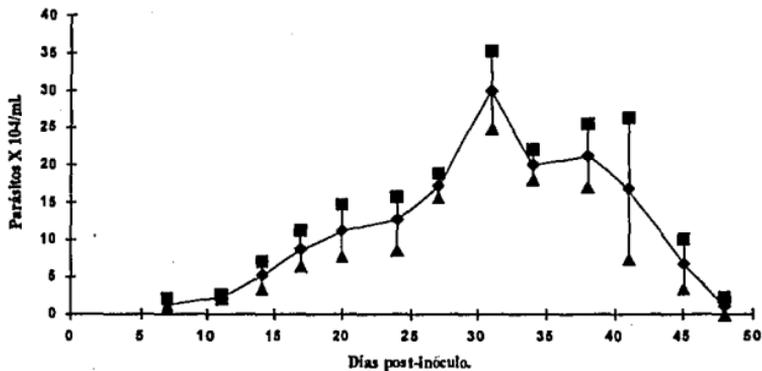


Tabla 4.- Parasitemia promedio.
(Parásitos por 10^4 /ml.)

Días postinóculo	Promedio \pm	E.S.
7	1.62	0.55
11	2.37	0.24
14	5.31	1.8
17	8.81	2.4
20	11.23	3.41
24	12.17	3.58
27	17.25	1.56
31	30	5.2
34	20	2
38	21.25	4.19
41	16.87	9.4
45	6.7	3.32
48	1.12	1.12

E.S. = Error estándar = $\frac{\text{Desviación estándar}}{\sqrt{\text{Número de ratones}}}$

Fig. 13.- Parasitemia Promedio (NINOA).



V.II.- OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-*T. cruzi*.

En la Figura 14 se observa la inmunoprecipitación del complejo Antígeno-anticuerpo por inmunodifusión doble hasta una dilución de 1:16 del anticuerpo purificado cuando éste se colocó en presencia del antígeno completo de *T. cruzi*.

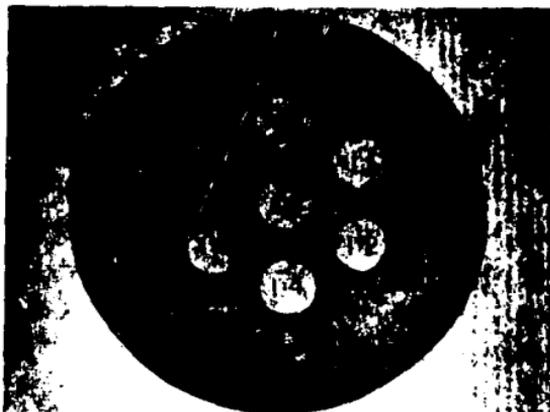


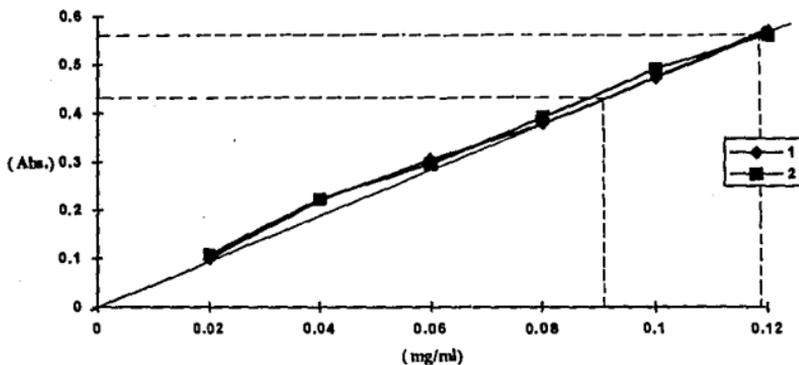
Fig. 14.- Inmunodifusión doble. Antígeno completo de *T. cruzi* en contacto con IgG de Conejo anti-*T. cruzi*.

Se obtuvieron dos fracciones de las eluciones hechas por columna cromatográfica con reactividad antigénica por inmunodifusión doble, las cuales se concentraron en una sola alícuota. Se hicieron dos diluciones (1:20 y 1:40) para cuantificar su concentración de proteínas por el método de Lowry (Tabla 5). Se obtuvieron, al extrapolar los datos, concentraciones de 0.119 mg/ml para la primera dilución y de 0.091 mg/ml para la segunda (Fig. 15).

Tabla 5.- Determinación de Proteínas a 740 nm.

[mg / ml]	Absorbancia	
	1	2
0.02	0.099	0.107
0.04	0.222	0.224
0.06	0.306	0.297
0.08	0.379	0.392
0.10	0.475	0.493
0.12	0.544	0.564
Dilución		
1:20	0.561	
1:40	0.429	

Fig. 15.- Determinación de proteínas a 740 nm.



V.III. HISTOLOGIA.

V.III.1 Microscopía de Luz.

Se realizó un análisis histológico del proceso inflamatorio provocado por la infección del parásito en los diferentes tejidos disecados, en donde se observó un comportamiento diferente para cada órgano analizado. Así pues, mientras que en músculo esquelético el número de células inflamatorias aumentó con respecto al tiempo y durante todo el tiempo de experimentación, en músculo cardíaco, la cinética inflamatoria presentó un pico al día 32 post-inóculo y disminuyó progresivamente a los 48 y 96 días post-inóculo (Tabla 6). Por otro lado, el infiltrado inflamatorio que se observó en músculo esquelético fue predominantemente intersticial difuso con focos perivasculares y de tipo mononuclear, mientras en músculo cardíaco predominaron sitios de inflamación focal e intersticial difuso, también de tipo mononuclear (Lámina I, figs. 16 y 17).

En cuanto a los hallazgos histológicos detectados en Bazo, se observaron cambios representados por hiperplasia de los folículos linfoides y aumento de las mitosis del centro germinal al día 32 post-inóculo (Lámina II, figura 18).

Al analizar las laminillas del Sistema Nervioso Central, no se encontraron anomalías o cambios que se relacionen con la presencia del parásito en éste órgano.

Se analizaron aproximadamente 20 laminillas por cada tiempo y por órgano disecado, cuantificando al menos 300 campos con objetivo de 40X y se presentaron los datos en promedio de células por 10 campos. Se trató de visualizar al parásito, ya sea formando nidos de amastigotes o como tripomastigote sanguíneo. Se detectó su presencia en músculo esquelético únicamente al día 32 y 96 post-inóculo formando un nido de amastigotes (Lámina II, figura 19).

Tabla 6.- Cinética de inflamación en diferentes órganos.

Órgano	CONTROL	Tiempo post-Inóculo			
		16	32	48	96
CORAZON	(5) Intersticial S / A	(28) Focal	(90) Difuso en parches Hipertrofia	(80) Focal Hipertrofia	(70) Focal intersticial
	(10)	(25)	(85)	(102)	(138)
MUSCULO ESQUELETICO ESTRIADO	Intersticial S / A	Intersticial difuso	Intersticial difuso. Focos peri- vasculares. Amastigotes	Intersticial difuso. Focos peri- vasculares.	Intersticial difuso. Amastigotes
BAZO	S / A	S / A	Hiperplasia centrogermi- nal. Aumento de mitosis.	Hiperplasia centrogermi- nal. Aumento de mitosis.	Hiperplasia folicular
CEREBRO	S / A	S / A	S / A	S / A	S / A

() = Células mononucleares por 10 campos en promedio. Se cuantificaron al menos 300 campos con objetivo 40X.

S / A = Sin alteraciones.

V.III.2 Inmunohistoquímica.

Durante la estandarización de la técnica inmunohistoquímica, se observó el control de bloqueo de la peroxidasa endógena en frotis sanguíneos, en los que se notó una coloración rojiza en los eritrocitos que no se bloquearon y en color azul los que fueron bloqueados con Peróxido de hidrógeno al 3% en metanol absoluto (Lámina II, figura 20).

Como controles negativos se usaron frotis de cultivos viejos de epimastigotes tratados con PBS y suero normal de conejo como primer anticuerpo. Se observaron los parásitos incoloros en ambos casos (Lámina II, figura 21); sin embargo, al usar el suero hiperinmune de conejo anti-*T. cruzi* en diluciones 1:40, 1:80 y 1:200 como primer

anticuerpo, se observó una excesiva coloración rojiza de los parásitos con las diluciones bajas, y una coloración rojiza uniforme y que delinea perfectamente al parásito con la dilución 1:200 (Lámina III, figura 22) y que se potencializó al usar el sistema Streptoavidina-biotina-peroxidasa (Lámina III, figura 23).

Al aplicar la técnica inmunohistoquímica potencializada con el sistema Streptoavidina-biotina-peroxidasa en los diferentes órganos disecados, se observó una reacción intensamente positiva en los folículos linfoides del Bazo a los 32 y 48 días post-inóculo (Lámina III, figura 24), y fue muy ligera a los 16 y 96 días post-inóculo.

Al revisar las laminillas que corresponden a músculo esquelético en los diferentes tiempos post-inóculo analizados, no se encontró positividad de la reacción que evidenciara al parásito o antígeno de éste en ningún tiempo; sin embargo, se observó reactividad positiva hacia fibras nerviosas y colágena del músculo esquelético de 96 días post-inóculo únicamente (Lámina III, figura 25).

En cuanto a las laminillas de Corazón y Cerebro que se revisaron, no se observó reacción positiva que indicara la presencia del parásito o antígeno del mismo.

V.IV. LAMINAS Y FIGURAS

Lámina I. Parásitos.

Fig. 10.- Epimastigotes (e) y tripomastigotes (t) en cultivo (Giemsa, 448X).

Fig. 11.- Tripomastigote sanguíneo (ts) en gota gruesa (Giemsa, 1,120X).

Histología.

Fig. 16.- Músculo esquelético, 32 días post-inóculo. A. Control negativo (H-E, 128X).B. Tejido infectado. Se observa un infiltrado mononuclear intersticial difuso (→)(H-E, 112X).

Fig. 17.- Músculo cardíaco, 32 días post-inóculo. A. Control Negativo (H-E, 204X).B. Se observa un infiltrado mononuclear intersticial difuso y perivascular (→) (H-E, 448X).

10

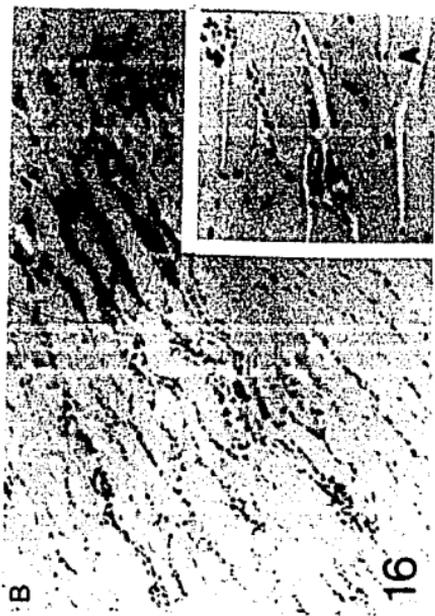


Lámina II. Histología

Fig. 18.- Bazo, 32 días post-inóculo. **A.** Control negativo (H-E, 32X).
B. Existe hiperplasia de folículos linfoides (fl) y aumento de las mitosis del centro germinal (H-E, 112X).

Fig. 19.- Músculo esquelético, 32 días post-inóculo. Se observa un nido de amastigotes (na) de *T. cruzi* perfectamente delimitado y algunas células inflamatorias en sus cercanías (H-E, 448X).

Inmunohistoquímica.

Fig. 20.- Control de bloqueo de peroxidasa endógena. Frotis sanguíneo en donde se observan eritrocitos incoloros y polimorfonucleares en color azul (ABC modificado, 448X).

Fig. 21.- Control negativo. Epimastigotes de *T. cruzi* tratados con PBS o suero normal de conejo como primer anticuerpo. (ABC modificado, 448X).

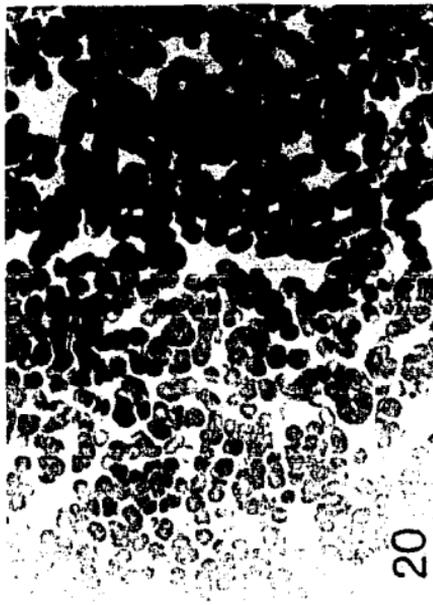


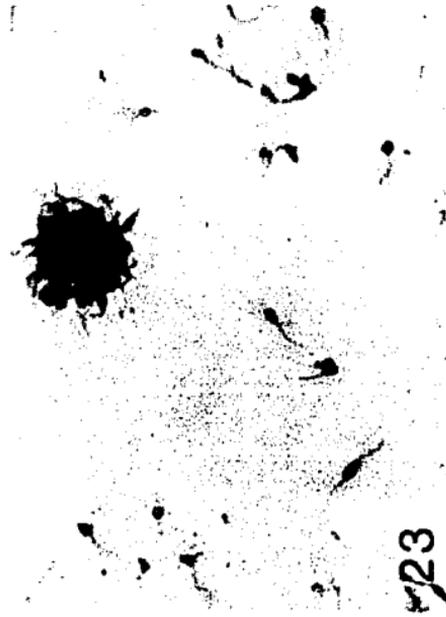
Lámina III. Inmunohistoquímica.

Fig. 22.- Control positivo. Epimastigotes de *T. cruzi* teñidos con el sistema PAP, dilución 1:200 de IgG de conejo anti-*T. cruzi* (448X).

Fig. 23.- Control positivo. Epimastigotes de *T. cruzi* evidenciados por el sistema ABC modificado (Dil 1:10,000 del primer anticuerpo, 448X).

Fig. 24.- Bazo de 32 días post-inóculo. A.- Control negativo (ABC modificado, 512X). B.- Se observa inmunorreacción en los folículos linfoides (Ω) denotando antígeno parasitario (ABC modificado, 1,112X).

Fig. 25.- Músculo esquelético, 96 días post-inóculo. Reacción positiva en fibras nerviosas y colágena (\rightarrow) (ABC modificada, 448X).



VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

El aislado de *T. cruzi* denominado NINOA, se obtuvo de un caso agudo de tripanosomiasis americana que se presentó en una niña del estado de Oaxaca en 1979. Dicho aislado, donado por el Dr. Máximo Cortés, se mantiene en el laboratorio por medio de pases en ratón y medios de cultivo como BHI, LIT, NNN y Nakamura desde 1987; además, se utiliza como fuente de antígeno en diferentes trabajos encaminados a estandarizar técnicas diagnósticas (21,78,79). En este caso, se observó el comportamiento de estos parásitos tanto en el laboratorio como a nivel de infección experimental. Así pues, este aislado se manejó con cierta facilidad en el laboratorio, pues tuvo un crecimiento rápido a nivel de epimastigote, produciendo un 10% de formas infectantes (tripomastigotes metacíclicos) en cultivos viejos (de tres semanas o más), los cuales se obtuvieron al eliminar a los epimastigotes del medio de cultivo por la adición de suero normal humano o de ratón, debido a que estos son susceptibles a lisis mediada por complemento por activación de la vía alterna⁽⁸⁰⁾. Por otro lado, la fase infectante de este parásito es de gran interés, pues aún no se conocen con exactitud los mecanismos de evasión de lisis que poseen y que les ayuda a sobrevivir en el organismo diseminándose e invadiendo cada vez un mayor número de células que utilizan para su anidación y reproducción. A este respecto, una de las aportaciones mas recientes fue hecha por Espinosa⁽⁴¹⁾ en la III Reunión Nacional de Chagas, en donde reportó que el aislado NINOA de *T. cruzi* presenta una actividad enzimática que abarca un amplio rango de pH a nivel proteasas que posiblemente le facilite la estancia en los diferentes microambientes o tejidos que parasite. Otras observaciones que se efectuaron por diversos autores al respecto, explican que el parásito posee proteínas asociadas a membrana que actúan como bloqueadoras de los sitios de anclaje que presenta C3b con el factor Bb por lo que se inhibe la activación de la vía alterna del complemento y, por consiguiente, la lisis del parásito^(76,77).

En cuanto a la infección de animales de laboratorio con dicho aislado, se observó que, en ratones NIH, existen diferencias en el número de tripomastigotes sanguíneos detectados por mililitro de sangre a un mismo tiempo postinóculo en diferentes ratones. Esto se atribuye a la cepa de animales de experimentación empleada, pues al no ser singénica, los individuos que la constituyen presentan diferencias a nivel genético entre sí, con lo cual también varía la susceptibilidad a la infección de ratón a ratón; sin embargo, este comportamiento también puede deberse a causas técnicas en el muestreo y cuantificación del parásito, al igual que al momento de hacer el inóculo, pues el concentrado de parásitos a inocular puede variar en número al aplicarlo con jeringa para insulina. Por otro lado, se observó un aumento gradual y constante de la parasitemia entre el día 7 y el 20 postinóculo, en el cual los parásitos se duplicaron hasta cierto nivel, aumentaron muy poco y del día 27 al 31 post-inóculo se duplicaron nuevamente y alcanzaron su mayor crecimiento. Decrecieron en un tercio de su número total, se mantuvieron por seis días y decrecieron rápidamente en siete días más. La curva de parasitemia que se obtuvo de este aislado, refleja el comportamiento inmunológico del ratón ante una infección. La parasitemia aumenta lentamente cuando no existe resistencia en contra del agente infeccioso; pero se empieza a inducir una respuesta inmune celular y humoral a medida que crece la infección. De esta manera, se empieza a detener poco a poco la infección hasta un nivel muy bajo no detectable por conteo de parásitos circulantes en sangre. Así pues, a nivel lote, el comportamiento de NINOA describió una curva de parasitemia poco prolongada y sin grandes picos, aunque con una gran dispersión de datos reflejada por el error estándar calculado para cada tiempo analizado. De lo anterior se desprende que la cepa de ratones NIH, no singénica, respondió de diferente manera a la infección provocada con este aislado. Dos ratones presentaron un máximo de parasitemia de alrededor de 400 mil parásitos circulantes, mientras que otros dos sólo de 300 mil. Por otro lado, dos ratones presentaron el pico de parasitemia alrededor del día 31 post-inóculo y los otros dos entre los días 38 y 41 post-inóculo. Sin embargo, el incremento de los parásitos fue pequeño y de manera uniforme con respecto

al tiempo, lo que se tradujo en una baja parasitemia y, aunado al tamaño de inóculo y a la nula mortalidad que se obtuvo, en una virulencia también baja; pues en comparación con cepas ya documentadas, el pico de parasitemia se encontró con aproximadamente 15 días de desfase y disminuido el número de formas sanguíneas comparándolo con las cifras obtenidas con cepas como la Y, Berenice o Peruviana que son muy virulentas(33).

Con base a lo anterior y analizando los resultados que se obtuvieron por microscopia de luz, se observó que este aislado induce un infiltrado linfocitario en fibras musculares preferentemente, lo cual indicó un tropismo que se inclina hacia músculo esquelético mas que al cardiaco, pues se observó una inflamación crónica intersticial y perivascular a los 16 días post-inóculo en músculo esquelético, es decir, en el primer tiempo analizado, mientras que en corazón se observó una miocarditis focal leve hasta el día 48 postinfección. En este sentido, y recordando los estudios realizados por Molina y Kierszenbaum(47), las células mononucleares fueron el tipo celular que prevaleció en las lesiones causadas por este parásito a tejido muscular aunque, a diferencia de estos autores que utilizaron un modelo animal y un aislado del parásito diferente, la cinética de inflamación fue diferente para ambos tipos de músculo. Aumentó con respecto al tiempo en músculo esquelético, presentó un pico a los 32 días postinóculo en músculo cardiaco y fue nula para Cerebro y no significativa para el análisis realizado en Bazo. Por otro lado, las características de la inflamación para músculo esquelético fueron predominantemente de tipo intersticial difuso con algunos focos perivasculares durante todo el tiempo de estudio, mientras que en músculo cardiaco se observó en forma focal y sólo en algunas áreas se notó un patrón intersticial difuso en el día 32 postinóculo, es decir, en el pico de parasitemia. Los cambios observados en Bazo fueron de tipo hiperplásico en los folículos linfoides y aumento de mitosis del centro germinal, mientras que en Cerebro no se evidenciaron cambios significativos que llamen la atención. Así pues, estas observaciones hacen pensar en la respuesta del organismo hacia la infección que presentó, sugiriendo que estas células mononucleares fueron las responsables de dirigir o iniciar una respuesta inmune contra el parásito y que, justo en el pico de parasitemia, existió una gran

actividad en Bazo al aumentarse el número de linfocitos T y B que ayudaron a disminuir la parasitemia ya generalizada en el ratón. Cabe mencionar aquí, que los neutrófilos y eosinófilos encontrados en los campos de observación analizados, no son significativos en comparación con el número de células mononucleares detectados en dichos tejidos, por lo que cabe la posibilidad de que su participación en el daño tisular sea escaso o nulo; sin embargo, esta apreciación no se puede sustentar con nuestros datos.

Un aspecto interesante de este trabajo es el hecho de implementar una técnica altamente específica y sensible para detectar a este parásito en particular, pues, aunque el uso de técnicas inmunohistoquímicas como la peroxidasa anti-peroxidasa se emplea en muchos países desarrollados desde hace ya un par de décadas, en este país, como en muchos otros, su uso es relativamente nuevo. Así pues, se debe hacer notar la importancia que revisten algunos puntos críticos en la realización de dicha técnica, como lo es el bloqueo adecuado de la actividad de peroxidasa endógena presente en los tejidos; debido a que un mal bloqueo se traduce en la obtención de resultados falsos positivos que generan confusiones. Los frotis sanguíneos se utilizaron como control de bloqueo de esta enzima, debido a que los eritrocitos son ricos en catalasa, notando una coloración rojiza al término del ensayo en los frotis que no se bloquearon y sin color en aquellos con bloqueo. También es de suma importancia el uso de un control positivo y negativo para valorar la técnica en su conjunto. Los frotis de cultivos viejos del parásito, en los que se encuentran mezclados epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos, se trataron con suero normal de conejo, amortiguador de pH de fosfatos salino y suero hiperinmune de conejo anti-*T. cruzi* como anticuerpo primario. En el primer caso, el usar suero normal de conejo aplicado a estas fases del parásito como control negativo, asegura que este suero no presenta algún componente que reaccione con el parásito e interfiera en los resultados; al emplear el amortiguador como primer ligando y obtener tinción negativa, se observa que los demás pasos de la técnica no se pegan inespecíficamente a estructuras del tejido y, por último, al utilizar un suero hiperinmune dirigido a localizar al parásito, se observa la especificidad del anticuerpo desarrollado en contra de este, además de la

sensibilidad de la técnica al emplear altas diluciones del primer anticuerpo y obtener resultados positivos sin tinción de fondo. Por otro lado, se optimiza el uso del anticuerpo al observar un patrón de tinción aceptable, que en este caso se distribuye a nivel de superficie de la membrana plasmática del parásito, con poca cantidad del mismo.

Después de probar los controles arriba mencionados y estandarizar la técnica en cuanto a concentración del anticuerpo, se aplicaron las técnicas de PAP y el complejo ABC modificado en cuanto al uso del conjugado avidina-peroxidasa por estreptoavidina-peroxidasa, debido a que con esta modificación se obtuvo un sistema amplificado con menor reacción de fondo. El resultado de ambas técnicas fue satisfactorio, pues se observó un patrón de tinción específico y el pegado de fondo fue casi nulo; sin embargo, al comparar ambas técnicas entre sí, se observaron grandes ventajas en el complejo ABC modificado, debido a que la dilución del anticuerpo óptima para la tinción se aumentó a 1:10,000 con este sistema y el pegado de fondo fue nulo, mientras que con la PAP se usó una dilución 1:200 y en algunos casos se observó tinción inespecífica de fondo. Estas diferencias se deben a la concentración del primer anticuerpo y al tipo de conjugado que se usó. El clásico PAP utiliza un conjugado que une a una molécula de peroxidasa con un anticuerpo dirigido a esta molécula y que, a su vez, porta otra molécula de peroxidasa que degrada el sustrato y produce la señal, es decir, se provoca una reacción a manera de emparedado pero que involucra sólo la acción de una molécula sobre el sustrato por sitio reconocido. Por otro lado, la avidina que se usa en el complejo ABC es extraída de huevo de gallina y presenta un punto isoelectrónico de 10 y, bajo condiciones fisiológicas, una carga positiva y un 7% de carbohidratos que presentan sitios de unión con lectina u otras proteínas que se encuentran en los tejidos, por lo cual, este sistema aventaja al PAP en cuanto a la extensión de la señal generada, pues la unión que se hace o el emparedado es de mayor tamaño al emplearse un segundo anticuerpo biotinado y un conjugado avidina-peroxidasa que es muy afín a la biotina, debido a las propiedades de la avidina, de tal suerte que el conjugado se pegará al anticuerpo biotinado por muy poca cantidad que exista de éste en la muestra tratada. Sin embargo, el sistema ABC empleado en este

trabajo, tuvo la modificación de usar el conjugado estreptoavidina-peroxidasa en lugar del descrito arriba. La ventaja obtenida radica en la estreptoavidina, que es una proteína aislada de *Streptomyces avidinii*, muy similar a la avidina, aunque su punto isoeléctrico es neutro y no presenta carbohidratos, tiene un peso de 60 Kd y consiste en cuatro subunidades idénticas con un sitio de unión para la biotina en cada una de ellas; lo cual resulta en una mayor sensibilidad, bajo pegado inespecífico por la falta de carbohidratos y una amplitud mayor en la señal generada en comparación con el ABC.

Debido a lo anterior, se usó el sistema ABC modificado para trabajar en estas muestras de investigación, obteniendo resultados positivos sólo en los folículos linfoides del bazo. Esta tinción se observó en todos los tiempos post-inóculo muestreados, marcando un gradiente ascendente de intensidad en la señal del día 16 al 48 post-inóculo y después desciende a los 96 días post-inóculo. Las observaciones hechas en los demás tejidos estudiados mostraron que sólo hubo reactividad hacia fibras nerviosas y colágena de músculo esquelético estriado de 96 días post-inóculo debido, tal vez, a algún tipo de reacción cruzada entre el anticuerpo y algún componente de éste tejido o a que en este tiempo post-inóculo, el daño generado por el parásito se empieza a extender a sistema nervioso, indicando con esta imagen una primera fase del daño neuromotor; aunque esta reacción es muy rara debido a que sólo se presentó en un tiempo de los cuatro analizados y el sistema nervioso central se encontró sin cambios aparentes, por lo cual no podemos concluir a cerca de esta observación. Por otro lado, en ningún tejido se evidenció al parásito con esta técnica, lo cual nos reafirma el hecho de que éste aislado presentó muy poca virulencia y, en función de lo observado en bazo, que el proceso inmune que desarrolló el ratón tuvo una mayor actividad en el pico de parasitemia y perduró la producción de la respuesta inmune hasta el día 48 post-inóculo con gran actividad, para decrecer con respecto al tiempo y a la cantidad de parásitos.

En cuanto al desarrollo y aplicación de esta técnica inmunohistoquímica, se concluye que su uso es una herramienta más en la caracterización de esta enfermedad al aplicarla no sólo en la búsqueda del parásito, sino también en la detección de células

inflamatorias para la caracterización del proceso de inflamación y, después, para una estimación más exacta de las células que intervienen en la misma, además de la consecuente caracterización del proceso infeccioso en los casos humanos una vez que se haya alcanzado una cuantificación confiable y extrapolable al humano. Por otro lado, esta técnica puede emplearse en aquellas necropsias sin diagnóstico final de muerte en las cuales existe la posibilidad de muerte por enfermedad de Chagas.

De lo anterior, y en lo que respecta a la caracterización del aislado NINOA de *Trypanosoma cruzi*, se concluyó lo siguiente:

- Este aislado presenta un crecimiento rápido a nivel epimastigote.
- En medios de cultivo BHI de tres semanas o más, se producen un 10% de tripomastigotes metacíclicos.
- Los ratones NIH responden de forma heterogénea a la infección con este aislado.
- La parasitemia que se presenta es baja de acuerdo al tamaño de inóculo empleado
- El pico de parasitemia se presenta entre el día 20 y 30 postinfección con un número que fluctúa entre 250 y 350 mil parásitos circulantes por mililitro de sangre.
- La mortalidad es nula y la virulencia baja.
- Las formas sanguíneas desarrolladas son gruesas o fornidas.
- El tropismo es hacia músculo esquelético preferentemente (Miotrópica).
- La inflamación es gradual, acorde a la parasitemia, y de tipo mononuclear difuso con algunos focos perivasculares para músculo esquelético.
- En cuanto a músculo cardíaco, la cinética de inflamación presenta un pico a los 32 días post-inóculo, es de tipo mononuclear y se presenta en forma focal.
- Los cambios observados en bazo son de tipo hiperplásico de los folículos linfoides
- A nivel cerebro, no hay alteraciones.
- Se estandariza una técnica inmunohistoquímica sensible y específica para la localización de este parásito o antígeno del mismo.
- La inmunohistoquímica revela tinción positiva y gradual en folículos linfoides de

bazo.

- Se observa tinción positiva en fibras nerviosas y colágena de músculo esquelético de 96 días post-inóculo debido a posible daño neuronal o a reacción cruzada.

En cuanto a la patogenicidad de la enfermedad vista al través de este trabajo, se realizan grandes esfuerzos a este nivel, construyendo y destruyendo hipótesis sobre el daño tisular causado en forma directa o indirecta por el parásito, aunque se deben unificar criterios de investigación para construir modelos adecuados que se acerquen a la realidad de la enfermedad; así mismo, los mecanismos de daño tisular por efecto del parásito, aún están en boga, por lo cual se debe ser más minucioso en este quehacer al controlar el mayor número de variables posible y emplear las técnicas de laboratorio más eficaces y confiables. Por otro lado, se recomienda usar ratones singénicos en este tipo de trabajos para tener modelos reproducibles y aceptables, además de inóculos más pequeños que representen mejor la infección del parásito hacia el mamífero, así como también un número mayor de ratones para poder analizarlos estadísticamente mejor. Así mismo, el desarrollo y aplicación de las diferentes técnicas de investigación, ya sean histoquímicas, enzimáticas, inmunológicas o de Biología molecular deben ser optimizados y mejorados cada vez, para tratar de visualizar los procesos de daño tisular que provocan diversos parásitos en el hombre y caracterizarlos, tomando en cuenta el mayor número de parámetros de expresión de la enfermedad, para tener un amplio panorama de esta y poderla atacar por diferentes sitios.

Por último, se sabe que la enfermedad de Chagas es un problema de salud pública que se desarrolla en mayor o menor proporción dependiendo, tanto de aspectos genéticos del huésped, del parásito, así como también de aspectos socio-culturales y económico-políticos que envuelven a las poblaciones. Así pues, debe notarse la importancia que esta enfermedad posee realizando más investigaciones sobre los diferentes aspectos que involucra este mal, para hacer un llamado de atención a las grandes organizaciones para la salud y orienten su apoyo al mejor conocimiento de esta enfermedad en nuestro país.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- CHAGAS C. 1909. Nova Tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1:159.
- 2.- ROMANA C. 1935. Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanosónica unilateral (Hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). MEPR. 22:16.
- 3.- HORARE C.A.1966. The classifications of mammalian Trypanosomes. Ergehn Microbiol. Imm. Exper. Therap. 39:43.
- 4.-KAGAN I.G. American Trypanosomiasis (Chagas' Disease). En: Immunological investigation of tropical parasitic disease. Houba V. Ed. Churchil Livingstone, London. 1980. pp. 49.
- 5.- ELKELES G. 1951. On the life cycle of the *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol. 37:379.
- 6.- PEREIRA J.B., Willcox H.P. y Coura, J.R. 1985. Morbidade da Doença de Chagas. III. Estudo longitudinal de seis anos em Virgem da Lapa, M.G.,Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 80:63.
- 7.- Panamerican Health Organisation. 1984. Status of Chagas Disease in the region of the Americas. Epidemiol. Bull. 5:5.

8.- T.D.R. News letter. 1982. Special programe for Research and Training in Tropical Disease. UNDP/WHO. 18:15.

9.- SCHUMINS G. A. En: Infection Immunity and Blood transfusion. Alan R. Ed. Liss Inc, New York. 1985. pp. 127.

10.- GOMEZ P. M. 1984. Características da mortalidade urbana por doença de Chagas, Distrito Federal, Brasil. Bol. Of. Sanit. Panam. 96:213.

11.- MAZZOTTI L. 1936. Investigación sobre la existencia de la enfermedad de Chagas en el País: Demostración de Tripanosomas en los reduvídeos transmisores. Medicina. México. 282:584.

12.- MAZZOTTI L. 1940. Dos casos de enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca. Gac. Med. México. 70:417.

13.- BIAGI F., Tay J., Guzmán C. y Fog F. 1964. Tetitlán, Guerrero. Foco endémico de la enfermedad de Chagas. Rev. Fac. Med. México. 6:625.

14.- TAY J., Salazar S.P.M., Bucio M.I., Zárate R. y Zárate L. 1980. La enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Sal. Púb. Méx. 22:409.

15.- GLOSS G., Barrera M. de R., Monteón V.M. y Reyes P.A. 1990. Tripanosomiasis Americana y Cardiopatía Chagásica Crónica en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Arch. Inst. Cardiol. Méx. 60:261.

16.- BELTRAN E. 1949. Hallazgo de *Schizotrypanum cruzi* en una rata *Rattus norvegicus* de la Ciudad de México. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 10:15.

- 17.- TAY J., Salazar S., Velasco M., Haro I., García-Yáñez y Gutierrez-Quiroz M. 1979. Estudio epidemiológico de la enfermedad de Chagas en el Estado de Jalisco, República Mexicana. Sal. Públ. Mex. 21:145.
- 18.- SALAZAR P.M., Jiménez J., Tay J. y Cárdenas L. 1978. Estudio comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas de *T. cruzi* en el ratón blanco. Rev. Lat-amer. Microbiol. 20:51.
- 19.- SALAZAR P.M., Tay J., Ontiveros A. y Jiménez J. 1983. Enfermedad de Chagas en México. Tema monográfico. Rev. Fac. Med. Méx. 1:11.
- 20.- GOLDSMITH R.S., Kagan G., Zárate R., Reyes G.M.A. y Cedeño F.J. 1973. El potencial de la transmisión en la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea. Hallazgos serológicos entre donadores en el Estado de Oaxaca. Rev. Sal. Púb. Méx. 4: 439.
- 21.- MONTEON V.M., Turrent L.C., Amador G.F. y Reyes P.A. 1987. Anticuerpos séricos a *T. cruzi* en donadores de sangre en la Ciudad de México. Bioquímica. 9:6.
- 22.- REYES P.A. 1978. Inmunología de la enfermedad de Chagas. Arch. Inst. Cardiol. Méx. 48:947.
- 23.- ANDRADE Z.A. y Andrade S.G. 1969. Estudio Inmunocitoquímico da doença de Chagas experimental. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 11:44.
- 24.- CROKER B. P. y Khun R. E. 1983. Immunohistochemical detection of *Trypanosoma cruzi* in tissues of mice with experimental chagas' disease. Histochem. 77: 195.

- 25.- BARBOSA A. J. 1985. Metodo imunocitoquímico para a identificação de amastigotas do *Trypanosoma cruzi* em cortes histológicos de rotina. Rev. Inst. Med. trop. Sao-Paulo. 27:293.
- 26.- FLINT J.E., Schecter M., Chapman M.D. y Miles M.A. 1984. Zymodeme and species specificities of monoclonal antibodies raised against *Trypanosoma cruzi*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78:193.
- 27.- BARBOSA A. J., Gobbi H., Lino B.T., Lages-silva E., Ramirez L.E., Teixeira V.P. y Almeida H.O. 1986. Estudo comparativo entre o método convencional e o método da Peroxidasa-antiperoxidasa na pesquisa do parasitismo tissular na cardiopatia chagásica crónica. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo. 28:91.
- 28.- MORALES M.C. y Milei J. 1987. Immunoperoxidase technique in experimental chronic chagasic myocarditis. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo. 29:67.
- 29.- ANDRADE V. Estudio Immunopatologico de camundongos de seis diferentes linhagens isogénicas à infecção por tres tipos de cepas do *Trypanosoma cruzi*, Tese de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil. 1984.
- 30.- MOREL C., Chiari E., Plessmann Camargo E., Mattei D.M., Romanha A. y Simpson L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterised by restriction endonuclease fingerprinting of Kinetoplast DNA minicircles. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:6810.

- 31.- DEANE M.P., Sousa M.A., Pereira N.M., Gonçalves A.M., Momen H. y Morel C.M. 1984. *Trypanosoma cruzi*: Inoculation schedules and reisolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zynodeme analyses. *J. Protozool.* 31:276.
- 32.- BRINGEL H., Machado A., Silveira L., Bertoni A. y Martinez M. 1991. Estudio comparativo de dos cepas de *Trypanosoma cruzi* de diferentes procedencias geográficas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 86:138.
- 33.- BRAGA E., La Fuente Tapia M., Galvao L., Machado G., Chairi E. y Martines M. 1991. Characterization of tissue culture derived Trypomastigotes of three clones isolated from the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz.* 86:139.
- 34.- RIBEIRO R., Beldan-Net F., Albusquerque S., Lopes R., Carraro A. y García T. 1991. A comparative study of the behavior of slender and broad blood forms of the Bolivia Strain at *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 86:138.
- 35.- STEINDEL M., Carralho P., Toma H., Grisard E., Ribeiro-Rodríguez R. y Romanha A. 1991. Isoenzyme characterization of selvatic *Trypanosoma cruzi* strains isolated from Arvoredo Island, Santa Catarina State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 86:141.
- 36.- FERNANDES A., Romanha A., Ribeira Rodriguez R., Steindel M., Guimaraes E. y Chairi E. 1991. Stability of isoenzyme patterns of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from Opossums (*Didelphis aliventris*) of Bambui, Country, Minas Gerais State. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 86:142.

37.- MANGIA R., Thomaz N. y Deane M. 1991. Studies of growt kinetics and zymodeme type in clones derived from an Opossum strain at *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 86:142.

38.- Memorias de la III Reunión Nacional de Chagas. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". México. 28 al 30 de Octubre de 1992.

39.- PEREZ R. R., Licón T.A. y Calvo M.L. *Trypanosoma cruzi*: Infectividad de tripomastigotes metacíclicos de triatomas y de cultivo. En: Memorias de la III Reunión Nacional de Chagas. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". México. 28 al 30 de Octubre de 1992.

40.- HERNANDEZ R. Aplicaciones de los genes para RNA ribosomal de *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico y clasificación del parásito. En: Memorias de la III Reunión Nacional de Chagas. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". México. 28 al 30 de Octubre de 1992.

41.- ESPINOSA N. y Espinoza B. Caracterización bioquímica de proteasas de epimastigotes de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. En: Memorias de la III Reunión Nacional de Chagas. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". México. 28 al 30 de Octubre de 1992.

42.- LOPEZ O. V., Ordaz M. J. y Espinoza B. Caracterización del fenómeno de metacicloogénesis en diferentes aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*. En: Memorias de la III Reunión Nacional de Chagas. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". México. 28 al 30 de Octubre de 1992.

- 43.- ROMAÑA C. Anatomía patológica, patogenia e inmunología. En: Enfermedad de Chagas. C. Romaña. Ed. López Libreros, Buenos Aires. 1963. pp. 97.
- 44.- ANDRADE Z.A. and Andrade S.G. Patología. En: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Z. Brener and Z.A. Andrade. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. 1979. pp. 199.
- 45.- ANDRADE Z.A. 1985. A patologia da doença de Chagas no homem. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 65:15.
- 46.- MOLINA H.A. Patología. En: La miocardiopatía Chagásica crónica, R. Storino and J Milei. Edit. Club de Estudio, Buenos Aires, Argentina. 1986. pp.57.
- 47.- FEDERICI E. E., Abelmann W.H. y Neva F.A. 1964. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 13:272.
- 48.- ANDRADE S.G. y Grimaud J.A. 1986. Chronic murine myocarditis due to *Trypanosoma cruzi*. An ultrastructural study and immunochemical characterization of cardiac interstitial matrix. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 81:29.
- 49.- BIJOUSKY T.A., Elizar M.V., Muller L.A., Katzin V.J. y González Cappa S.M. 1983. Chronic infection in mice with *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo. 25:207.
- 50.- MOLINA H.A. y Kierszenbaum F. 1987. A study of human myocardial tissue in Chagas' disease: Distribution and frequency of inflammatory cell types. Int. J. Parasitol. 17:520.

51.- MOLINA H.A. y Kierszenbaum F. 1988. Kinetics of development of inflammatory lesions in myocardial and skeletal muscle in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J. Parasitol. 74:370.

52.- VIANNA. 1911. Contribucao para estudio da anatomia da " Molestia de Carlos chagas". Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 3:276.

53.-KOBBERLE F. y Nador E. 1955. Etiologia e patogenia do megaesofago no Brasil. Rev. Paul. Med. 47:643.

54.- KOBBERLE F. Pathogenesis of Chagas Disease. En: Trypanosomiasis and Leshmaniasis with special reference to Chagas' disease. CIBA Foundation Symposium 20. Amsterdam, Elsevier. 1974. pp. 137.

55.-RIBEIRO DOS SANTOS R. y Hudson L. 1980. *Trypanosoma cruzi*: immunological consequences of parasite modification of host cell. Clin. Exp. Immunol. 40:36.

56.- RIBEIRO DOS SANTOS R. y Hudson L. 1980. *Trypanosoma cruzi*: Binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. Paras. Immunol. 2:1.

57.- RIBEIRO DOS SANTOS R. y Hudson L. 1981. Denervation and the immune response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Clin. Exp. Immunol. 44:349.

58.- ARAUJO F. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Expression of antigens on the membrane surfaced of parasitized cells. J. Immunol. 6:41.

59.- GONZALES S.M., Sannz O.P., Muller L.A., Molina H.A., Fernandez J., Rimoldi M.T. y Sica R.E. 1987. Peripheral nervous system damage in experimental Chronic Chagas disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 36:41.

- 60.- COSSIO P.M., Diez C., Szarfman A., Kreutzer E., Candiolo B. y Arana R.M. 1974. Chagasic cardiopathy: demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circ.* 49:13.
- 61.- COSSÍO P.M., Laguens R.P., Diez C., Szarfman A., Segal A. y Arana R.M. 1974. Chagasic cardiopathy: antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circ.* 50:1252.
- 62.- HUBSCH R., Sulzer J. y Kagan I. 1976. Evaluation of an autoimmune type antibody in the sera of patients with Chagas' disease. *J. Parasitol.* 62:523.
- 63.- KHOURY I., Diez C., Cossio P.M. y Arana R.M. 1983. Heterophil nature of EVI antibody in *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Immunol. Immunopath.* 27:283.
- 64.- BORDA J., Cossio P.M., De la Vega M. y Arana R. 1984. Circulating IgG in Chagas' disease wich binds to β adrenoreceptors of myocardium and modulates their activity. *Cli. Immunol.* 57:679.
- 65.- GATTASS C., Lima M., Nobrega A., Baranski M. y Dos Reis G. 1988. Do self-Heart-Reactive T Cells expand in *Trypanosoma cruzi* Immune Host?. *Inf. Immunol.* 56:1402.
- 66.- HOFF R. 1974. A method for counting and concentrating living *Trypanosoma cruzi* in blood lysed with Ammonium chloride. *J. Parasitol.* 60:527.
- 67.- COOPER T.G. The tools of Biochemistry. Edit. John Wiley and Sons. New York. 1977. pp. 342.

- 68.- AFCHAIN D., Fruit J., Yarzabal L. y Capron A. 1978. Purification of a specific antigen of *T. cruzi* from culture forms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27:478.
- 69.- VAITUKAITIS J., Robbins J.B., Nieschlag E. y Ross T.G. 1971. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol.* 33:988.
- 70.- OUCHTERLONY O. 1949. Antigen-antibody reaction in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 26:507.
- 71.- PETERSON A. Técnicas de laboratorio en Biología Molecular y Bioquímica. Intercambiadores celulósicos de iones. Edit El manual moderno. México. 1975. pp. 344.
- 72.- LOWRY O. H., Rosebrough V., Farr A. L. y Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- 73.- SHEEHAN D.C. y Hrapchak B. Theory and practice of Histotechnology. Edit. The C.V. Mosby Company. 2ª Ed. St. Louis, MO. 1980. pp. 481.
- 74.- STERNBERGER L.A., Hardy P.H. Jr., Cuculis J. y Meyer H.G. 1970. The unlabelled antibody-enzyme of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigens-antibody complex (horseradish peroxidase-anti-peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 18:315.
- 75.- HSU S.M., Raine L. y Fanger H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29:577.

76.- KRETTLI A. y Pontes de Carvalho L.C. 1985. Binding of C3 fragments to the *Trypanosoma cruzi* surface in the absence of specific antibodies and without activation of the complement cascade. Clin. Exp. Immunol. 62:270.

77.- KIPNIS T.L., David J., Alper C., Sher A. y Dias da Silva W. 1981. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* in to activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:602.

78.- MONTEON V. M., Nekrassov V., Zepeda A., Aranda A. y Reyes P.A. 1992. Interacción de una mezcla de epimastigotes y tripomastigotes de cultivo de un aislamiento mexicano de *Trypanosoma cruzi* con macrófagos murinos. Rev. Lat-amer. Microbiol. 34:43.

79.- RAMOS E. A., Monteón V. M. y Reyes P. A. 1993. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre. Rev. Sal. Pub. Méx. 35:56.

80.- NOGUEIRA N., Blanco C. y Cohn Z. 1975. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. J. Exp. Med. 142:224.

VIII. APENDICE

1.- Esterilización

Todo el material a esterilizar se lava perfectamente con una solución de Extrán líquido (MERCK Cat. 7555) al 5% y se enjuaga con agua corriente y después con agua bidestilada. Se seca en un horno a 100°C.

Se preparan pipetas Pasteur de 5 3/4" colocando algodón en su boquilla y se colocan en pipeteros de acero inoxidable o en frascos limpios con tapa de rosca. De la misma forma se preparan pipetas serológicas de 2, 5 y 10 ml.

Se usan matraces Erlenmayer de 250 ml. con 50 ml. de medio de cultivo BHI y otros con 150 ml. de solución salina al 0.85% pH= 7, los cuales se tapan con tapón de rosca o algodón con sombrero de papel de estrasa y se les adhiere un trozo de cinta testigo.

Todo el material se esteriliza a 15 lbs. de presión durante 15 minutos y enfriamiento lento.

Una vez esterilizado el material y el medio de cultivo, se procede a vertir, en campana de flujo laminar y condiciones de asepsia, 50 ml. de solución salina estéril y 10 ml. de Suero Fetal Bovino estéril por cada matraz con BHI.

Se coloca un matraz de medio de cultivo así preparado en una estufa de incubación a 37°C por 24 hrs. para prueba de esterilidad.

2.- Cultivos

Los cultivos se revisan cada diez días en campana de flujo laminar y condiciones de asepsia. Se toma una muestra de cada cultivo con pipeta Pasteur estéril para transferirla a un medio de cultivo nuevo y colocar una gota de dicha muestra en un portaobjetos limpio para su observación al microscopio óptico con objetivo de 40X. El medio de cultivo debe agitarse levemente antes de tomar la muestra para homogenizar el cultivo y ésta sea representativa para poder caracterizar a dicho cultivo observando viabilidad y estadio del parásito, así como también la asepsia del cultivo.

Todo el material de vidrio que se utiliza, debe desinfectarse con una solución saturada de Fenol para su posterior limpieza y esterilización; así como también deben desinfectarse con Benzal los aparatos e instrumentos que se manipulen durante el pase a medios de cultivo nuevos de este parásito.

3.- Cuantificación de parásitos(66).

Diluir una muestra de sangre periférica de ratón infectado con una solución de sulfato de amonio-heparina en proporción 1:5 con pipeta para conteo de leucocitos. El sulfato de amonio lisa eritrocitos, para tener una mayor visibilidad de los parásitos; y la heparina, es un anticoagulante que nos ayuda a mantener líquida la muestra.

Se mezcla bien la dilución anterior y se deshechan las primeras 3 gotas de esta solución para colocar la siguiente gota en el recuadro de conteo del hemocitómetro. Se cubre la muestra con su cubreobjetos y se procede a contar el número de parásitos por cuadrante en un microscopio óptico con objetivo de 40X.

Para calcular el número de parásitos por mililitro de sangre que presenta el ratón en ese momento, se usa la siguiente fórmula:

$$\text{No. de células} = \frac{(\text{Células contadas})(\text{Volumen})(\text{Dilución})}{\text{No. de cuadrantes usados para contar}}$$

En donde:

Volúmen = 1

Dilución = 5

4.- Inmunodifusión doble(70).

Ouchterlony (1949) y Elek (1948), desarrollan simultáneamente éste método, el cual consiste en la inmunoprecipitación del complejo Antígeno-anticuerpo cuando éstos se colocan en un gel de agarosa y difunden hasta un punto de equivalencia. La técnica se realiza como sigue:

- a) Preparación de Agarosa al 0.4% en Amortiguador de fosfatos salino (PBS) 0.1M pH=7.2 y azida de sodio 0.01% en baño maría.
- b) Colocar 5 ml. de agarosa caliente en cajas de petri de 5 cm. de diámetro en mesa nivelada. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- c) Colocar a 4°C por 30 minutos.
- d) Hacer los pozos en hexágono y al centro de la placa de agar.
- e) Colocar 100µl de antígeno en el pozo del centro y 100µl de cada dilución del anticuerpo a probar en los demás pozos.
- f) Dejar difundir a temperatura ambiente por 72 hrs.
- g) Leer con luz directa y fondo oscuro a 24, 48 y 72 hrs.
- h) Lavar con citrato de sodio 0.17 M y leer nuevamente.

5.- Precipitación de proteínas con Sulfato de Amonio saturado(67).

Esta técnica se basa en la captura de las moléculas de agua que contiene a la solución protéica, por medio de las moléculas de sulfato de amonio que se agregan, de tal forma que en un momento dado, la cantidad de agua presente no es suficiente para mantener en solución a las moléculas protéicas y estas se precipitan. La técnica se realiza como sigue:

a) Se toman 6.5 ml de suero de conejo anti-*T. cruzi* y se le agregan 3.2 ml de solución saturada de sulfato de amonio en PBS 0.01M pH= 8.0 (SSSA-PBS) para que ésta última quede al 33% del volumen final.

La SSSA-PBS se agrega gota a gota, con agitación lenta y constante, en cama de hielo, para evitar desnaturalización de proteínas.

b) Incubar 30 minutos con agitación constante a 4°C.

c) Centrifugar a 3000 g por 20 min. a 4°C.

d) Resuspender el botón en 3.25 ml de solución salina al 0.85% (50% del volumen inicial de suero).

e) Precipitar nuevamente con 1.6 ml de SSSA-PBS de la misma forma.

f) Repetir los pasos b) al e)

g) Incubar 30 min. con agitación constante a 4°C.

h) Centrifugar a 3000 g por 20 min.

i) Resuspender el botón en 1.6 ml de sol. salina 0.85%

j) Dializar contra PBS toda la noche a 4°C.

k) Realizar prueba para sulfatos con cloruro de bario para determinar el fin de la diálisis.

6.- Cromatografía en columna por intercambio iónico(71).

Esta técnica se basa en el intercambio reversible de iones en solución, con iones electrostáticamente unidos a una matriz o medio de soporte insoluble como polímeros de dextrana, poli(acrilamida) o derivados cargados.

En este caso, se usa DE-52 Celulosa como matriz para purificar el anticuerpo anti-*T. cruzi* (IgG, principalmente) que, por tener menor carga negativa neta, se eluye primero, quedando atrapada la albúmina e IgM en la matriz.

El DE-52 se prepara con 9 partes de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH= 8 más una parte de NaCl 3 M. Se mezclan 50 g del gel con 3 volúmenes del amortiguador anterior con agitación constante, a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se equilibra como sigue:

- a) Medir pH, eliminar sobrenadante y lavar con el mismo amortiguador hasta que se alcance un pH= 8.
- b) En una columna de 15 cm., colocar fibra de vidrio en su fondo y agregar el gel equilibrado hasta la altura deseada. Dejarla asentar.
- c) Eluir el sobrenadante y agregar PBS 0.01 M pH= 8 hasta equilibrar molaridad.
- d) Deshechar sobrenadante y colocar la muestra previamente equilibrada con el mismo amortiguador.
- e) Conectar la columna a un colector de fracciones y eluir la muestra con PBS 0.01 M pH= 8.
- f) La IgG se obtiene en las primeras fracciones.

7.- Cuantificación de proteínas(72).

Se detecta la mayor concentración de proteínas por el método U.V. 280nm en las diferentes fracciones obtenidas de la columna de intercambio iónico. Se leen en un espectrofotómetro hasta una lectura de 0.2 unidades de absorbancia. Las alícuotas que contienen mas proteína se juntan para cuantificar su concentración por el método de Lowry, empleando el reactivo de Folín ciocalteu. Este método se basa en la formación de un complejo colorido entre los enlaces peptídicos y el ión cúprico en solución alcalina y la reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por el complejo tirosina-triptófano. Su sensibilidad es de 0.005-0.2 mg de proteína y se aplica como sigue:

Reactivos:

Solución A:

Tartato de Sodio al 2%	0.1 ml
Sulfato de Cobre al 1%	0.1 ml
Carbonato de Sodio al 2% en	
Hidróxido de Sodio 0.1N	10 ml

Solución B:

Reactivo de Folín.

Solución C:

Albúmina sérica bovina 0.2 mg/ml	100 ml
----------------------------------	--------

Técnica:

- Hacer una curva de calibración con diferentes concentraciones de albúmina (de 0.02 a 0.12 mg/ml de proteína), colocando 0.1ml de solución C en el 1^{er} tubo, 0.2ml en el segundo, etc., hasta 0.6 ml. en el último.
- Tomar 0.9 ml de solución salina (blanco) y de las muestras a medir.
- Colocar 0.8ml de solución salina en el 1^{er} tubo de ensaye, 0.7ml en otro y así en forma decreciente hasta 0.3 ml en el tubo seis.

- d) Agregar 2 ml de solución A a todos los tubos, mezclar bien e incubar 5 min. a temperatura ambiente.
- e) Agregar 0.1 ml de solución B a todos los tubos, mezclando de inmediato e incubar 30 min a temperatura ambiente.
- f) Leer a 740nm con espectrofotómetro Shimadzu CL720 V-3.
- g) Graficar la curva de concentración y extrapolar lecturas de las muestras problema.

8.- Técnica Histológica(73).

Esta técnica se basa en la preservación estructural de los tejidos, corte delgado y tinción de los mismos para su posterior análisis morfológico por microscopía de luz en campo claro, valiéndose de la deshidratación de muestras representativas del tejido y su inclusión en bloques de parafina que permite seccionarlos en delgadas rebanadas de 4µm.

Los diferentes órganos de ratón disecados se fijan en formol al 10% durante 24 hrs. Posteriormente, se deshidratan los tejidos con diferentes concentraciones de etanol (50%, 70%, 80%, 96% y absoluto) por media hora en cada solución; después se infiltran con Xileno por 4 hrs. divididas en dos cambios para que, finalmente, se embeban en parafina con punto de fusión de 57°C durante 2 cambios de 2 horas cada uno y queden preparados para su inclusión en bloques de parafina de las mismas características anteriores. Los bloques así obtenidos se seccionan a 4 µm de espesor con un Micrótopo Reichter-Jung 820. Las secciones se corrigen en baño de flotación a 55°C con adición de gelatina bacteriológica al 0.1% y se capturan con portaobjetos, colocando dos secciones por laminilla, para posteriormente teñirlas con la técnica de Hematoxilina-Eosina que abajo se describe.

Técnica de H&E

- 1.- Desparafinar los cortes a 60°C por 10 minutos.
- 2.- Remover la parafina con xileno. 2 cambios de 3 min. c/u.
- 3.- Remover el xileno con alcoholes graduados (2 cambios de 3min. en c/u).
 - a) Etanol absoluto.
 - b) Etanol al 96%
 - c) Etanol al 70%
- 4.- Hidratar con agua corriente por 3 min.
- 5.- Teñir con Hematoxilina de Harris 4 min.
- 6.- Enjuagar con agua corriente (2 a 3 baños).
- 7.- Decolorar levemente con alcohol ácido (HCl al 1% en etanol al 70%).
- 8.- Enjuagar con agua corriente (2 o 3 baños).
- 9.- Virar coloración con Carbonato de litio saturado (acuoso).
- 10.-Enjuagar con agua corriente (2 a 3 baños).
- 11.-Etanol al 96% por 2 min.
- 12.-Teñir con Eosina por 3 min.
- 13.-Deshidratar en etanol al 96% (2 cambios de 1 min. c/u).
- 14.-Deshidratar en etanol Absoluto (2 cambios de 1 min. c/u).
- 15.-Aclarar en Xileno (2 cambios de 1 min. c/u).
- 16.-Montar con resina sintética.

Esta técnica permite tener un amplio panorama de la estructura tisular debido a que es una técnica general que tiñe los núcleos de las células en color azul o morado y el citoplasma en color rosa, dando un amplio panorama del tejido.

9.- Técnica Inmunohistoquímica.

Esta técnica se basa en la reacción antígeno-anticuerpo desarrollada en el tejido y evidenciada al conjugar un anticuerpo específico con cierto tipo de moléculas que desarrollen color como lo son la peroxidasa, fosfatasa alcalina o el llamado FITC (Isotiocianato de Fluoresceína), cuando son activadas por algún mecanismo ajeno a la primer reacción (reacción enzima-sustrato, en los primeros casos, y excitación por luz ultravioleta en el último)

La técnica de Inmunoperoxidasa(74) consiste en obtener secciones de 4 μm de espesor de tejido fresco (diferentes órganos de ratón cortados por congelación en Criostato, Crio-cut de American Optical Co., a -20°C), fijadas en laminillas (tratadas con metasilicato de sodio al 2.5%) por calor a 25°C ; posteriormente, la técnica se realiza de la siguiente manera:

- a) Bloqueo de Peroxidasa endógena con Peróxido de hidrógeno al 3% en Metanol absoluto por 10 min.
- b) Lavar con PBS 0.01 M pH= 7.2. Tres lavados de 3 min. c/u. (3X3')
- c) Bloquear sitios de pegado non-específico con Suero de ratón No-inmune al 10% en PBS por 10 min..
- d) Lavar con PBS 3X3'.
- e) Incubar a 37°C con el primer anticuerpo (Suero hiperinmune de conejo-anti-*T. cruzi* diluido 1:200 con PBS) por 30 min..
- f) Lavar con PBS 3X5'.
- g) Incubar a 37°C con el segundo anticuerpo (Suero de cabra anti-conejo) conjugado con peroxidasa.
- h) Lavar con PBS 3 X 5'.
- i) Incubar 5' a 37°C con el cromógeno (Aminoetil-carbazol).

- j) Lavar con PBS 3 X 3'.
- k) Contrastar con Hematoxilina de Harris 5'.
- l) Lavar con agua destilada 3 X 3'.
- m) Montar con Glicerol-veronal y sellar el cubreobjetos con barniz transparente.

Esta técnica se potencializa usando el sistema Streptavidina-biotina(75) acoplado al anticuerpo secundario y un conjugado con peroxidasa. Se utiliza una dilución 1:10,000 del primer anticuerpo, para después tratar a los tejidos con un segundo anticuerpo **biotinado** y posteriormente agregar el conjugado **Streptavidina-peroxidasa**. La reacción enzima-sustrato se realiza agregando 3-3' Diaminobenzidina, 4-Cloronaftol o Aminoetil-carbazol a dicha reacción como cromógeno. Finalmente se contrasta el tejido con hematoxilina de Harris.

El medio de montaje es muy importante, pues su uso depende del cromógeno empleado para evidenciar la reacción. Así pues, si se emplea 3-3' Diaminobenzidina como cromógeno, se usa resina sintética para montar la laminilla, lo cual tiene la ventaja de preservar la reacción por largo tiempo debido al hermetismo que esta ofrece; sin embargo, al usar los dos restantes cromógenos en la reacción, se deben emplear medios líquidos para montaje, como el glicerol, gelatina, agua, glicerol-veronal, etc. debido a que éstos son solubles en solventes orgánicos como el Tolueno o Xileno en los cuales se diluye la resina sintética.

DIAGRAMA DE FLUJO
(Técnica ABC modificada)

TEJIDO FRESCO

(Cortes por congelación a 4 μ m)

⌘

SOLUCION BLOQUEADORA

(H₂O₂ al 3% en Metanol absoluto por 10 min.)

⌘

LAVADOS

(3 de 3 min. C_U con PBS 10mM pH= 7.2)

⌘

SOLUCION DE SUERO BLOQUEADOR

(Suero no-inmune de Ratón al 10% en PBS por 10 min.)

⌘

PRIMER ANTICUERPO

(IgG de Conejo anti-T. cruzi 1:10,000 en PBS por 30 min.)

⌘

LAVADOS

(5 por 3 min. C_U)

⌘

SEGUNDO ANTICUERPO BIOTINADO

(IgG de Cebra anti-IgG de conejo-biotina por 10 min.)

⌘

LAVADOS

(5 por 3 min. C_U)

⌘

CONJUGADO ENZIMATICO

(Streptoavidina-peroxidasa por 5 min.)

⌘

LAVADOS

(5 por 3 min. C_U)

⌘

MEZCLA CROMOGENO SUSTRATO

(Aminocil-carbazol por 5 min. a 37°C)

⌘

LAVADOS

(3 por 3 min. C_U con H₂O destilada)

⌘

CONTRASTE

(Hematoxilina de Harris por 3 min.)

⌘

LAVADOS

(2 por 3 min. C_U con agua corriente)

⌘

MONTAJE

(Solución acuosa de Glicerol-polivinil-alcohol)

⌘

OBSERVACION

(Microscopio de campo claro)