

138
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA
PROTEINA ANTIGENICA DE LA CEP A NINOA DE
Trypanosoma cruzi

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

NORMA ISABEL PANTOJA REYES



MEXICO, D. F.

1994



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) NORMA ISABEL PANTOJA REYES.

con número de cuenta 8036085-4 con el Título:

"PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA PROTEINA ANTIGENICA DE LA CEPA NINOA DE Trypanosoma cruzi."

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGA

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
	DRA. BERTHA JOSEFINA	ESPINOZA GUTIERREZ.	
Director de Tesi	OFB. FERNANDO RAMOS	REYES.	
	BIOL. CARLOS A. CASTILLO	POMPEYO.	
	BIOL. LOURDES TERESA	AGREDANO MORENO.	
Suplente	M. EN C. MA. ESTHER	MARTINEZ MURILLO.	
Suplente			

Esta investigación fue realizada bajo la asesoría de la Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM), por haberme otorgado una beca para la elaboración del presente trabajo. La investigación formó parte del proyecto: "Caracterización Molecular de Aislados Mexicanos de Trypanosoma cruzi". Clave IN 205692.

DEDICATORIA

**A LA QUE SIEMPRE ESTA ESPERANDO.
MI HERMANO, LE DICE "JEFA".
YO LE DIGO, "DOÑA MARIA".
Y ES MI MAMA.**

**AL QUE YA NO SE ENCUENTRA,
EL QUE A TODOS MIS HERMANOS Y A MI,
NOS TRANSMITIO SU PACIENCIA Y FORTALEZA,
A MI PADRE.**

Y A TODOS MIS HERMANOS.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez, por haber trabajado en su laboratorio, así como también por ser mi asesora principal y directora de este trabajo.

Agradezco a todos los que contribuyeron a la realización de este trabajo de Tesis: Norma Espinosa Sánchez, Enrique (Dibujante), José Aviles (Fotografo).

A todos mis cuates: del laboratorio, a la banda y a todos los demás que son y no son de la facultad.

Y a todos los que no menciono.

RESUMEN	1
I. INTRODUCCION.	2
I.1 BIOLOGIA DE <u>Trypanosoma cruzi</u>.	2
I.1.A Características generales.	
I.1.B Clasificación.	3
I.1.C Ciclo de vida.	
I.1.D Heterogeneidad de las cepas de <u>T. cruzi</u> .	5
I.2 LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	5
I.2.A Generalidades de la enfermedad de Chagas.	
I.2.B Patología de la Enfermedad.	6
I.2.B.a <u>Entrada del parásito.</u>	
I.2.B.b <u>Fase aguda</u>	7
I.2.B.c <u>Fase indeterminada.</u>	8
I.2.B.d <u>Fase crónica.</u>	8
I.2.C Vías de transmisión.	8
I.3 LA ENFERMEDAD EN MEXICO.	9
I.4 INMUNOLOGIA DE LA RELACION PARASITO-HOSPEDERO.	11
I.4.A Respuesta inmune al parásito.	
I.4.B Respuesta inmune celular y humoral en la fase aguda.	
I.4.C Respuesta inmune celular y humoral en la fase indeterminada.	13
I.4.D Respuesta inmune celular y humoral en la fase crónica.	
I.5 ANTIGENOS DE <u>Trypanosoma cruzi</u>.	14
I.5.A Antígenos de membrana.	
I.5.B Antígenos de secreción.	26
I.5.C Antígenos de reacción cruzada y autoanticuerpos.	29
I.5.D Antígenos candidatos para el diagnóstico.	30
II.1 JUSTIFICACION.	32
II.2 OBJETIVOS.	34
II.2.A Objetivo general.	
II.2.B Objetivos particulares.	
III. MATERIAL Y METODO.	35
III.1 CULTIVO DE PARASITOS.	35
III.2 PREPARACION DE EXTRACTOS.	35
III.2.A Extracto soluble	

III.2.B Extracto total	36
III.3 CUANTIFICACION DE PROTEINAS.	36
III.4 ANALISIS DE PROTEINAS	
III.5 PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES	37
III.6 PRUEBA DE ELISA.	38
III.7 INMUNOTRANSFERENCIA A PAPEL DE NITROCELULOSA.	38
III.8 PURIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI NINOA	39
III.8.A Precipitación de anticuerpos.	
III.8.B Purificación de IgG por sepharosa-proteína A.	40
III.8.C Reactividad del anticuerpo purificado.	
III.9 INMUNOABSORVENTE.	41
III.9.A Acoplamiento de IgG anti <u>I. cruzi</u> .	
III.9.B Cromatografía de afinidad.	42
III.10 ELECTROELUSION.	42
III.11 GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES REDUCTORAS.	43
III.12 GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NO REDUCTORAS.	44
III.13 REACCION DE SHIF-PAS.	44
III.14 DETECCION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.	45
III.15 DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI AG 65/60.	45
III.16 PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTI ANTIGENO 65/60 kDA.	46
III.17 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.	46
IV. RESULTADOS	49
IV.1 CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA INMUNE EN CONEJOS.	49
IV.1.A Identificación de proteínas constitutivas.	49
IV.1.B Análisis antigénico.	50
IV.2 CONSTRUCCION DEL INMUNOABSORVENTE.	54
IV.2.A Purificación de IgGs anti Ninoa.	54
IV.2.B Análisis de IgGs purificadas	54

IV.2.C Columna de cromatografía de afinidad.	57
IV.3 PURIFICACION DEL ANTIGENO NINOA 65/60 (Ag Ni 65/60).	58
IV.3.A Purificación de los antígenos de la cepa Ninoa.	58
IV.3.B Análisis de los AgsNi en geles de poliacrilamida.	58
IV.3.C Electroelusión y análisis del Ag Ni 65/60.	62
IV.4 CARACTERIZACION DEL ANTIGENO NI 65/60.	62
IV.4.A Reactividad de los anticuerpos murinos.	68
IV.4.B Localización del antígeno Ni 65/60 en el parásito.	69
IV.5 RECONOCIMIENTO POR SUEROS HUMANOS DEL ANTIGENO Ni 65/60.	74
IV.5.A Por sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas.	74
IV.5.B Por sueros de enfermos con otras parasitosis.	74
V.1 DISCUSION.	79
V.2 CONCLUSIONES.	86
BIBLIOGRAFIA	88
ANEXOS	109
Anexo I.	109
Anexo II.	112
Anexo III.	114
Anexo IV.	116

RESUMEN

En la enfermedad de Chagas se encuentran involucradas una variedad de moléculas antigénicas que participan en los procesos de entrada del parásito a las células, su diseminación a los tejidos o la formación de anticuerpos protectores. En este trabajo de investigación se identificó y purificó un antígeno de la cepa Nino T. cruzi. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad, utilizando un anticuerpo policlonal producido en conejo. En un segundo paso de purificación se electroeluyó el antígeno correspondiente a los 65/60 kDa. Se determinó su peso molecular en electroforesis con geles de poliacrilamida en condiciones reductoras mostrando un doblete de peso molecular de 65/60 y en condiciones no reductoras se encontró un peso molecular aproximado de 120 kDa. La proteína fue positiva a la reacción de Schiff-Pas, sugiriendo que se trata de una glucoproteína. Con la prueba de inmunofluorescencia con anticuerpos policlonales murinos contra el antígeno Ni 65/60, se localizó el antígeno en el interior del parásito, posiblemente en el cinetoplasto. Al enfrentar el antígeno Ni 65/60 kDa, a sueros de enfermos chagásicos crónicos, con la prueba de Western Blot se encontró que seis de ocho sueros analizados lo reconocieron. Así mismo, el antígeno fue reconocido por sueros de pacientes con leishmaniasis en sus dos formas. Dado los resultados anteriores el antígeno purificado podría ser usado en la inmunoprolifaxis contra ambos parásitos.

I. INTRODUCCION

I.1 BIOLOGIA DE Trypanosoma cruzi.

I.1.A Características generales.

Trypanosoma cruzi, es un parásito hemoflagelado que pertenece a la familia Tripanosomatidae, tienen un ciclo de vida complejo que involucra varios estadios en diferentes hospederos: un invertebrado (insecto), y un vertebrado preferentemente un mamífero, la fase infectiva del parásito vive en el intestino posterior del vector o en la sangre y tejidos del mamífero (Cox, 1987). Todos los organismos que pertenecen a la familia tienen un solo núcleo, un flagelo que se origina del cinetosoma y que le sirve para impulsarse y una membrana ondulante que surge del paquete flagelar. El blefaroplasto es una estructura que tiene DNA mitocondrial y es característica del orden Kinetoplastida al que pertenece este parásito. Sólo se presenta una mitocondria de gran tamaño con DNA en forma fibrilar que corre de la parte anterior a la posterior y un sistema de microtúbulos peliculares (Schmidt y Roberts, 1989; Pereira, 1990).

I.1.B Clasificación (Levine y col., 1980)

Reino Protista

Subreino Protozoa.

Phylum Sarcomastigophora.

Clase Zoomastigophorea.

Orden Kinetoplastida.

Suborden Trypanosomatina.

Familia Trypanosomatidae.

Género Trypanosoma.

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi.

I.1.C Ciclo de vida.

En el ciclo de vida se incluye la descripción de los tres estadios generales de el parásito. Los tripomastigotes tienen un tamaño de alrededor de $20\mu\text{m}$ de largo y $2\mu\text{m}$ de ancho y el cinetoplasto localizado posterior a el núcleo, este estadio se encuentra en los tejidos de los mamíferos y en sangre en circulación, en la chinche se localizan en la parte posterior del Intestino; este estadio es la fase infectiva en el ciclo de vida. Los amastigotes son formas esferoides con un flagelo muy corto (Pereira, 1990) y se localizan dentro de las células en donde se replican. El epimastigote tiene el cinetoplasto localizado anterior y muy cercano al núcleo, el organismo es fusiforme de 15 a $20\mu\text{m}$ de largo, este estadio se localiza en la parte anterior y media del Intestino del insecto, los epimastigotes se reproducen por fisión binaria y mantienen la infección en los triatóminos (Nobla y col., 1989). El ciclo de

vida comienza cuando el insecto que es portador de *T. cruzi*, pica a un mamífero para alimentarse y defeca (el parásito está contenido en las heces del insecto); no todos los triatóminos defecan al mismo tiempo que se alimentan, en el caso de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans* lo hacen poco después de alimentarse, siendo así los vectores más importantes en la transmisión del protozoario. En el caso de *T. recurva*, *Paratriatoma hirsuta* y *T. dimidiata* lo hacen mucho tiempo después de que se alimentan, lo que los hace malos transmisores de la infección (Velasco-Castrejón y col., 1991). La infección se lleva a cabo por la acción abrasiva del mismo hospedero, los parásitos son llevados hacia mucosas oculares, nariz, boca, cortadas y al orificio hecho por la chinche al picar, los tripomastigotes se dirigen a las células más cercanas para introducirse y transformarse en amastigote en donde se multiplican y diferencian en tripomastigotes sanguíneos, al salir de las células se trasladan hacia otros tejidos y reinfectan otras células propagando la infección en el hospedero. Cuando una chinche se alimenta de nuevo los tripomastigotes son reabsorbidos, migrando hacia el intestino del insecto donde se transforman en epimastigotes y se reproducen por fisión binaria; en su camino los epimastigotes se fijan a la parte final del intestino y a la glándula rectal en donde se diferencian en tripomastigotes metacíclicos para ser liberados cuando el insecto defeque u orine, cerrando el ciclo de vida del parásito (Pereira, 1990). La fase de epimastigote no infectiva puede aislarse de la chinche y cultivarse en condiciones de laboratorio para cualquier estudio del protozoario. Utilizando medios nutricionales que asemejan las condiciones del insecto se puede lograr una transformación de epimastigote a tripomastigote, aunque la infectividad de estos tripomastigotes producidos "in vitro" puede variar. También el mantener a los parásitos en un medio axénico como es el LIT

(Liver Infusion Triptosa), por largos períodos de tiempo puede conducir a una nula transformación de un estadio a otro del parásito (Camargo, 1964; Hudson, 1981).

1.1.D Heterogeneidad de las cepas de T. cruzi.

Los datos de la biología del protozoario se han incrementado de tal manera, que se ha visto que existen diferencias entre e intra cepas, aislados y clonas (Bogliolo y Godfrey, 1987). Por ejemplo las cepas de Brasil difieren de las encontradas en Argentina, (Tibayrenc y col., 1986a) en crecimiento, transformación, virulencia e infección. En personas que están infectados con T. cruzi varía la respuesta inmune y la parasitemia. También se ha visto en infecciones experimentales en ratones y conejos que puede existir una variación en el tropismo de los tripomastigotes a infectar diferentes órganos o tejidos (Miles y col., 1977; Miles y col., 1980; Flint y col., 1984; Lanham y col., 1981; Tibayrenc y col., 1986b; Bogliolo y Godfrey, 1987; Jacobson, Washburn y Khun, 1991).

1.2 LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

1.2.A Generalidades de la enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas fué descubierta por Carlos Chagas médico Brasileño del Instituto de Manguinhos (Hoy Instituto Oswaldo Cruz) en Lassangue, Minas Gerais en 1909 en donde fue comisionado para realizar campañas de profilaxis contra el paludismo. Al visitar las casas de los pobladores observó que entre las grietas de las paredes había una gran cantidad de chinches, examinó su contenido intestinal y observó organismos flagelados. Colectó varios de los artrópodos y los envió a su Maestro Oswaldo Cruz quien los inoculó

a un mono Callitrix penicilata, a su vez Chagas infectó varios mamíferos, después de 3 o 4 semanas al observar su sangre periférica vio protozoarios flagelados; poco después revisó sangre humana y observó a los mismos flagelados e identificó que eran tripanosomas diferentes a los que se habían descrito. A el parásito lo llamo como su mentor Schizotrypamun cruzi, él describió las características clínicas de la enfermedad y la morfología de la etapa infectiva (Chagas, 1909). El ciclo de vida completo lo describió Brumpt (1912), los cambios patológicos de la enfermedad fueron señalados por Vianna (1916) y Neiva (1913) describió a la chinche "barbeiro". En 1930 el Argentino Romaña describió el sitio de entrada ocular del parásito, hoy conocido como "signo de Romaña", describió también a otros vectores diferentes a el "barbeiro" y otros mamíferos hospederos de T. cruzi (Katz, Despommier y Gwadz, 1989). A partir del hallazgo de Carlos Chagas se continuaron los estudios, encontrando nuevos casos en los años subsecuentes, no sólo en Brasil, también en Argentina, El Salvador, Uruguay, Perú, Guatemala y Chile, más recientemente en México y en los Estados Unidos debido a la gran cantidad de personas que inmigran desde las áreas donde son infectados (Kirchorff y Neva, 1983).

I.2.B Patología de la enfermedad.

I.2.B.a Entrada del parásito.

La enfermedad comienza con la entrada del parásito, el cual puede producir el signo de Romaña o un chagoma. Las manifestaciones típicas son: fiebre, edema, inflamación de ganglios, cambios electrocardiográficos; pero en muchos de los casos son asintomáticos (Hudson, 1981).

I.2.B.b Fase ácida.

En la fase ácida, los tripomastigotes se pueden encontrar en circulación. El inicio de la fase ácida es la entrada del parásito a las células y la transformación en amastigotes, a esta etapa se le relaciona con los cambios en el funcionamiento del corazón y disturbios en el sistema nervioso central, esto último se ha demostrado al analizar el fluido cerebroespinal en animales infectados experimentalmente (Hudson y Britten, 1985). Esta fase termina con una vigorosa respuesta inmune, que abate la parasitemia a niveles no detectables, el tiempo de duración de esta etapa varía de 2 a 3 meses (Hudson y Britten, 1985), el porcentaje de mortalidad de esta fase es aproximadamente de un 10% (Schofield y Dias, 1991), afectando más a niños menores de 4 años y pacientes que son susceptibles; cuando la enfermedad es congénita el tiempo de vida del bebé es tan sólo de pocas semanas, muriendo el 100% de estos casos (Calderon y De Fabro, 1983). En esta etapa se puede administrar quimioterapia utilizando: nitroimidazole, nitrofurán, nifurtimox; este tratamiento reduce la parasitemia, pero no la erradica. Tampoco se han hecho las pruebas suficientes para determinar sus contraindicaciones (Kirchoff y Neva, 1983; Hudson y Britten, 1985; Pereira, 1990; De Castro y col., 1992).

I.2.B.c Fase indeterminada.

El comienzo de la fase crónica puede variar, ya que la persona que está infectada puede presentar, un largo período de latencia por varios años, (Hudson y Britten, 1985) permitiendo a muchos individuos vivir por arriba de los 60 años, de acuerdo a encuestas seroepidemiológicas y seguimientos de los síndromes de la enfermedad, las fallas cardíacas

e intestinales comienzan a aparecer generalmente a partir de los 20 años de edad (Goldsmith y col., 1992; Kirchoff y Neva, 1983).

I.2.B.d Fase crónica.

La siguiente etapa de la enfermedad, es la fase crónica que esta caracterizada por megasíndromes cardíacos e intestinales, que corresponden a ensanchamiento del corazón, infiltración linfocitaria e inflamación (Hudson, 1981; Hudson y Britten, 1985), reducción de los espacios para la difusión del oxígeno, prosiguiendo a una fibrosis del tejido, involucrando bloqueo en los atrios ventriculares (Celentano y González, 1992), la inflamación del esófago y colon principalmente, acompañado de irritación en las paredes intestinales, constipación, regurgitamiento, cambios en los movimientos peristálticos, debido a la denervación de células ganglionares del sistema parasimpático (Katz, Despommier y Gwadz, 1989); estos cambios vienen acompañados de una aparente desaparición de los parásitos, solo detectables por xenodiagnosís o por cultivos celulares de sangre (Hoff y Boyer, 1985).

I.2.C Vías de transmisión.

Generalmente la transmisión es por medio del vector, por la entrada de la agricultura o la colonización de áreas selváticas, lo que aumenta la domesticación de los triatóminos (Schofield y Dias, 1991). También puede haber infección a través de las siguientes formas: la transfusión de sangre infectada con T. cruzi, que permite la difusión de esta enfermedad a nuevas áreas que no son endémicas (Almeida y col., 1990), por costumbres que existen en algunas comunidades de Nayarit, donde algunas personas se comen y protegen a las

chinchas, porque creen que son afrodisíacas o que dan buena suerte. También por la costumbre de alimentarse de carne semicruda de animales silvestres como el armadillo y el tlacuache, que son reservorios del parásito (Salazar, De Haro y Urribaren, 1988). Otra forma importante de contagio es a través de la madre, ya que los parásitos son capaces de transpasar la barrera placentaria e infectar a el feto (Calderon y De Fabro, 1983).

1.3 LA ENFERMEDAD EN MEXICO.

En México desde la llegada de los españoles ya se tenían registros del triatoma y de los síntomas de la enfermedad; en 1528 Antonio Herrera al reseñar la expedición de Francisco de Garay a Panuco, Ver., escribió que el ejército fue "víctima molesta de mosquitos y pitos que pican y dejan señal como una chinche y suelen causar calenturas", Fray Bernardino de Sahagún en su obra se refiere de la siguiente manera "hay cucarachillas pardillas y traen dos maneras de alas con que vuelan, que son ponzoñosas y donde pican imprimen comezón e hinchazón" y Juan Cardenas en 1591 al referirse a el reino de la Nueva Galicia que comprendía a los estados de Aguascalientes, Jalisco, parte de Zacatecas, Durango, San Luis Potosí y Nayarit, menciona "las chinches que llaman compostelas más enojosas que las arañas", muy posiblemente hablaba de Triatoma picturata (Velasco-Castrejón y col., 1992). En 1940 Mazzotti reportó los primeros casos de infección chagásica en las diferentes etapas de la enfermedad al realizar necropsias; se observaron los efectos típicos de la enfermedad como son la degeneración sistémica en células cardíacas o megasíndromes. También a personas que se les practicaron pruebas de observación directa de sangre para verificar paludismo en la campaña de 1975, se encontró en las laminillas a tripomastigotes

(Salazar, De Haro y Uribarren, 1988), la mayoría de estos reportes son presentados en forma aislada. Más recientemente los investigadores como Goldsmith y colaboradores (1992), hicieron estudios seroepidemiológicos para observar la prevalencia de anticuerpos y el comportamiento de la enfermedad de población abierta en zonas principalmente rurales, esto condujo a un estudio de ocho años desde 1971 en la comunidad de Chila, Oaxaca, en donde se encontró un 67% de prevalencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en adultos. En niños los datos de positividad son menores, este dato se explica por la aplicación de un insecticida residual en la campaña contra el paludismo de 1955 a 1981. También se hizo un seguimiento clínico de los cambios a nivel de corazón, observando que en general en la etapa crónica no se encontraron grandes disturbios. Al parecer la seropositividad no se relacionó en ningún momento con megasesófago y megacolon como en otros países de Sudamérica. Anderson y colaboradores (1990) en una encuesta seroepidemiológica que se realizó en tres comunidades de Guerrero, con 4372 muestras sanguíneas de personas de 978 casas, reportó 132 positivos a los cuales se les realizó xenodiagnóstico quedando 75 positivos, estimando una prevalencia de 1.7%. A estos reportes se agrega el de Salazar y colaboradores (1988), que entre los años de 1949 y 1985, nos habla de 398 casos crónicos detectados por serología, de un total de 6672 muestras de personas de los estados de: Zacatecas, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca, con un promedio del 6% de prevalencia. Posteriormente en la Encuesta Nacional de Seroepidemiología (Velasco-Castrejón y col., 1992), se reportaron índices entre 1.6, 0.5. y 0.2 a diferentes diluciones, con dos pruebas serológicas: hemaglutinación indirecta (HAI) e inmunofluorescencia indirecta (IFI), con una mayor prevalencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en los estados de Chiapas, Oaxaca e Hidalgo,

reportando que el 74.5% de los seropositivos fueron menores de 39 años. Entre los resultados de estos reportes existen discrepancias pero, con este tipo de estudios se tiene una referencia general de la situación en que se encuentra el país con respecto a las entidades ya localizadas y a nuevos brotes de la infección.

I.4 INMUNOLOGIA DE LA RELACION PARASITO-HOSPEDERO.

I.4.A Respuesta inmune al parásito.

En el estudio de la respuesta inmune contra T. cruzi dos son los problemas más estudiados, el fenómeno de inmunosupresión y la formación de anticuerpos de reacción cruzada frente a moléculas propias del hospedero. Para lo cual se ha tratado de establecer modelos experimentales de la enfermedad, los cuales permiten estudiar estos dos fenómenos y hacer extrapolaciones a los humanos que presentan la enfermedad (Hudson, 1981).

I.4.B Respuesta inmune celular y humoral en la fase aguda.

Durante el inicio de la infección, el sistema inmune celular y humoral no se encuentran preparados para evitar la entrada del parásito, debido a esto, la respuesta inflamatoria se da hasta que los protozoos ya han roto algunas células y se han transformado en tripomastigotes sanguíneos que fácilmente se mueven a través de las venas periféricas para reinfectar otros tejidos (Hudson y Britten, 1985). En ratones infectados intraperitonealmente se ha visto que es suprimida la secreción y producción de interleucina 2 (IL-2), que es una citocina que ayuda a la proliferación y diferenciación de células T (Beltz, Szein y Kierszenbaum, 1988; Beltz, Kierszenbaum y Szein, 1989). Al mismo tiempo el

nivel de interferón gama (IFN γ) se incrementa. Esta citocina ayuda a la eliminación de parásitos intracelulares, regresando a su nivel normal entre los 18 y 20 días post infección, en cambio el nivel de IL-2 no se recupera (Wirth y col., 1985). Se demostró que las células productoras del IFN γ son poblaciones de Thy-1 CD4 $^+$ y CD8 $^+$ (Silva y col., 1992), mientras que la IL-2 es producida por las TH1 CD4 $^+$ y CD8 $^+$, se piensa que estas células podrían ser afectadas por la acción de las CD4 $^+$ y CD8 $^+$ durante la respuesta inmune del hospedero (Tarleton, 1991). Así, también se producen células TH2, las cuales no se ha visto que tengan una participación activa, sin embargo se piensa que posiblemente ejercen una fuerte inhibición sobre las células TH1 generando inmunosupresión (Kierszenbaum y col., 1989; Szeftel, Cuna y Kierszenbaum, 1990).

En otras investigaciones, se encontró que la supresión puede ser debida a macrófagos (Wirth y col., 1985; Cerrone y Kuhn, 1991; Tarleton, 1991; Cerrone, Ritter y Kuhn, 1992; Piuvezam y col., 1993). En una etapa inicial de la infección la respuesta inmune es suprimida por un tipo de macrófagos supresores, la cual es contrarrestada en una segunda etapa por una población de células T ayudadoras y en una tercera etapa la respuesta es suprimida por un segundo grupo de macrófagos supresores, que no puede ser contrarrestada por los linfocitos T (Cerrone y Kuhn, 1991; Cerrone, Ritter y Kuhn, 1992). Sin embargo, se ha observado que la respuesta inmune no es totalmente suprimida ya que aparecen anticuerpos de la clase IgG2a dominantes y bajos niveles de IgG1, IgA e IgE (Rowland, Mikhail y McCormick, 1992; Spinella y col., 1992). Estos anticuerpos ayudan a el control de los parásitos durante la fase aguda de la infección (Tarleton, 1991). Pasadas tres semanas aparecen anticuerpos protectores que bajan los niveles de la parasitemia terminando con

esta fase de la infección (Pereira, 1990; Tarletton, 1991; Spinella y col., 1992).

1.4.C Respuesta inmune celular y humoral en la fase indeterminada.

Antes de que se establezca la fase crónica en muchos de los casos existe un período indeterminado en donde no hay síntomas. La fase está caracterizada por daños histopatológicos a células cardíacas y células de esófago y colon. Aún cuando la parasitemia no sea detectable, y en la mayoría de los casos, los nidos de amastigotes no estén relacionados con los sitios dañados, se piensa, que cuando los amastigotes salen de las células infectadas, estas células liberan una gran cantidad de componentes, que pueden ser la causa de la formación de anticuerpos contra el mismo hospedero, causando a su vez infiltración linfocitaria principalmente en células cardíacas. También la hipersensibilidad del hospedero a los productos tóxicos del parásito producen inflamación y daño a los tejidos (Hudson y Britten, 1985). Debido a estas razones los tejidos comienzan a perder su funcionalidad y ha ser destruidos; llegando subsecuentemente en cualquiera de los planteamientos anteriores a la formación de autoanticuerpos (Ternynck y col., 1990). En varios trabajos se encontró que los antígenos de T. cruzi cruzaban con proteínas de células humanas como la laminina, que se presenta en nervios periféricos, tejidos endocardiales, vascular e intersticial (Hudson y Britten, 1985).

1.4.D Respuesta inmune celular y humoral en la fase crónica.

En esta etapa los parásitos generalmente no son detectables debido a que se encuentran intracelularmente (Kierszenbaum, 1985; Hudson, 1985). Algunos anticuerpos, generados

por las células B en la primera fase de la enfermedad, son relevantes durante la fase crónica, ya que la resistencia del hospedero al parásito en esta etapa está también mediada por anticuerpos, los cuales pudieron ser inducidos por antígenos de superficie del protozoario (Spinella y col., 1992). Se sabe que la transferencia pasiva de anticuerpos de la clase IgG1 e IgG2 proveen de protección a los animales durante la enfermedad (Hudson y Britten, 1985; Spinella y col., 1992). La pregunta es, cómo el tripanosoma sobrevive a un ambiente rico en inmunoglobulinas, así como a mecanismos de destrucción por macrófagos mediados por anticuerpos (Celentano y González, 1992). Una explicación puede ser que, los antígenos que se encuentran unidos a la superficie del parásito por moléculas de glicosil fosfatidilinositol (GPI), la cual permite que sean liberados fácilmente al medio, que estén induciendo la formación de anticuerpos contra antígenos solubles, mientras que el parásito no es atacado y continúa su ciclo de vida (Hernández-Munain y col., 1991; Andrews y col., 1988). Otra explicación la plantea Kahn, Kahn y Eisen (1992), quienes describen la formación de autoanticuerpos, a través de antígenos del parásito que tienen las características de ser moléculas ricas en aminoácidos ácidos y cargados negativamente. Los anticuerpos que reconocen a el antígeno, podrían unirse a proteínas humanas con las mismas características, formando autoanticuerpos que no se depositarían en el parásito unen a través del epítopo ácido y negativo a moléculas del hospedero.

1.5 ANTIGENOS DE Trypanosoma cruzi.

1.5.A Antígenos de membrana.

Las moléculas de Trypanosoma cruzi que inicialmente entran en contacto con el hospedero

e inducen una respuesta inmune son las que se encuentran en superficie y por lo tanto las más estudiadas.

Dentro de los antígenos mejor descritos, se encuentran los *Ssp-1*, *Ssp-2*, *Ssp-3* y *Ssp-4*, que son glucoproteínas de 120 kDa y 70kDa respectivamente, específicas de tripomastigote, el *Ssp-3* no está definido a que grupo de compuestos pertenece y el *Ssp-4* es una glucoproteína de 70-84 kDa específica de amastigotes. Estos se analizaron por microscopía electrónica con anticuerpos monoclonales de ratón, los anticuerpos reconocen sólo una parte de la población de los parásitos. El reconocimiento de algunos parásitos, indica que existen varias formas intermedias por las cuales pasan los tripomastigotes a amastigotes en las células hospederas (Andrews y col., 1987). De los antígenos anteriormente descritos, el *Ssp-4* está unido a la membrana a través de una molécula de glicosil-fosfatidilinositol (GPI), el cual fue identificado por un anticuerpo monoclonal de reacción cruzada (CRD) que reconoce moléculas unidas a GPI. Este anclaje del *Ssp-4*, fue detectado en la etapa de amastigotes hacia epimastigote, ya que los primeros pueden ser cultivados en un medio sin células sin disminuir su viabilidad, de tal forma que este tipo de anclaje podría ser una secuencia del procesamiento durante la transformación de un estadio a otro. La aparición de los antígenos en el parásito sería de la siguiente manera: *Ssp-1* tripomastigote metacíclico a tripomastigote sanguíneo, *Ssp-2* tripomastigote sanguíneo a amastigote celular, *Ssp-3* amastigote celular a amastigote extracelular y finalmente *Ssp-4* de amastigote extracelular a epimastigote (Andrews y col., 1988).

Un antígeno de 50 a 55 kDa que fue identificado por cuatro anticuerpos monoclonales anti-T. cruzi C2, C4, C7, C10, se localizó en las tres formas del parásito, por citometría

de flujo e inmunofluorescencia, este podría ser incluido en el grupo de los antígenos anclados a moléculas de GPI, debido a que es liberado de la superficie del parásito, al aplicar NaOH, HNO₂, proteasas, o fosfolipasa C al medio de cultivo. Aunque no se ha definido cual es el papel biológico de este antígeno, los anticuerpos detectaron dos poblaciones de amastigotes y se observó que la proteína fue liberada inmediatamente después de que el macrófago fue destruido, lo que sugiere también que podría participar en la fase intracelular del parásito (Hernández-Munain y col., 1991). Además, se encontró que este antígeno cruza con una proteína de linfocitos T y B en líneas celulares de ratón y humano. En los cultivos de células T, la proliferación es suprimida por los anticuerpos al igual que por sueros de pacientes que reconocen esta proteína. De esta manera se bloquea la respuesta inmune de las células a través de la supresión de la proliferación de los linfocitos. Por esta razón, se sugiere que este pueda ser un mecanismo más por el cual se da la inmunosupresión en esta parasitosis (Hernández-Munain y col., 1992).

Otro antígeno más, que tiene una actividad enzimática e igualmente se incluye en el grupo de las moléculas unidas a la membrana por GPI, es la *neuraminidasa* (sialidasa acineuraminil hidrolasa, EC 3.2.1.18), fue purificada de membranas de tripomastigotes, más de 5000 veces por cromatografía de afinidad y electroelución y presentó un peso molecular de 60 kDa, bajo condiciones reductoras. Se produjeron anticuerpos anti la enzima en conejos, los cuales solo reconocieron extractos solubles de tripomastigotes y no de epimastigotes, así mismo los anticuerpos detectaron la misma actividad enzimática en varias cepas que difieren en su zimodema. En inmunoblot frente a sueros de pacientes chagásicos el antígeno es fuertemente reconocido por anticuerpos de fase aguda. También se observó que la

expresión de la actividad de la enzima aumenta al aumentar la infectividad de los parásitos (Harth, Haldaris y So, 1987). La enzima es específica para transferir $\alpha(2-3)$ ácido siálico, el cual es proveniente de macromoléculas de la célula hospedera que se unen al epítipo Ssp-3. Los anticuerpos monoclonales anti-Ssp-3, reconocen residuos de ácido siálico y la falta de estos en los parásitos inhibe la penetración a la célula, sugiriendo que el epítipo Ssp-3, tiene características que requiere la trans-sialidasa para el reconocimiento de la célula blanco por *T. cruzi* (Pereira y col., 1980; Schenkman y col., 1991). Prioli y colaboradores en 1990 reportaron la caracterización de anticuerpos monoclonales anti-enzima neuraminidasa (TCN-1 y TCN-2), los cuales son capaces de inhibir la actividad de la enzima en preparaciones crudas de esta. En inmunoblot se detectó, que en varias clonas de tripomastigotes los anticuerpos monoclonales reconocen cuatro bandas en el rango de 121-203 kDa. Se confirmó que la actividad de la neuraminidasa se incrementó con la infectividad "in vitro" a células. En geles de doble dimensión se determinó su punto isoeléctrico que es de: 6.55-7.30. Los autores también encuentran que los tripomastigotes cuando salen de las células no presentan actividad enzimática, pero al entrar en circulación los parásitos expresan una alta actividad de *trans-sialidasa*. Schenkman, Pontes de Carvalho y Nussenzweig en 1992, detectaron que la actividad de neuraminidasa y la de trans-sialidasa se encuentran en membrana y están implicadas en la invasión del parásito a la célula, debido a que estas dos enzimas son reconocidas independientemente por anticuerpos monoclonales anti GPI, son purificadas por cromatografías de intercambio iónico, de gradiente molecular e hidrofóbico, presentan una actividad entre 6.5-7.5 pH y son inactivadas por calor a los 56°C. Por estas razones se propone que sea la misma enzima o que estén acopladas en

la liberación-transferencia de residuos de ácido siálico en la membrana del parásito. Un antígeno más, con actividad enzimática, es la *glucoproteína de 85 kDa*, este antígeno fue reconocido por un anticuerpo monoclonal (155D3), que se obtuvo de ratones infectados con tripomastigotes de la cepa Y. Por inmunoprecipitación, microscopía electrónica y citometría de flujo, se demostró que el anticuerpo solo reacciona con tripomastigotes y amastigotes extracelulares. Con la técnica de inmunolocalización ultraestructural en microscopía electrónica se observó que el antígeno está asociado a la superficie del parásito y a vesículas periféricas al paquete flagelar. Así mismo, es liberado al medio y participa en la diferenciación del tripomastigote a amastigote (Ouaisi y col., 1990a). Los anticuerpos policlonales anti 85 kDa transferidos pasivamente a rata las protegió de los cambios letales en la fase aguda de la enfermedad (Ouaisi y col., 1990b). La glicoproteína está relacionada con una familia de genes que codifican para moléculas de 85 kDa, (Frasch, Sanchez y Gazzulo, 1990; Campetella y col., 1992) las cuales tienen actividad de sialidasas y son liberadas al medio. También se determinó por digestión de exoglucosidasas que presenta una cadena de carbohidratos aminoterminal: sialil, fucosil y galactosil unido a (α 1-3) galactosa, este azúcar en la Gp 85 puede estar relacionado con altos niveles de anticuerpos, que reconocen a este epítipo en pacientes chagásicos. Es posible que el papel biológico que se le confiere a este antígeno es la participación en el fenómeno de penetración a las células hospederas por alteración de cargas en la membrana (Couto y col., 1990; Khan y col., 1991). El *complejo excretorio-secretorio* se utilizó en un ensayo de captura antígeno anticuerpo en una matriz de fase sólida. El anticuerpo monoclonal VG3/G11 específicamente está dirigido a epítopos con carbohidratos y son altamente conservados en las cepas de

I. cruzi analizadas: EP, MEN, Tulahuen y la clona 78 Miranda, provenientes de áreas endémicas. Además observaron que este complejo era identificado por anticuerpos de la clase IgG e IgM presentes en un alto porcentaje en sueros humanos en fase aguda de la enfermedad, por lo que este complejo se podría utilizar para el diagnóstico (Ouaisi y col., 1991).

También dentro de los antígenos relacionados con la fase aguda, es el antígeno *SAPA*, es liberado por tripomastigotes, con un peso molecular de 200 kDa, este fue detectado por inmunoblot con sueros de ratón infectados con tripomastigotes. Sueros de pacientes con tripanosomiasis en fase aguda reconocen el polipéptido en el sobrenadante del parásito, no así enfermos en fase crónica. El antígeno podría ser utilizado, igual que el anterior en el diagnóstico de la enfermedad en su fase aguda (Affranchino y col., 1989). Frascch, Sánchez y Cazzulo (1990) y Campetella y colaboradores (1992), encontraron que este antígeno, también es codificado por una pequeña familia de genes, los cuales difieren en longitud, con una región repetida de 36 pares de bases. Los resultados obtenidos por Northern blot, indican que sólo hubo hibridización con tripomastigotes, lo cual indica que los genes son transcritos sólo en la forma infectiva del parásito (Affranchino, Pollevick y Frascch, 1991). Estudios de antígenos que son principalmente glicoproteínas, como es el *complejo lipopeptidofosfolipídico*, éste fue aislado de epimastigotes junto con los antígenos *Gp 31*, *Gp 37* y *Gp 24*, extraídos por precipitación en fenol, debido a la alta glicosilación que presentan. Se identificaron por sueros humanos chagásicos crónicos (Zingales y col., 1982). Otro grupo de investigadores encontró que este complejo está involucrado en la lisis del epimastigote en la ruta alternativa del complemento. Las glicoproteínas 31, 37 y 24

podrían estar involucradas en un proceso de metilación el cual le ayuda al parásito a adherirse e introducirse a la célula hospedera (Mendonca-Previato y col., 1983; Snary, 1985).

Posiblemente los antígenos descritos a continuación, sean investigaciones más a fondo, debido a las características similares que presentan con los antígenos arriba mencionados y a la participación de investigadores como Mendonca-Previato.

El *antígeno Gp 25* se purificó de extractos solubles con NP-40 de epimastigotes de *T. cruzi* por cromatografía de afinidad a Concanavalina A. Este antígeno fué reconocido por un 97.8 % de sueros de enfermos chagásicos de áreas endémicas, observando una baja reactividad cruzada con individuos sanos y no se encontró reactividad con sueros de otras parasitosis relacionadas, (Scharfstein y col., 1985). Más adelante se observó que al agregar inhibidores de proteasas al extracto del parásito, un anticuerpo monoclonal dirigido contra Gp 25 no lo reconocía, pero aparecía una molécula de 57 kDa a la que el anticuerpo se le pegaba, al igual que cuando se usó un anticuerpo policlonal anti-Gp 25, para inmunoprecipitar lisados marcados con metionina [³⁵S], observaron bandas de 51 kDa y una de 8 a 10 kDa. Por lo que se llegó a la conclusión de que la Gp 25 era un producto de proteólisis de la Gp 57/51. La *Gp 57/51* se purificó de extracto crudo por cromatografía líquida de rápida ejecución (FPLC) y de intercambio aniónico en columna de Mono Q. Al analizar la proteína en condiciones no reductoras, con inhibidores de proteasas se observaron ambas bandas de 57 y 51 kDa (Scharfstein y col., 1986).

En otro estudio se purificó de extractos de epimastigotes una enzima, con un peso de 60kDa, al ser secuenciada se demostró que hay una homología con la papaína y la L. catepsina (las proteínas mencionadas anteriormente pertenecen a el grupo de proteasas de cisteína).

Al desglucosilar se obtiene un peso molecular de alrededor de 54 kDa, esto indica que contiene un 10% de azúcares, específicamente de manosas, estos oligosacáridos no contienen residuos de fosfatos por lo que se infiere que la enzima no es liberada a el exterior como sucede en los mamíferos por la ruta metabólica de la manosa-6-fosfato (Cazzulo y col. 1989). Se produjo un anticuerpo policlonal dirigido contra la proteasa de cistefina (*cruzipaina*), para su localización y para analizar el papel que tiene en el proceso de la interacción parásito-hospedero. Por estudios de inmunocitoquímica en microscopía electrónica, se detectó que la estructura que lo contienen, es un sistema endosomal-lisosomal en las formas de amastigotes y epimastigotes, así como también en tripomastigote se encontró profusamente en la superficie y en el paquete flagelar. Se piensa que la enzima es liberada en el momento en que el parásito interactúa con la célula hospedera. En un experimento hecho con macrófagos, al pegar el fragmento F(ab')₂ de anticuerpos anti cruzipaina en la superficie del epimastigote y tripomastigotes, inhibió la ingestión de los parásitos por el macrófago (Souto-Padrón y col., 1990). Posteriormente se identificó que la *Gp 57/51* tiene en su secuencia una parte amino terminal de 30 aminoácidos, reportados para la cistefina (*cruzipaina*) aislada de la cepa Tulahuen, incluyendo el sitio activo de la proteasa en la posición 25. El análisis funcional de la *Gp 57/51* indicó que el antígeno es activado por un grupo tiol, en un rango de 5-7.5 pH, de igual forma es inhibida por bajas concentraciones de E-64, cístatin, leupeptin y antipapaína. También se observó, que está localizada en un sistema de vesículas endosomales-lisosomales en tripomastigotes, *igual que la cruzipaina*. Y un anticuerpo monoclonal dirigido contra la *Gp 57/51* demostró que la actividad antigénica y la actividad enzimática son expresadas por la misma entidad molecular (Murta y col.,

1990).

Se han reportado otras moléculas, que se encuentran en el rango de los antígenos anteriores, pero que no se sabe si existe relación alguna, como es un *antígeno de 52 kDa*, el cual se purificó en cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales anti-T. cruzi, por microscopía electrónica se detectó que el antígeno está contenido en gránulos intracitoplásmicos. El antígeno es reconocido por sueros chagásicos en fase crónica, pero no por sueros leishmaniasicos (Carbonneto y col., 1990).

Una *glucoproteína de 60 kDa*, que se purificó de tripomastigotes por isoelectrénfoque, con un punto isoeléctrico de 4.2. Se demostró por dot blot que tenía afinidad por las lectinas de Ricinus communis y Datura stramonium. Además la glucoproteína fué reconocida por sueros de humanos infectados. En ensayos con linfocitos de ratón se observó que este antígeno promueve la proliferación y activa a linfocitos residentes. La característica anterior lo hace un buen candidato para la inmunoprofilaxis (Villalta y col., 1992).

En otro trabajo, con un anticuerpo monoclonal (G3) obtenido de suero de ratones inmunizados con membranas de epimastigotes, indujo aglutinación a epimastigotes vivos, promovió la lisis de tripomastigotes sanguíneos por el ensayo de complemento y confirió una protección parcial por transferencia pasiva a ratones. Con este anticuerpo monoclonal, se purificaron por cromatografía de afinidad antígenos de un peso molecular de *45 kDa a 68 kDa*, los cuales fueron positivos a la prueba de Schiff. Los antígenos fueron preparados en Iscoms y protegieron en un 100% a los animales al infectarlos con dosis letales de tripomastigotes. Preparados de esta manera, estos antígenos podrían ser utilizados como vacuna (Araujo y Morein, 1991).

En otras investigaciones se han purificado moléculas de 90 kDa, con características diferentes, como una *glicoproteína de 90 kDa*, purificada de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes con NP-40, por cromatografía de afinidad con Lens culinaris un antígeno común a las tres formas del parásito, el antígeno tiene un peso de 90 kDa (Snary y Hudson, 1979). Al utilizar marcaje metabólico y de superficie seguido por inmunoprecipitación con IgG de suero hiperinmune de ratón y de enfermo, se identificó en tripomastigotes sanguíneos una *glicoproteína de 90 kDa* y en tripomastigotes y epimastigotes de cultivos axénicos se identificó una banda de 75 kDa (Andrews, Katzin y Colli, 1984). Los tripomastigotes sanguíneos, tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes de cultivo axénico fueron tratados con tripsina antes de exponer a macrófagos, observándose que el compuesto es capaz de remover de la superficie del tripomastigote sanguíneo un componente anti fagocítico, los parásitos tratados con el compuesto, fueron ingeridos por los macrófagos, mientras que en los parásitos que no fueron tratados se inhibe la ingestión por los macrófagos. Al analizar el componente nuevamente se observó que se presenta un peso menor al de 90 kDa en los tripomastigotes sanguíneos, en cambio en las otras dos fases no se afecta el peso de 75 kDa de la glicoproteína (Nogueira y col., 1981). Nogueira al comparar sus resultados con el trabajo citado anteriormente, (Snary y Hudson, 1979) argumenta que este componente anti fagocítico *Gp 90 kDa* en tripomastigotes sanguíneos es igual a la *Gp de 75 kDa* en tripomastigotes y epimastigotes de cultivo axénico, fue purificado por la lectina Lens culinares y es reconocido por sueros de enfermos, asociándolo con la proteólisis de la primera. Después en otro estudio con extractos totales de epimastigotes y tripomastigotes de cultivo con marcaje metabólico y de superficie. Los extractos se analizaron

en geles de doble dimensión y se observaron polipéptidos en el área de 88-92 pl 5.6-6.0 y 72-76 pl 5.6-5.8, los cuales inmunoreaccionaron con sueros de pacientes chagásicos. Se detectó en ambas formas del parásito, por inmunoprecipitación y se recuperaba la glicoproteína de 90 kDa, ya identificada por Snary y Hudson (1979), con esta se analizaron sueros de pacientes infectados con diferentes especies de Leishmania resultando negativos, concluyendo que la Gp 90 puede ser usado en el diagnóstico de la enfermedad (Dragón y col., 1985). Más reciente, Guhl en 1990, se demostró que la *Gp 90*, también puede distinguir entre la infección por T. cruzi y T. rangelli, el primero son protozoarios de la misma familia y el segundo es un organismo que no es dañino para el humano. Primero se hicieron pruebas con animales infectados con ambos parásitos, obteniendo un 100% de especificidad y sensibilidad en la distinción entre ambos organismos. Al ser probado con sueros humanos infectados con ambos parásitos de áreas endémicas, se obtuvieron resultados negativos para los casos con T. rangelli.

Se aisló un *antígeno de 90kDa* de tripomastigotes metacíclicos, que se encuentra en la fase aguda. Este antígeno fué purificado por cromatografía de afinidad a un anticuerpo monoclonal IG7. Al inmunizar el antígeno con adyuvante a ratones permite a los animales crear anticuerpos contra el parásito, ya que tiene el efecto de reducir la carga parasitaria a niveles muy escasos al retar a los organismos con tripomastigotes. El efecto que posiblemente produce es la formación de anticuerpos que tienen un actividad tripanomicida, demostrada en experimentos de dilución en microplacas. La importancia de la aparición de anticuerpos en la fase aguda, es primordial para contrarrestar el establecimiento del parásito en el organismo y los efectos letales, por esto la protección previa frente a el

protozoario es importante en los mamíferos y los antígenos purificados con poder de protección son candidatos de importancia para la inmunoprolifaxis (González, Marcia y Yoshida, 1991).

Dos reportes más, sobre varias glicoproteínas con pesos moleculares muy parecidas, pero que los autores no mencionan relación alguna entre estas.

Glucoproteínas de 90, 80, 72 y 58 kDa, se presentan en la superficie del parásito, estas son afectadas al añadir tunicamicina al cultivo, inhibiendo drásticamente el índice de infección a células de mamíferos, identificándose en extractos de tripomastigotes usando Concanavalina A, entre los rangos de 80-90 y 50-60 kDa. Para corroborar esta característica se realizó una inmunoprecipitación con anticuerpos policlonales anti-80-90 y anti-50-60, ambos complejos fueron susceptibles a la acción de endo- β -N-acetylglucosaminidasa H. Los anticuerpos policlonales anti-80-90 y anti-50-60, reconocen las glucoproteínas ya mencionadas, en la cepa Y y en una clona inmunoprecipitan otros antígenos en el rango de 74-80 kDa. El antisuero, al ser añadido a la células epiteliales de mamífero, inhibió la internalización del parásito hasta en un 80%, indicando posibles interacciones de diferentes ligandos-receptor para cada célula hospedera y aislado del parásito (Arruda, Colli y Zingales, 1989).

Las *glucoproteínas de 90, 85, 72 y 55 kDa*, se purificarón de membranas solubilizadas con detergentes y por varios pasos de cromatografía, específicas para tripomastigotes metacíclicos, con un punto isoeléctrico de 4.5-5.0, 8.6-9.1 y 4.8-5.1 respectivamente y la molécula de 72 kDa es específica de epimastigotes con un punto isoeléctrico de 8.2. Las tres glucoproteínas de tripomastigote son reconocidas por sueros chagásicos agudos

y la Gp 72 es la única molécula que fue reconocida por un antisuero de epimastigotes obtenido de conejos hiperinmunes (Harth, Haldaris y So, 1989).

Por último dos antígenos presente en la fase crónica, *TcCA-1* y *TcCA-2* que fueron clonados, al identificar un gene que codifica a los antígenos, a partir de una librería genómica de DNA reconstruido de la clona CA-1/65. El gene se ha aislado en otras cepas y clones del parásito, al ser expresado el antígeno TcCA-2 presentó un peso molecular de 140 kDa-160kDa en la cepa de RA y de 180 en la clona CA-1/72, la diferencia de pesos puede ser debido a un polimorfismo del DNA clonado. El antígeno presenta una secuencia repetitiva en la parte carboxilo terminal al compararse con otros (TCR39). No tiene el motivo de la secuencia de neuraminidasas, lo cual quiere decir que no esta emparentada con la onzima neuraminidasa de bacterias, ni con la del mismo protozoario (Buschiazzo y col., 1992).

1.5.B Antígenos de secreción.

Los antígenos de *T. cruzi* son de una gran variedad, entre ellos se encuentran antígenos que son secretados y a continuación se describen los que hasta el momento han sido estudiados.

Hemolisina. En *T. cruzi* se encontró una molécula a la que se dio el nombre de hemolisina, porque al ser liberada al medio de cultivo es capaz de alterar las membranas de eritrocitos de varias especies, en un pH ácido de 5.5. Esta molécula es sensible al calor, se sabe que el agregar tripsina afecta su actividad y se anula su secreción cuando se retira la glucosa del medio o por agregación de inhibidores metabólicos. Los compartimientos donde se localizó la hemolisina son endosomas y fagolisosomas, en general son proteínas de

microambientes ácidos y al ser liberada al medio citoplásmico aísla al protozoario dentro de la célula hospedera (Andrews y Whitlow, 1989). Más adelante se encontró que los parásitos al introducirse en la célula forman una vacuola, la que posiblemente es generada por la hemolisina. Se determinó que el espacio en el cual está contenido el protozoario presenta un pH ácido, que puede ser elevado por bases suaves y drogas como la cloroquina, metilamina o monensin inhibiendo la salida del amastigote a el citosol de la célula hospedera. Sin embargo, este efecto de inhibición de la salida del parásito a el citosol y su multiplicación es reversible, ya que al retirar los compuestos de los cultivos de células infectadas continúa su replicación y transformación normal. También observaron en microscopía electrónica inmunolocalización ultraestructural con partículas de oro coloidal y por inmunofluorescencia que los compartimientos ácidos que se presentan en el parásito en amastigotes y tripomastigotes son principalmente del tipo de fagosomas endosomales los cuales fueron identificados por un agente acidotrópico como es el [3-(2,4 dinitroanilino)-3'-amino-N-metilpropilamina] (DAMP) (Ley y col., 1990). Andrews, (1990) publica en una revisión sobre el antígeno, además de las características mencionadas, que es una proteína capaz de generar poros que permiten el paso de moléculas de un tamaño de 10 nm en la membrana de eritrocitos, los cuales son parecidos a canales transmembranales que de alguna manera generarían la lisis de la célula. En otro estudio (Andrews y col., 1990), la hemolisina se identificó como una proteína de una masa molecular de 60-75 kDa, que se encuentra relacionada inmunológicamente con la fracción C9 del complemento humano, la cual en experimentos realizados con membranas forma canales iónicos a pH bajos. Todos estos trabajos reafirman la hipótesis de que la hemolisina se encuentra relacionada con el escape

de el parásito a el citosol de las células hospederas.

Polipéptidos 70-150. Tripomastigotes de *T. cruzi* liberan polipéptidos espontaneamente al medio con una masa molecular de 70-150, ya que se demostró que el antígeno se encuentra en el lisado y el medio de cultivo del parásito. Por microscopia electrónica con oro coloidal este antígeno fué detectado por anticuerpos monoclonales HIA10, que estan dirigidos hacia moléculas de secreción (Tc 85). Al realizar la prueba se observó una gran cantidad de partículas asociadas a membrana flagelar y a vesículas membranales de 20 a 80 nm de diámetro. Para su purificación se utilizó cromatografía de filtración con medio de cultivo y se recuperó en el pico I una masa molecular de 70 a 150 kDa (Gongalves y col., 1991).

Antígeno de *T. cruzi* excretado por tripomastigotes metacíclicos. Este fué obtenido del medio en donde se cultiva el parásito y purificado por varios pasos de cromatografía: por tamaño en sephacryl S-200 se obtuvieron *antígenos de 73, 66, 64 y 55 kDa*, por afinidad a la aglutinina del germen de trigo se separaron los antígenos de 64 y 55 kDa y por cromatografía líquida rápida en proteína (HRS/20) se purificó el antígeno de 64 kDa con un *pI* de 4.8 que contiene residuos de azúcares de N-acetyl-D-glucosamina. Esta molécula permeabiliza la membrana de la célula hospedera permitiendo la entrada de moléculas tóxicas y líquidos los cuales matan a la célula hospedera por efectos citopatológicos (Castanys y col., 1990).

Antígenos con afinidad a la membrana de la célula hospedera. En cultivos axénicos de

epimastigotes de la capa Brasil y Tulahuen se identificaron moléculas que son liberadas por el parásito al medio de cultivo, estas se pegan a moléculas de la membrana de las células hospederas de peso molecular de 32-34 kDa. Los antígenos fueron purificados por cromatografía de filtración y se encuentran en el rango de 80-250 kDa. La función que le confieren es la participación en la invasión celular debido a que son capaces de unirse a la célula hospedera (Davis y Kuhn, 1990).

1.5.C Antígenos de reacción cruzada y autoanticuerpos.

Péptidos 1.1 y 1.2 derivados del antígeno SA85-1. Se reportaron que existen anticuerpos que se unen a antígenos de *T. cruzi* que están cargados negativamente y son ricos en aminoácidos ácidos incluyendo la β -tubulina con una terminación carboxilo. Se fabricaron dos péptidos de 1.1 y 1.2, estos se derivaron de genes clonados que codifican para el antígeno SA85-1, los cuales fueron utilizados para purificar por cromatografía de afinidad los anticuerpos anti-1.1 y 1.2 que se unen a la membrana del flagelo de tripomastigotes sanguíneo y a el citoesqueleto de células 3T3 de rata. La unión de los anticuerpos es afectado por sales y a cambios de pH. La existencia de estos anticuerpos polireactivos y la anti-tubulina en sueros normales y en infectados pueden estar presentes en la formación y desarrollo de autoanticuerpos, ya que cuando el organismo está expuesto a antígenos de *T. cruzi* y a los antígenos intracelulares de el hospedero, el sistema inmune reconoce epítopos cargados negativamente de ambos (Kahn, Kahn y Eisen, 1992).

I.5.D Antígenos candidatos para el diagnóstico de la enfermedad.

En las pruebas de inmunodiagnóstico se deben evitar reacciones falso positivos y negativos, más aún en los bancos de sangre, donde es importante tener una información fidedigna para que una unidad de plasma sanguíneo sea usada para transfundir. Debido a esto se deben identificar y purificar proteínas de alta especificidad y pureza para ser utilizados en inmunodiagnóstico.

Antígeno CRA y FRA. Se obtuvo un antígeno citoplásmico con secuencias repetidas (CRA) de epimastigotes y un antígeno flagelar también con secuencias repetidas (FRA), el cual se presenta en tripomastigotes y epimastigotes. Estos antígenos son altamente polimórficos en las cepas de *T. cruzi* que fueron estudiadas. Se utilizaron ambos antígenos en un ELISA y se obtuvo un 100% de especificidad y sensibilidad, cuando se combinan los dos antígenos en la prueba. Por esta razón se propusieron como candidatos para poder usarse en los bancos de sangre (Almeida y col., 1990).

Péptidos B-12 y 13. En otro estudio se obtuvieron la expresión de dos clonas aisladas de una librería genómica Lambda gt11 con suero de conejo hiperinmune infectado con tripomastigotes de cultivo atenuados, después de secuenciar se obtuvieron dos péptidos: B-12 con 20 aminoácidos repetidos y B-13 con 12 aminoácidos también repetidos. Los antígenos fueron comparados en otras cepas y clonas indicando una alta homología. Con estos antígenos se realizaron pruebas de RIA (radioinmuno ensayo), el cual indica que existe diferente reactividad a los antígenos por separado, en tanto que al combinarlos tienen una

alta especificidad. Se evaluaron frente a otras parasitosis siendo negativos a todas ellas, por lo que pudieran ser utilizados para las pruebas de diagnóstico (Zingales y col., 1990).

II.1 JUSTIFICACION.

La enfermedad de Chagas y su agente causal Trypanosoma cruzi, tienen gran importancia en los países Sudamericanos, debido a su alto índice de infección y mortalidad a diferentes edades. La identificación y caracterización de proteínas y glucoproteínas antigénicas del protozoario es un área de estudio importante; sin embargo en México la investigación básica, así como la referente a la caracterización y purificación de glucoproteínas, con respecto a esta enfermedad es muy escasa, debido a que se piensa que las condiciones del país, no son las óptimas para que la enfermedad de Chagas se disemine de forma tan crítica como en otros lugares y también porque una gran mayoría de los recursos se destinan al estudio de otras parasitosis. Sin embargo, existen reportes epidemiológicos muy recientes, que nos hablan de un 30 a un 60% de prevalencia en zonas endémicas, estas son áreas que cumplen con todos los requisitos para albergar a los vectores del protozoario; algunos otros reportes van más allá, ya que hablan de índices de infección en zonas semiurbanas y urbanas.

Otra de las razones para estudiar la enfermedad de Chagas en México es que se habla de una diferencia en la patogenicidad entre las cepas mexicanas de T. cruzi y las de otros países, sin embargo no existen datos experimentales que sustenten esta hipótesis. Aún con esta diferencia, cuando el parásito se ha establecido causa graves daños en el hospedero, al igual que lo hace una cepa proveniente de Brasil, Argentina o Venezuela.

Los estudios de los antígenos del agente causal de la enfermedad de Chagas, nos permitan ampliar la información referente a los aspectos biológicos e inmunológicos del protozoario.

Con la ayuda de las técnicas electroforéticas, inmunológicas y de biología molecular se han desarrollado investigaciones de antígenos recombinantes que se están experimentando en la inmunoprolifaxis en modelos animales que en un futuro se puedan utilizar en humanos. En particular, el presente trabajo se centra en la utilización de anticuerpos policlonales anti I. cruzi para la identificación de moléculas que pudieran tener una participación importante en los procesos inmunológicos entre el parásito y el hospedero, así como en el diagnóstico y profilaxis.

II. 2 OBJETIVOS.

II. 2. A Objetivo general.

Purificación y caracterización de un antígeno de la cepa mexicana Ninoa de Trypanosoma cruzi.

II.2.B Objetivos particulares.

Analizar la respuesta inmune humoral producida en conejos al administrar un extracto soluble de la cepa Ninoa de T. cruzi.

Utilizar anticuerpos policlonales para la identificación y purificación de un antígeno de una cepa mexicana de T. cruzi.

Caracterizar bioquímicamente el antígeno purificado.

Determinar si el antígeno puro es reconocido por enfermos chagásicos.

III. MATERIAL Y METODO

III.1 CULTIVO DE PARASITOS.

Se utilizaron parásitos Trypanosoma cruzi de las cepas Ninoa aislados de un paciente del Estado de Oaxaca, H1 aislado de un paciente del Estado de Yucatan, Z21 aislado de un armadillo en Yucatán y C₄ aislada de un triatoma en el Estado de Jalisco. Los epimastigotes se mantuvieron en medio de LIT (Liver Infusion Triptose) complementado con suero fetal bovino al 10% desactivado (GIBCO), con 25mg de hemina por cada 100 ml a 28°C. Para la preparación de antígenos los parásitos se expandieron en el mismo medio durante 15 días con agitación constante (Camargo, 1964).

III.2 PREPARACION DE EXTRACTOS.

III.2.A Extracto soluble.

Se cosecharon los parásitos a los 15 días de cultivo y se lavaron dos veces con amortiguador de fosfatos salino (PBS) pH 7.2 a 750 xg durante 15 min a 4°C. El botón obtenido se pesó y por cada gramo de peso húmedo se le agregaron 5ml de amortiguador Tris-HCl 10mM pH 8.2 . Se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas con una concentración final de: 5mM EDTA, 1mM PMSF, 100mM Leupeptina, 1mM Pepstatina. Se solubilizaron las proteínas con 1% NP40. Se agitó durante 15 segundos en vortex, se centrifugó a 13,000 xg durante 30 min a 4°C, al final se guarda el sobrenadante en alícuotas a -20°C y el botón se desechó. También se realizaron extractos solubles de las mismas cepas sin inhibidores (Harlow y Lane, 1988; Salusbury, 1990; Bollag y Edelstein,

1991).

III. 2.B Extracto total.

El cultivo, cosecha y lavado de los parásitos se realizó de la misma forma como se describió en el apartado anterior. Después de añadir la mezcla de inhibidores de proteasas, el rompimiento celular se realizó por medio de cuatro ciclos de congelamiento en nitrógeno líquido y descongelamiento a 37°C. Se centrifugó a 13,000 xg durante 30 min para separar los restos celulares. Finalmente el sobrenadante se recogió, fraccionó en pequeños volúmenes y congeló a -20°C hasta utilizarse (Salisbury, 1990; Bollag y Edelstein, 1991).

III.3 CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

Para la cuantificación de proteínas tanto de los extractos proteicos como del antígeno purificado por inmunofluorescencia y del antígeno Ninoa 65/60 electroeluido, se utilizó el método de Bradford (1976) en su presentación comercial distribuido por Bio Rad para el microensayo. Como blanco se utilizó PBS, para la curva patrón se utilizó albúmina 1mg/ml en PBS, en placa suave para ELISA, leyéndose el ensayo a 595 nm en un lector Bio-Rad Modelo 3550.

III.4 ANALISIS DE PROTEINAS.

El análisis de proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con SDS y en condiciones reductoras según la técnica reportada por Laemmli (1970), con 10µg de proteína por carril; los marcadores usados en cada experimento se especificaron en cada figura. Al término de la electroforesis los geles se fijaron y se tñieron con azul de coomassie al 0.05% y se destñieron con metanol al 20%, ácido acético al 7% para

visualizar las proteínas (Anexo I).

Cuando las proteínas se observaron con una baja intensidad, después de tñir con azul de coomasie, se procedió a realizar la tñción de plata con un kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio Rad)(Oakley, Kirsch y Morris, 1980).

III.5 PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES.

Para identificar moléculas antigénicas por medio de anticuerpos, se procedió a inmunizar conejos machos Nueva Zelanda de 1.8 kgr con 10 semanas de edad, que se sangraron por la vena marginal de la oreja antes de inmunizar para obtener suero control preinmune. En la primera inmunización se inyectó 1 mg/0.5 ml de proteínas del extracto soluble de la cepa Ninoa, más el mismo volumen de adyuvante completo de Freund, de la misma forma se preparó para la cepa C₄ y se inyectaron vía subcutanea en cuello y patas traseras. A los quince días se realizó una segunda inmunización con la misma cantidad de extracto más el mismo volumen de adyuvante incompleto de Freund, por la misma vía; la tercera inmunización se realizó quince días después en la misma forma que la anterior. Después de una semana se sangró por la vena marginal de la oreja. Posteriormente se alternó cada semana la inmunización con 1 mg de proteínas del extracto, sin adyuvante y el sangrado por la vena marginal de la oreja (Harlow y Lane 1986).

La sangre obtenida de los conejos se colectó en tubos para centrifuga de 50 ml. El suero se obtuvo dejando a temperatura ambiente la sangre durante una hora, se separa el coágulo con un aplicador de madera, se colocó a 4°C toda la noche y el resto de los eritrocitos se removieron por centrifugación a 500 x g durante 5 min., se dividió el suero en tubos

de microcentrifuga de 1.5 ml y se congeló a -20°C hasta utilizarse (Harlow y Lane, 1988; Goding, 1986).

III.6 PRUEBA DE ELISA.

Para verificar la existencia de anticuerpos policlonales anti cepas Ninoa y C_4 de *I. cruzi*, se realizó la prueba inmunoenzimática de ELISA. En placas de 96 pozos se colocaron $10\mu\text{g}$ /pozo de extracto crudo de la cepa Ninoa, se incubó durante dos horas en cámara húmeda a 37°C ; después se bloqueó con albúmina al 1% en PBS pH 7.2 durante 2 horas a 37°C , se añadió sueros de conejo anti *I. cruzi* de las cepas Ninoa y C_4 con diluciones seriadas desde 1:20 hasta 5120, se incubó durante toda la noche a 4°C , seguido por la adición de un segundo anticuerpo contra IgG de conejo unido a β galactosidasa (Sigma) diluido 1:2000 incubándose con este durante una hora a 37°C . Después de cada incubación se realizaron 3 lavados de 15 min cada uno con PBS-Tween 20 al 0.05%. Finalmente se reveló la reacción con el sustrato ortonitrofenil- β -D-Galactopironosido (ONPG) a una concentración de 0.9mg/ml en PBS. La reacción se detuvo con $50\mu\text{l}$ /pozo de bicarbonato de sodio (Na_2CO_3) 1 M y se leyó a 405 nm en un lector de ELISA Bio-Rad Modelo 3550 (Voller, Bidwell y Bartlett, 1979).

III.7 INMUNOTRANSFERENCIA A PAPEL DE NITROCELULOSA (WESTERN BLOT).

Para identificar el número y características de las moléculas antigénicas en los extractos solubles de las cepas Ninoa y C_4 se utilizó la técnica de Inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa (Western Blot) (Gershoni y Palade, 1982 y 1983). En geles de poliacrilamida

al 10% se separaron 100 μ g de proteína de extracto soluble de las cepas antes mencionadas. Al término de la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a papel de nitrocelulosa, se bloquearon las posibles uniones inespecíficas con albúmina al 1% en PBS, se cortaron 16 tiras de papel con 6.2 μ g de proteína cada uno, se incubaron con sueros de conejos hiperinmunizados anti Ninoa y anti C₄ a una dilución de 1:2000, posteriormente se añadió el conjugado anti IgG de conejo unido a peroxidasa, el cual se diluyó 1:2000; cada paso de incubación se alterno con seis lavados de 7 min cada uno con PBS-Tween 20 al 0.1%. Finalmente se agregó el sustrato 3'3-diaminobenzidina a una concentración de 0.5mg/ml en PBS y la reacción se detuvo con agua destilada (Anexo II).

III.8 PURIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI NINOA.

III.8.A Precipitación de anticuerpos.

A partir de un volumen total de 80ml de suero de conejo hiperimmune anti T. cruzi de la cepa Ninoa, se precipitaron los anticuerpos con una solución de sulfato de amonio saturada al 100% con un pH entre 6-7. El suero se colocó en un vaso de precipitado con agitación constante a baja velocidad, el sulfato de amonio se agregó gota a gota hasta alcanzar una concentración de un 40% del total de la solución. La solución se mezcló durante 2 horas a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4°C, esta solución se centrifugó a 7000 xg durante 15 min. Se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en PBS pH 7.2, repitiéndose este procedimiento en tres ocasiones. Finalmente los anticuerpos se resuspendieron en PBS y se dializaron durante 24 hrs con cinco cambios frente a el mismo amortiguador (Goding, 1986).

III.8.B Purificación de IgG por Sefarosa-Proteína A.

Las inmunoglobulinas precipitadas con sulfato de amonio, se purificarón en una columna de afinidad de Sefarosa-proteína A (Sigma), una cantidad de 20 ml de anticuerpos con una concentración de 1.4 mg/ml, se aplicó a una columna de 2 ml con una velocidad constante de 0.1 ml/min, se lavó con PBS pH 7.2 el exceso de proteína; cuando la densidad óptica llegó a el valor 0.05 o menos, se comenzó a eluir con glicina 0.1 M pH 2.5 hasta colectar 20 tubos de 1 ml, los cuales contenían 300µl PBS 20X pH 6.2, para neutralizar el pH de la solución de glicina. La lectura de la densidad óptica de las muestras colectadas se registraban directamente a través de una lámpara de UV a 280 nm y un graficador que están conectados a un cromatógrafo automático (Econo Sistem Controller de Bio-Rad), también se leyeron en espectrofotómetro para precisar con más exactitud el pico de anticuerpos eluidos. El anticuerpo recuperado se dializó frente a un amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 8.5 y se concentró en membranas de dialisis (Spectra/por 2, 12,000-14,000 MW) con aquazide (Goding, 1986).

III.8.C Reactividad del anticuerpo purificado.

Para analizar la pureza de la IgG anti cepa Ninoa, estos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, en condiciones reductoras y para verificar su actividad se realizó una electrotransferencia a papel de nitrocelulosa utilizando como antígeno a extractos de las cepas Ninoa, C₄, Yuc H1 y usando un conjugado anti-IgG de conejo unido a peroxidasa diluido 1:2000, finalmente se reveló con 3'3-diaminobenzidina, (Anexo II).

III.9 INMUNOABSORBENTE.

III.9.A Acoplamiento de IgG anti-T. cruzi.

La concentración de IgG anti-Ninoa se determinó a partir de la densidad óptica medida a 280nm de acuerdo a la siguiente relación: 1.4 de densidad óptica equivalente a 1mg/ml de Inmunoglobulina en solución y también por cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976). Para la elaboración de la columna de afinidad se utilizaron 43.65 mg de IgG anti cepa Ninoa, en solución de amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 8.5, las cuales se acoplaron a la resina de la siguiente forma: dos mililitros de la resina Affi-gel 10 (Bio-Rad) se resuspendieron y colocaron en un filtro de cristal (Buchner), se lavó con 20 volúmenes de agua desionizada a 4°C. La resina y las inmunoglobulinas se mezclaron en 6 ml de amortiguador de carbonatos con agitación constante a 4°C por cuatro hrs, en las mismas condiciones de agitación después se agregó 0.1 ml de etanolamina-HCl 1 M pH 8, y se incubó durante una hora, para bloquear los grupos activos restantes. Para determinar la cantidad de proteína acoplada, se resta de la cantidad de proteína colocada inicialmente, la proteína recuperada al final. Al termino, la resina se colocó en una columna y se lavó con amortiguador de carbonatos; también se pasaron 10 volúmenes de glicina 0.1 M pH 2.5 para asegurar que los anticuerpos no pegados covalentemente se lavaran y no interfirieran posteriormente durante la cromatografía. Finalmente se equilibró con amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 8.5 (Cuatrecasas, 1970; Según manual provisto por el distribuidor; Prickett, Amberg y Hopp, 1989).

III.9.B Cromatografía de afinidad.

La columna de inmunoafinidad de 2ml, se incubó con 2.5 ml de antígeno (extracto total) de la cepa Ninoa con una concentración 3.5 mg/ml de proteína durante toda la noche a 4°C, en posición horizontal y con agitación. Al siguiente día se colectó lo que no se pegó a la columna y se lavó el exceso de proteína con amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 8.5; la elución se realizó con glicina 0.1 M pH 2.5 y NaCl 1 M pH 5, colectándose fracciones de 1 ml. La solución de glicina se neutralizó con 300 µl PBS 20X pH 6.2. Después la columna se llevó a su pH original con amortiguador de carbonatos, se guardó con el mismo amortiguador más 0.02% de ácido de sodio a 4°C, para su uso posterior. La columna antes de usarse nuevamente se lavó con el amortiguador de equilibrio sin conservador. Las fracciones que contenían la mayor lectura a 280 nm se agruparon, se concentraron 10X en conos de amicon CF25. Finalmente se dializaron en membranas (Spectra/por 2, 3,000 MW) frente a PBS y agua desionizada. Se les determinó la concentración de proteína por el método de Bradford,(1976). Las muestras se mantuvieron a -20°C en alícuotas para su posterior análisis (Carbonetto y col., 1990 y Prickett, Amberg y Hopp, 1989; Bollag y Edelstein, 1991). Todo el trabajo de purificación tanto de IgG, como del antígeno se realizó con un equipo de cromatografía Bio-Rad Econo Sistem Controller modelo 220 V.

III.10 ELECTROELUSION.

Las proteínas purificadas por afinidad, se separaron por electroforesis en geles preparativos de poliacrilamida de 1.5 mm de grosor al 10%, con el mismo procedimiento descrito en el Anexo I. Al término de la electroforesis se cortaron los marcadores de peso molecular

colocados al principio y al final del gel, y se tiñeron con azul de coomasie para identificar la banda a cortar, mientras tanto el gel se dejó en refrigeración a 4°C con amortiguador para eluir. Después de la identificación de las proteínas en las tiras teñidas, estas se alinearon con el resto del gel y se cortó la banda de interés; esta se dividió en cuadritos de 1X1 cm y estos se colocaron en amortiguador de Tris 0.1M, Glicina 0.768M y SDS al 0.4% pH 8.3 como solución eluyente, se recibió la proteína en amortiguador Tris 0.1M 4X pH 8.3. La electroelusión se realizó en Sixpac Eluter Ge 200 (Hoefel Scientific Instruments) (Bollag y Edelstein, 1991; Instrucciones GE 200 del Fabricante). La proteína recuperada se dializó en membranas (Spectra/por 2, 3,000 MW) frente a PBS y agua desionizada. Finalmente se concentró 10 veces en un evaporador Savant modelo Speed Vac Concentrar SVC 100 H. A este antígeno se le llamo AgNi 65/60.

III.11 GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES REDUCTORAS.

El análisis del antígeno purificado se realizó por medio de SDS-PAGE en condiciones reductoras. En geles de poliacrilamida al 10% con SDS, se colocaron 10µg por pozo del extracto total soluble, del antígeno purificado por afinidad y del AgNi 65/60 previamente mezclado con el amortiguador que contiene 2-β-mercaptoetanol. Al término de la electroforesis el gel se fijó, se tiñó en azul de coomasie y destiñó, para la visualización de las proteínas separadas, también se utilizó tinción de plata (Laemmli, 1970)(Anexo I).

III.12 GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NO REDUCTORAS.

Para el análisis del antígeno en condiciones no reductoras se prepararon geles de poliacrilamida al 8% el gel separador y al 5% el gel concentrador, para la corrida del gel se utilizó el mismo amortiguador como en las condiciones reductoras (Anexo I), pero las muestras se prepararon con el siguiente amortiguador: Tris 1M, glicerol 50%, azul de bromofenol al 1% y SDS al 2% pH 6.8 sin hervir, utilizando las mismas condiciones de corrida que los geles en condiciones reductoras. Se tiñó de la misma manera como para los geles en condiciones reductoras. Los marcadores utilizados fueron los no teñidos (SDS-PAGE Bio-Rad) de alto peso molecular que van desde los 200 kDa hasta 40 kDa (Reisfeld, Lewis y Williams, 1962).

III.13 REACCION SHIFF-PAS.

Para la detección de glucoproteína se realizó una reacción de Shiff (Pas-Shiff). Después de una electroforesis en condiciones reductoras, el gel se colocó en ácido tricloroacético al 10% a 4°C toda la noche, se cambio a ácido acético al 7% durante 30 min temperatura ambiente con agitación, luego se paso a ácido peryodico al 0.2% a 4°C durante 45 min. Después se lavó una vez con ácido acético al 7% e inmediatamente se colocó en el reactivo de Shiff y refrigeró a 4°C durante toda la noche. Se cambió a temperatura ambiente hasta observar una coloración rosada intensa, la visibilidad de las bandas se incrementa con 2 o 3 lavados con ácido acético al 10% (Segrest and Jackson, 1972) (Anexo III).

III.14 DETECCION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.

La detección de actividad enzimática se realizó con geles de poliacrilamida al 10% con gelatina al 1% incorporada en el gel separador como sustrato, el gel concentrador se preparó al 5% de acuerdo a la metodología de Laemmli (1970). Las muestras se prepararon 1:1 volumen con el siguiente amortiguador: 2.5% SDS, 1% sacarosa, 20% glicerol y 4mg/ml de rojo de fenol, sin hervir. El amortiguador para la electroforesis fué: 0.025M Tris, 0.192M glicina, 0.1% SDS pH 8. Los geles se corrieron con un máximo de 100 volts constantes. Al termino de la corrida el gel se colocó en una solución de Triton X 100 al 2.5% durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Después se incubó a 37°C durante 2 horas con una solución de glicina 0.1M pH 8.3. Finalmente se tiñó con amido negro 0.1%, la actividad enzimática se detectó con la aparición de bandas translúcidas que indican que se ha degradado el sustrato (Heusen and Dowdle, 1980), (Anexo IV).

III.15 DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI AG NI 65/60.

Para determinar si existía reconocimiento de la proteína purificada (AgNI 65/60) por sueros de conejos y ratones inmunizados, ratones infectados y humanos con enfermedad de Chagas se utilizó la técnica de electrotransferencia a papel de nitrocelulosa utilizando 100µg de proteína de AgNI 65/60 por la técnica de Western Blot descrita anteriormente.

También se probó el antígeno con suero de personas infectadas con otros parásitos: 3 con toxoplasmosis, 3 con amibiasis, 5 con teaniasis, 12 con leishmaniasis, 7 con cisticercosis.

III.16 PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTI ANTIGENO 65/60.

Para la producción de anticuerpos anti-AgNi 65/60 en ratones, se preparaba la proteína de la siguiente manera: en geles preparativos de poliacrilamida al 10% de 1.5 mm de grosor en condiciones reductoras (Anexo I), se corrieron 300 μg de antígeno purificado por cromatografía, para visualizar los antígenos como fue descrito anteriormente (electroelusión, apartado III.10), se cortaron los geles en el área donde se localiza el antígeno 65/60. El gel se homogenizó pasándolo a través de agujas de diferentes calibres. Con esta preparación se tomaron 100 μl que contenían aproximadamente 50 μg de proteína.

Para la producción de anticuerpos anti-AgNi 65/60 de I. cruzi, se utilizaron ratones hembras Balb/c de 8 semanas de edad, los animales previamente habían estado en cuarentena y se sangraron por la vena ocular con capilares heparinizados como anticoagulante. Se les administró vía intraperitoneal 50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ del homogenado de AgNi 65/60, añadiendo el mismo volumen de adyuvante completo de Freund. A los quince días se les aplicó nuevamente la misma preparación, por la misma vía. Quince días después se inyectaron 200 μl del homogenado sin adyuvante y una semana después se sangraron por la vena ocular para obtener suero (procedimiento previamente descrito en el apartado III.5) y verificar la existencia de anticuerpos anti AgNi 65/60 por Western Blot.

III.17 INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA.

Para la localización del Ag Ni 65/60 en el parásito, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con la metodología siguiente: los epimatigotes de la cepa Ninoa de I. cruzi se cultivaron durante ocho días. Los parásitos se lavaron dos veces con PBS albúmina,

se contaron y se ajustaron a un millón de parásitos en 100µl de PBS. En cubreobjetos limpios se colocan cien mil parásitos dejándose secar al aire. Se fijaron con metanol absoluto durante 5 min, se lavaron dos veces con PBS y agua desionizada. Se colocaron en cámara húmeda y se añadió el suero de ratón anti NI 65/60 diluido 1:50 en PBS albúmina al 0.5% más IgG normal de conejo al 0.1%, en un volumen total de 100µl, se incubó a 37°C durante 30 min, se lavó tres veces con PBS filtrado y una vez con agua desionizada. Se agregó un conjugado anti ratón IgG biotinilado (Amersham) diluido 1:500, en el mismo amortiguador, incubando a 37°C durante 30 min, nuevamente se lavarón con PBS tres veces y una con agua desionizada. Después se añadió el sustrato estreptoavidina-fluoresceína (Amersham) diluido 1:500 en PBS, incubando a 37°C durante 30 min en obscuridad. Finalmente se lavarón tres veces con PBS y una con agua desionizada. Las preparaciones se dejaron secar al aire en obscuridad y se montan en cubreobjetos. Se observaron en microscopio para fluorescencia y se fotografiaron (Nickon, Modelo Optiphot).

IV. RESULTADOS

Los resultados de la presente investigación se describen a continuación.

IV.1 CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA INMUNE EN CONEJOS.

IV.1.A Identificación de proteínas constitutivas.

La concentración de proteínas obtenidas para las cepas analizadas fue la siguiente: Cepa Ninoa, 2.6mg/ml; C₄, 0.45mg/ml; Yuc H1, 1.6mg/ml y Z21, 1.7mg/ml calculada por el método de Bradford (1976).

Con estos datos se realizó un análisis de los componentes proteicos por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras utilizando 10µg de proteínas de los extractos. Observándose que la distribución de las proteínas se encuentran desde los 116 kDa y menores a los 26.6 kDa de masa molecular, que corresponde a los marcadores utilizados. Encontrándose diferencias entre la cantidad y abundancia de las proteínas solubilizadas en las diferentes cepas, dependiendo también de la presencia o no de inhibidores de proteasas (Fig. 1). Aún cuando se observó, en el análisis electroforético que los extractos solubles de las cepas Ninoa (Fig. 1,B) y H1 (Fig. 1,C) sin inhibidores de proteasas, presentaban un mayor número de bandas proteicas, se decidió que durante el proceso se utilizarían los extractos con inhibidores, debido a que las proteínas sufren menor degradación al paso del tiempo en que permanecen congeladas.

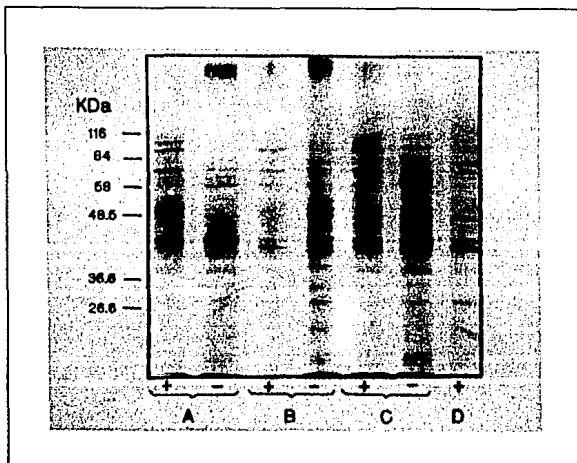


Figura 1. Análisis de proteínas constitutivas de cepas de *T. cruzi* en SDS-PAGE. Extractos solubles obtenidos con NP-40 al 1% (10 µg), fueron separados en gels de poliacrilamida al 10% con SDS y mercaptoetanol, los gels se tiñeron con azul de comasie. Los extractos se prepararon en presencia (+) y ausencia (-) de inhibidores de proteasas. A:Cepa C₄, B:Cepa Ninoa, C:Cepa Yuc H1 y D:Yuc Z21.

IV.1.B Análisis antigénico de las proteínas.

Con los extractos solubles de la cepa C₄ y Ninoa se produjeron anticuerpos policlonales en conejos Nueva Zelanda. Los sueros fueron analizados por la prueba de ELISA, se observó que las dos cepas son capaces de producir la formación de anticuerpos anti-*T. cruzi*, después de tres inmunizaciones con 1 mg del extracto más adyuvante completo de Freund. Los antisueros obtenidos contra las cepas de *T. cruzi* reconocen a los antígenos

C₄ y Ninoa hasta una dilución de 1:640, en tanto que los sueros preinmunes no reaccionaron con los extractos del parásito (Fig. 2). El antisuero anti cepa Ninoa es el que presentó los valores más altos de densidad óptica, 1.3 y 1.1 tanto frente al antígeno de la cepa C₄, como ante el de la cepa Ninoa, lo que indica que estas cepas comparten moléculas antigénicas.

Con estos antisueros de conejos positivos a T. cruzi se empezó la caracterización de las proteínas antigénicas por medio de la técnica de Western Blot. En la figura 3,B se observa que el suero anti C₄ reconoce por lo menos 14 antígenos en el extracto de la cepa Ninoa, de las bandas más evidentes se pueden mencionar las siguientes: 100, 84, 80, se observan por lo menos seis bandas en el área del marcador de 58, 49kDa y una banda muy evidente en el área de 45kDa. El antisuero homólogo contra la cepa Ninoa reconoce también varias bandas de peso moleculares muy parecidas a las antes mencionadas, además de que aparece una banda muy clara de 50kDa que no se observó con el suero anti-C₄, con este antisuero también se identificó la banda de 45 kDa como la más evidente, (Fig. 3,C). Debido a los resultados obtenidos en las dos pruebas anteriores y por la disponibilidad de el material biológico en el laboratorio, se seleccionó determinó que se continuaría trabajando con la cepa Ninoa para la purificación de proteínas antigénicas.

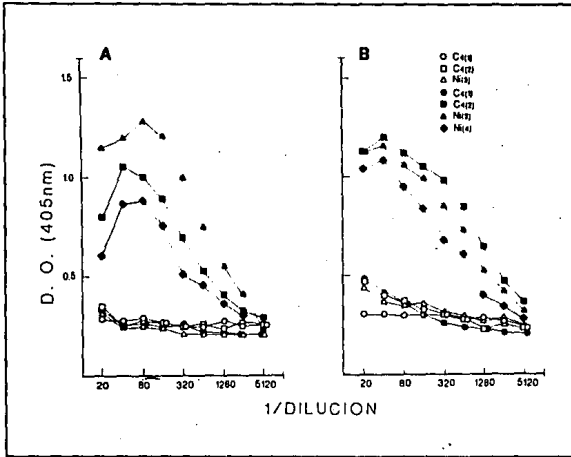


Figura 2. Análisis de la respuesta de anticuerpos anti-*T. cruzi* por medio del ensayo de ELISA. Las microplacas fueron sensibilizadas con 100 μ g de antígeno de las cepas C₄ (A) y de la cepa Ninoa (B). Los sueros anti-*T. cruzi* fueron diluidos desde 1:20 hasta 1:5120. Se agregó un segundo anticuerpo anti conejo unido a β -galactosidasa a una dilución 1:2000 y se usó como sustrato orto-nitrofenil-B-D-galactopiranosido a una concentración de 0.9 mg/ml. En la figura están representados 4 diferentes conejos inmunizados, dos de ellos con el extracto de la cepa Ninoa y dos más con extracto de la cepa C₄. Los sueros preinmunes y antisueros después de tres inmunizaciones.

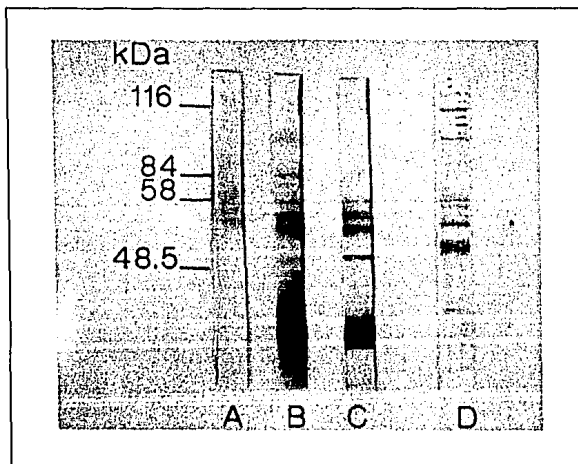


Figura 3. Caracterización de proteínas antigénicas reconocidas por suero de conejo inmunizados. Proteínas de la cepa Ninoa se separaron en geles de poliacrilamida con SDS y mercaptoetanol y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Las proteínas transferidas se incubaron con suero control preinmune (A), suero de conejo anti cepa C₄ (B) y suero de conejo anti cepas Ninoa (C) diluidos 1:2000 y en (D) extracto de la cepa Ninoa. Posteriormente se agregó un anticuerpo anti conejo unido a peroxidasa diluido 1:2000, finalmente se agregó 3'3-diaminobenzidina como sustrato.

IV.2 CONSTRUCCION DEL IMMUNOABSORBENTE.

IV.2.A Purificación de las IgGs anti cepa Ninoa.

La purificación de las inmunoglobulinas anti T. cruzi se realizó en varios pasos, en la figura 4 se observa una gráfica típica de purificación de anticuerpos IgG, por cromatografía de afinidad a proteína, los cuales fueron eluidos con Glicina 0.1 M pH 2.5, recuperando un promedio de 7 mg de inmunoglobulina IgG por cada 28 mg de inmunoglobulinas totales aplicadas a la columna.

IV.2.B Análisis de IgGs purificadas.

Para determinar el grado de pureza de las inmunoglobulinas, estas se analizaron en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras. Se observan las cadenas pesadas y ligeras que componen las inmunoglobulinas IgG (fig. 5,B). Para determinar que las inmunoglobulinas puras seguían reconociendo a los antígenos del parásito después del proceso de purificación, se realizaron un Western Blot. Observándose que las IgGs anti Ninoa, mantuvieron la misma actividad de reconocimiento a antígenos de la cepa Ninoa que presentaban antes de la purificación. Como controles se utilizaron a la misma dilución un suero preinmune e IgG normal purificada de suero de conejo (Fig. 6). Se realizó un experimento similar con proteínas de las cepas C₄ y H1. Se observó el mismo resultado de reconocimiento de antígenos que el observado con el suero hiperinmune antes de purificar. Los antígenos reconocidos por estas inmunoglobulinas fueron muy parecidos en las cepas probadas, localizándose las bandas principales en el área de 45 a 50 kDa y en el área de 60 kDa a 80 kDa. Con el extracto de la cepa Yuc H1 se observó una

banda muy marcada de aproximadamente 60 kDa (fig. 7).

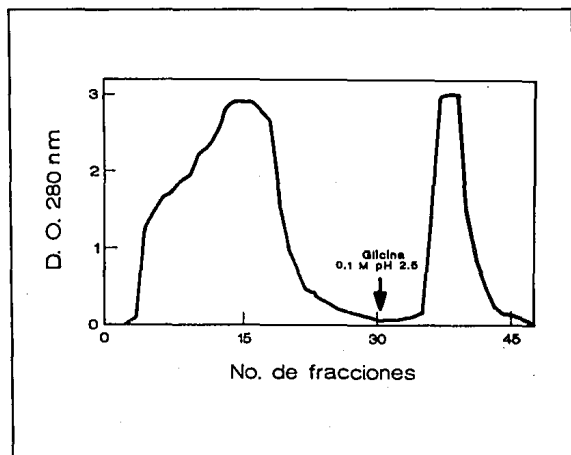


Figura 4. Purificación de inmunoglobulinas IgG anti cepa Ninoa por cromatografía de afinidad en proteína A. Las inmunoglobulinas precipitadas en sulfato de amonio saturado al 40%, se pasaron por una columna de cromatografía de afinidad a proteína A. El lavado de proteína no retenida se hizo con amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 8.8. La elusión de la proteína retenida se realizó con glicina 0.1 M pH 2.5. La IgG total fue eluida entre las fracciones 35 y 43.

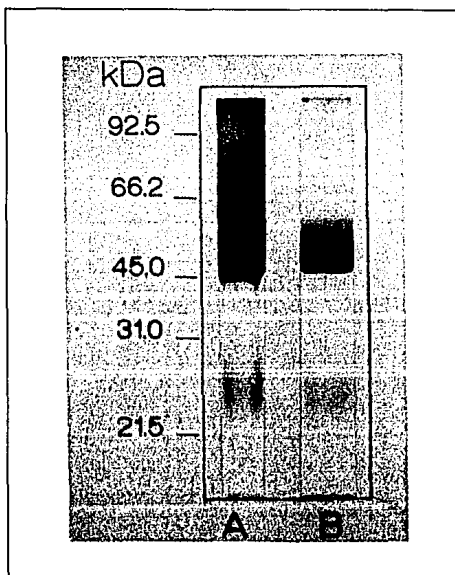


Figura 5. Análisis de IgG purificadas por cromatografía anti cepa Ninoa en SDS-PAGE. En (A) Inmunoglobulinas totales precipitadas en sulfato de amonio saturado y en (B) IgG pura anti cepa Ninoa después de la cromatografía en sefarosa proteína A.

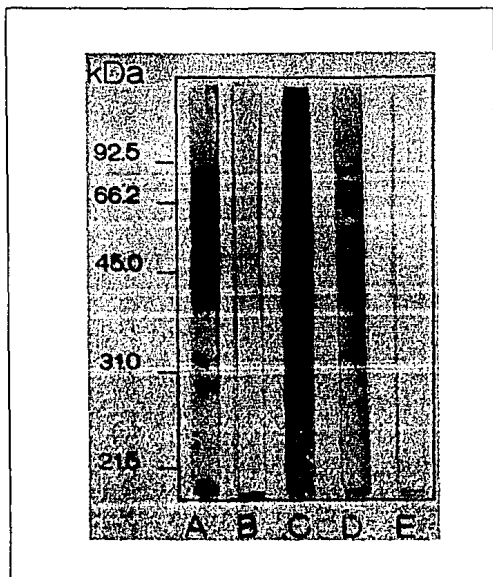


Figura 6. Análisis de la actividad de IgGs puras anti cepa Ninoa por medio de Western Blot. Extractos totales de la cepa Ninoa se separaron en geles de acrilamida con SDS y mercaptoetanol, posteriormente se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Se cortaron tiras con 5 μ g de antígeno y se incubaron con: B) suero preinmune, C) suero hiperinmune anti cepa Ninoa, D) IgG pura, E) IgG normal. Los sueros fueron diluidos 1:1000, se añadió un segundo anticuerpo IgG anti conejo unido a peroxidasa diluido 1:2000, la reacción se reveló con 3'3-diaminobenzidina 0.5 mg/ml en PBS. A) Extracto crudo de la cepa Ninoa usada como antígeno.

IV.2.C Columna de cromatografía de afinidad.

Después de incubar los anticuerpos con la resina siguiendo las indicaciones de los

fabricantes, se calculó la eficiencia de acoplamiento por la diferencia de la concentración de proteínas inicial y la concentración final, siendo esta de un 87%.

IV.3 PURIFICACION DEL ANTIGENO NINOA DE 65/60 kDA (Ni 65/60).

IV.3.A Purificación de los Antígenos de la cepa Ninoa

Con la columna de affigel 10-anti Ninoa al incubar el extracto total del parásito y eluir la proteína adsorbida se obtuvieron dos picos: pico I entre las fracciones 27 y 35 (glicina 0.1 M pH 2.5) y el pico II entre las fracciones 47 y 51 (NaCl 1 M pH 5). En la figura 8 se muestra una gráfica representativa del proceso de purificación en la cromatografía de afinidad.

En la tabla no. I, se encuentra especificada la recuperación de proteínas obtenidas de la columna de afinidad en cuatro experimentos diferentes, al incubarse extracto fresco de T. cruzi, obteniéndose que del 100% de proteínas se eluye de la columna un promedio de 3.15% de proteína de ambos picos.

IV.3.B Análisis de los AgsNi en geles de poliacrilamida.

Los picos I y II purificados (fig. 8) se analizaron en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras, se observó que ambos picos presentaban un doblete de 65-60 kDa, además se observó una de menor intensidad con un peso molecular de 40 kDa, después de hacer un pool de los dos picos (fig. 9).

Para verificar si esta fracción purificada era reconocida por sueros de personas infectadas se realizó un Western Blot utilizando como antígeno un pool de los picos I y II,

enfrentándose a suero normal de humano y a un suero de enfermo chagásico crónico.

Se pudo observar que los anticuerpos presentes en el suero de humano infectado

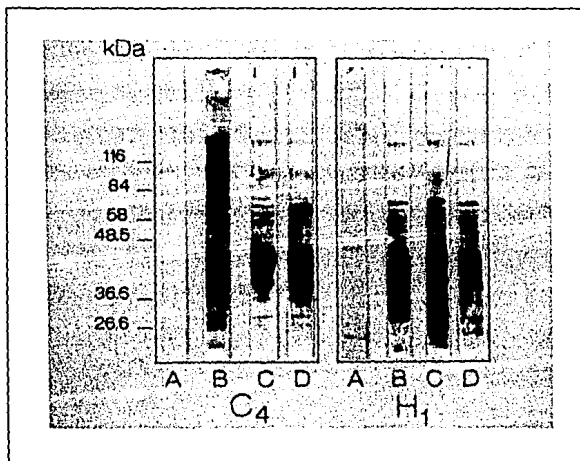


Figura 7. Reconocimiento antigénico de la IgG anti cepa Nino a copas C₄ y H1 en Western Blot. Se realizó el Western Blot como se describió en metodología, utilizando 5 µg/tira de papel de extracto de los aislado C₄ y Yuc H1. Las tiras de papel se incubaron con: A) suero preinmune, B) suero hiperinmune anti cepa Nino, C) inmunoglobulinas anti Nino precipitadas en sulfato de amonio y D) IgG puras anti Nino.

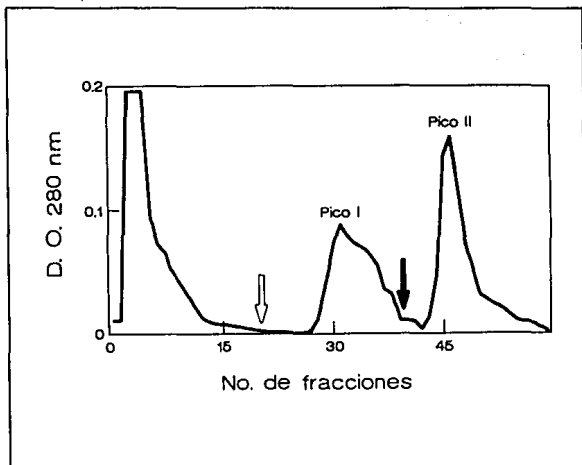


Figura 8. Purificación de los Antígenos Ninoa (Ag-Ni) por cromatografía de afinidad en Affigel 10 anti Ninoa. La columna de afinidad se incubó con 2 ml de extracto de la cepa Ninoa durante toda la noche a 4°C, se eluyó con glicina 0.1 M pH 2.5 y NaCl 1.0 M pH 5.0 a una velocidad constante de 0.5 ml/min. En la gráfica se observan dos diferentes picos de absorvancia a 280 nm, obtenidos con la elusión con Glicina (pico I) y la elusión con NaCl (pico II).



La  indica la aplicación de glicina y la  indica la aplicación del NaCl.

TABLA 1
RECUPERACION DE PROTEINAS DE LA COLUMNA DE
AFINIDAD AFFI GEL 10-ANTI NINOA.

EXPERI MENTO		Total de proteína	%
1	Extracto* Inicial	8.75	100
	Pico I*	0.123	1.40
	Pico II*	0.183	2.09
	Tot. I + II	0.306	3.49
2	Extracto Inicial	8.75	100
	Pico I	0.123	1.40
	Pico II	0.135	1.54
	Tot. I + II	0.258	2.94
3	Extracto Inicial	8.75	100
	Pico I	0.162	1.85
	Pico II	0.204	2.33
	Tot. I + II	0.366	4.18
4	Extracto Inicial	7.75	100
	Pico I	0.142	1.83
	Pico II	N.D.	
	Tot. I + II	0.142	1.83
	Promedio Extracto	8.5	100
	Promedio I + II	.268	3.15

*La determinación de proteínas del extracto total y de los picos I y II se realizó por el método de Bradford.

reconocen además del antígeno de 65-60 kDa, un antígeno de 40 kDa y otro de 28 kDa, más una banda adicional de aproximadamente 90 kDa (Fig. 10). Debido a que la banda de 65/60 fue más abundante en las fracciones obtenidas de la cromatografía se determinó purificar este antígeno, los resultados se dan a continuación.

IV.3.C Electroelución y análisis del Ag Ni 65/60 kDa.

El pool de ambos picos I y II, se separó en geles preparativos de poliacrilamida en condiciones reductoras para electroeluir el antígeno de 65-60 kDa. Una vez electroeluido el antígeno se analizó en geles de poliacrilamida con SDS y en condiciones reductoras, (Fig. 11, A y B), observándose sólo el doblete 65-60 kDa. El mismo antígeno electroeluido se analizó en geles de acrilamida en condiciones no desnaturizantes observándose una sola banda de aproximadamente 120 kDa, (Fig. 11, C y D). En la tabla 2 se especifica la recuperación de proteína del antígeno de 65/60 kDa al electroeluirlo de los AgsNi, obteniéndose un mínimo del 59.8% y un máximo de 86.4% de rendimiento.

IV.4 CARACTERIZACION DEL ANTIGENO 65/60.

Para caracterizar bioquímicamente la naturaleza del AgNi 65/60 se realizó una tinción de Schiff que identifica glicoproteínas. Se observó que el AgNi 65/60 presentó una reacción positiva, se utilizó como control de la prueba IgGs puras (fig. 12).

También en geles de poliacrilamida con 1% de gelatina como sustrato se intentó determinar si el AgNi 65/60, presentaba actividad enzimática. Los AgsNi mostraron una actividad enzimática en 60 kDa y 40 kDa. Sin embargo, en el AgNi 65/60 no se presenta actividad

enzimática (Fig. 13).

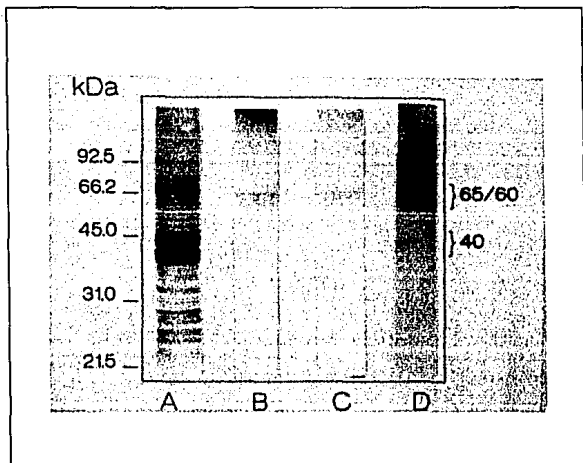


Figura 9. Análisis de los picos I y II en SDS-PAGE. Los picos I y II purificados por cromatografía de afinidad se dializaron, concentraron y fueron analizados en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras. A) extracto original de la cepa Ninoa, B) pico I, C) pico II, D) pool de pico I y II.

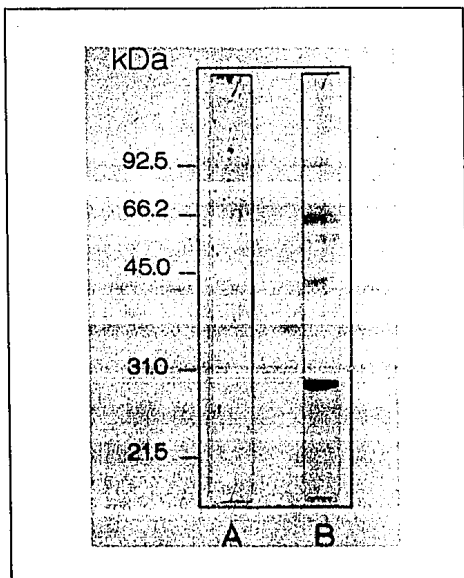


Figura 10. Detección de Antígenos purificados por cromatografía de afinidad por Western blot. El pool de los picos I y II se separaron en electroforesis con SDS en condiciones reductoras, después las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa y las tiras de papel se incubaron con un suero normal de humano (A) y con suero de enfermo con chagas en fase crónica, con una dilución 1:500, se colocó un conjugado anti humano unido a peroxidasa y se reveló con 3'3-Diaminobenzidina.

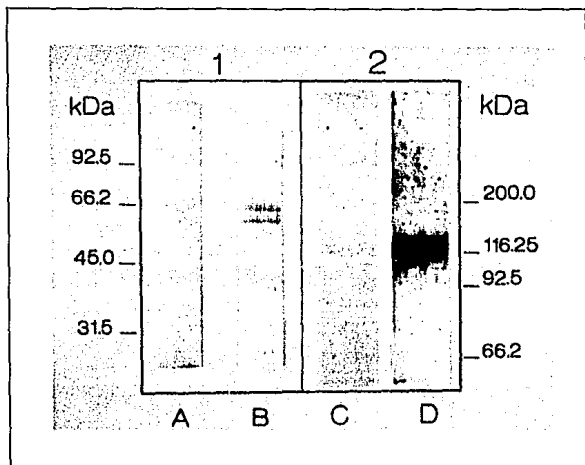


Figura 11. Análisis en gels de poliacrilamida del AgNi 65/60 electroeluido. Los antígenos purificados por inmunofinidad se separaron en gels preparativos de poliacrilamida con SDS y mercaptoetanol para electroeluir el antígeno de 65-60 kDa. Para el análisis del antígeno después de la electroelusión se prepararon gels de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras (1): A) AgNi 65/60 teñido con azul de comasie, B) Ni 65/60 teñido con plata. En gels de poliacrilamida al 8% con SDS en condiciones no desnaturizantes (2): C) Ni 65/60 con azul de comasie y D) AgNi 65/60 en plata.

TABLA 2

RENDIMIENTO DE RECUPERACION EN LA ELECTROELUSION DEL AgNi 65/60.

EXPERI MENTO		Total Prot. (μg) ²	Prot. Electro eluida(μg) ³	%
1	AgsNi ¹	300.8		100
	AgNi65/60		240	79.8
2	AgsNi	300.8		100
	AgNi65/60		180	59.8
3	AgsNi	300.8		100
	AgNi65/60		260	86.43
4	AgsNi	300.8		100
	AgNi65/60		236	78.4

1:AgsNi: Antígenos purificados por cromatografía de afinidad.

2:Cantidad máxima de proteína colocada por gel para electroeluir.

3:Cantidad de proteína obtenida por electroelusión.

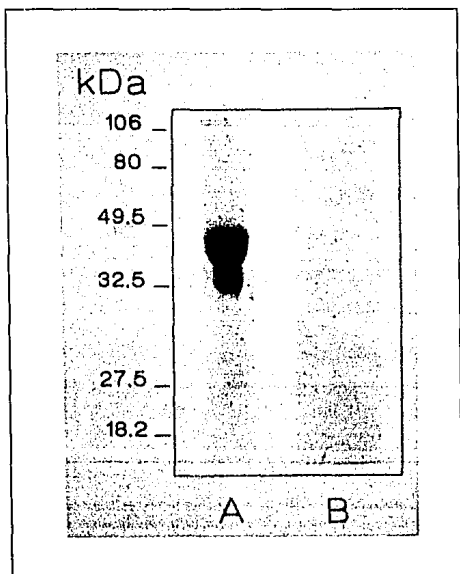


Figura 12. Reacción de Schiff-Pas del AgNi 65/60. En gels de poliacrilamida en condiciones reductoras, el gel se colocó en TCA al 10%, se pasó a ácido periodico, se cambió al reactivo de Schiff y finalmente se aclaró con ácido acético; A) Control glicoproteína (IgG), B) AgNi 65/60. Se utilizarón los estándares de bajo peso molecular preñados de 106 kDa a 18.5 kDa, Bio Rad.

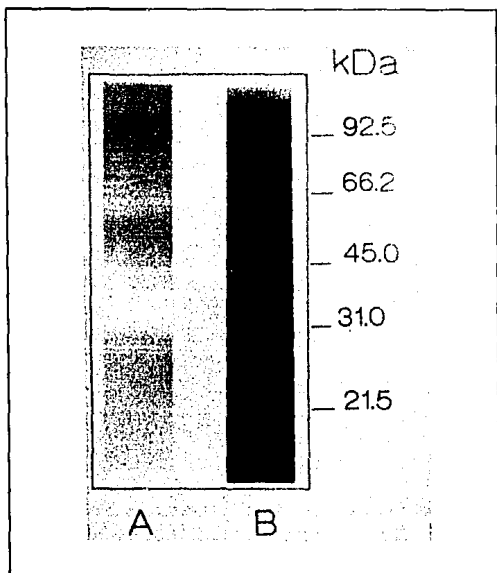


Figura 13. Detección de actividad enzimática de los antígenos NinoA y el antígeno de 65/60 kDa en gels de poliacrilamida. Se determinó la existencia de actividad enzimática en los antígenos purificados en el gel con 1% de gelatina como sustrato, el proceso en detalle se describe en el Anexo IV. En A) se muestran los AgsNi purificados por cromatografía de afinidad, mostrando actividad enzimática en el área de 60 kDa y 40 kDa, en B) AgNi 65/60 después de electroeluir.

IV.4.A Reactividad de los anticuerpos murinos.

La reactividad de los anticuerpos anti el AgNi 65/60 se verificó en Western Blot, tanto con el extracto total de la cepa NinoA, como con la proteína electroeluida, los cuales

fueron transferidos a papel de nitrocelulosa.

Cuando se utilizó el antígeno Ninoa 65/60 purificado se encontró que el anticuerpo murino reconoció las 2 bandas de 60/65 kDa, que fueron inyectadas, (fig. 14.E). Aún más cuando el mismo anti suero se enfrentó a antígeno total de Ninoa se encontró que este reconoció principalmente el doblete de 65/60 (fig. 14 y 15).

IV.4.A Localización del antígeno Ninoa 65/60 en el parásito.

Con los anticuerpos policlonales producidos en el ratón frente a el antígeno Ninoa 65/60 se realizó la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la localización del mismo antígeno en el protozoario. La prueba de IFI, se realizó utilizando como control negativo un suero normal de ratón, y como control positivo un suero hiperinmune anti cepa Ninoa. En la preparación con el control positivo de suero hiperinmune, los parásitos presentan una fluorescencia intensa en la totalidad del organismo, sin definición de alguna de las estructuras internas, (fig. 16.B) en tanto que el suero normal es totalmente negativo, (fig. 16.D). En las preparaciones con los anticuerpos policlonales anti-antígeno 65/60 kDa, se observó que los tres sueros de los ratones, reconocieron una estructura interna en parásito, en la figura 16.F se muestra sólo el suero que corresponde a el ratón 5 denominándose anti antígeno Ni 65/60₁₆₁. Se observa que la estructura que fluoresce en el interior del protozoario con mayor intensidad; se presenta hacia la parte anterior a la media principalmente, ya que en algunos se presenta en la parte posterior del organismo.

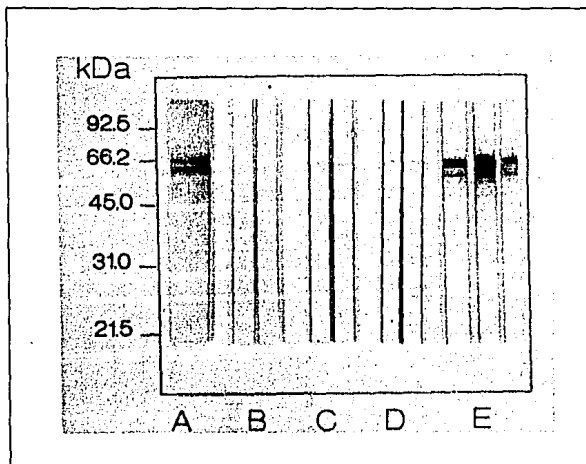


Figura 14. Reconocimiento del antígeno 65/60 por sueros de ratón en Western Blot. Se transfirieron 5µg del AgNi 65/60 a papel de nitrocelulosa, y se incubaron con sueros de ratón en una dilución 1:400. A) AgNi 65/60 transferido a el papel de nitrocelulosa, B) suero preinmune, C) suero hiperinmune anti cepa Ninoa, D) suero de ratón infectado con la cepa Ninoa y E) anti AgNi 65/60. Se agregó un segundo anticuerpo anti ratón IgG unido a peroxidasa y se usó como sustrato 3'3-Diaminobenzidina.

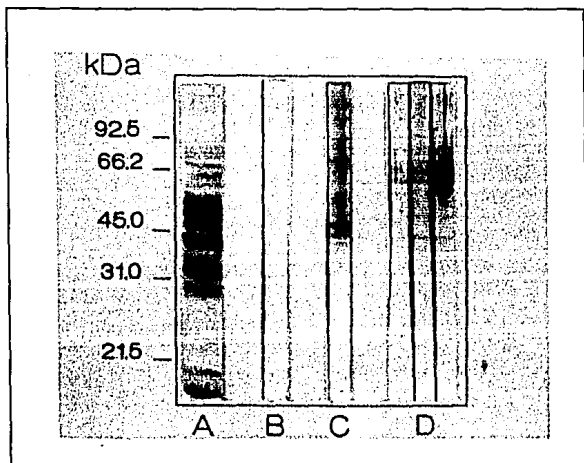


Figura 15. Western Blot con anticuerpos murinos anti AgNi 65/60. El antígeno de *I. cruzi* de la cepa Ninoa fue transferido a papel de nitrocelulosa, se cortaron tiras con 5 μ g de proteína, incubándose con sueros de ratón en una dilución 1:500. A) Extracto total de la cepa Ninoa, B) suero preinmune, C) suero de ratón infectado con la cepa Ninoa y D) tres diferentes sueros anti AgNi 65/60. Se agregó un segundo anticuerpo anti/ratón IgG unido a peroxidasa diluido 1:2000 y como sustrato 3'3-Diaminobenzidina.

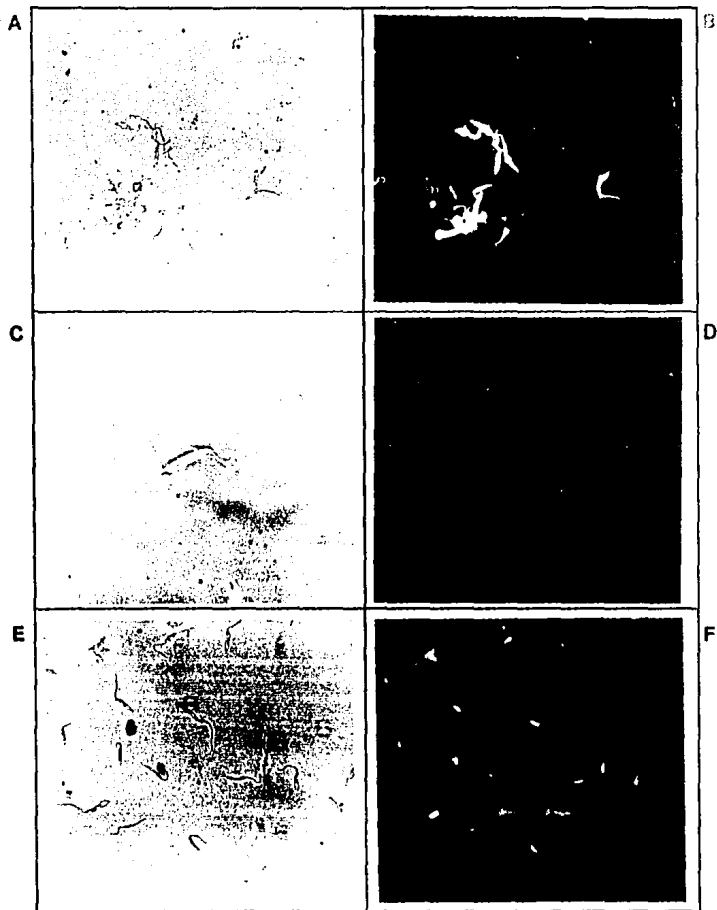


Figura 16. Identificación del antígeno Ni 65/60 en el parásito por anticuerpos policlonales murinos por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Se fijaron parásitos con metanol absoluto sobre porta objetos, se incubaron en cámara húmeda a 37°C con sueros de ratón a una dilución 1:50, se le agregó un conjugado anti ratón IgG biotinilado diluido 1:500 y por último como sustrato se le añadió Streptoavidina-fluoresceína diluido 1:500, en las mismas condiciones de incubación. Se fijaron las preparaciones, se observaron al microscopio y fotografiaron. A) suero hiperinmune campo claro (60X), B) suero hiperinmune fluorescencia (60X), C) suero preinmune campo claro (100X), D) preinmune fluorescencia (100X), E) anti AgNi 65/60₍₆₎ campo claro (60X) y E) anti AgNi 65/60₍₆₎ fluorescencia (60X).

IV.5 RECONOCIMIENTO POR SUEROS HUMANOS DEL ANTIGENO Ni 65/60.

IV.5.A Por sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas.

Otro de los objetivos del presente trabajo fué investigar si el antígeno purificado podría ser utilizado como un antígeno para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Por resultados obtenidos en nuestro laboratorio se sabe que pacientes con la enfermedad de Chagas crónica, reconocen varios antígenos de la cepa Ninoa entre ellos un antígeno de peso molecular cercano a los 66 kDa. Por lo tanto, se decidió probar si el antígeno Ni 65/60 podría ser el antígeno reconocido por estos sueros. Para eso, se transfirió el antígeno Ni 65/60 a papel de nitrocelulosa enfrentándolo a sueros de pacientes chagásicos en fase crónica y revelando con un conjugado anti humano unido a peroxidasa. Nuestros resultados mostrarón que de 8 pacientes crónicos confirmados, 6 reconocieron al antígeno Ni 65/60, en cambio los sueros de los individuos sanos usados como control resultaron negativos, (Fig. 17).

También se analizarón sueros de personas que viven en área endémica para la enfermedad de Chagas y que habían resultado positivos en la prueba de ELISA contra un extracto total de la cepa Ninoa. Al enfrentarles al antígeno Ni 65/60 en inmunoblot, los 5 sueros utilizados reconocieron al antígeno (Fig. 18).

IV.5.B Por sueros de enfermos con otras parasitosis.

Para investigar posibles reacciones cruzadas con Leishmania, que es un parásito relacionado filogenéticamente con T. cruzi, se obtuvieron sueros de humanos con leishmaniasis en sus dos formas, localizada y visceral. El antígeno Ni 65/60 se transfirió a papel de

nitrocelulosa y se incubó con cada uno de los sueros. Se observó que el antígeno

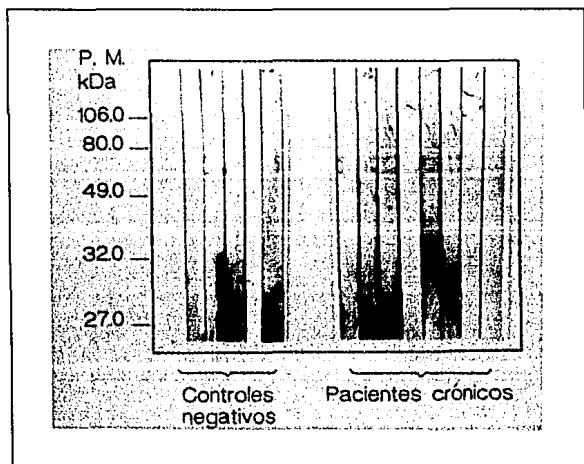


Figura 17. Reconocimiento del Antígeno Ni 65/60 por sueros de pacientes Chagásicos crónicos. El antígeno Ni 65/60 se sometió a electroforesis en gels de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras y se transfirió a papel de nitrocelulosa, se incubó con sueros de personas sanas y sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas crónica, diluidos 1:500. Se agregó un segundo anticuerpo unido a peroxidasa diluido 1:2000 y se reveló con 3'3-diaminobenzidina.

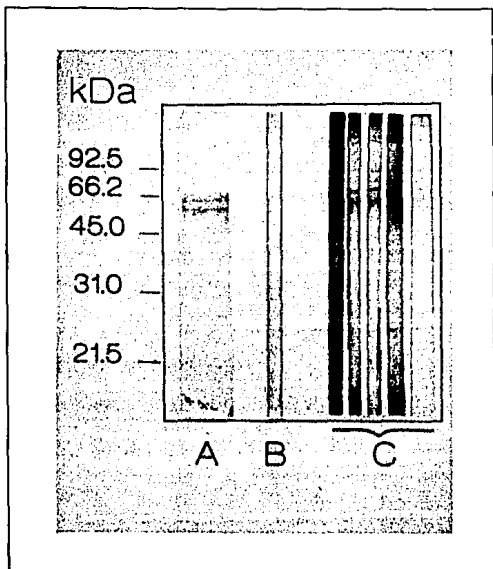


Figura 18. Reconocimiento del antígeno Ni 65/60 por sueros de individuos procedentes de un área endémica a la enfermedad de Chagas en el Estado de Morelos. Después de la electroforesis con SDS y mercaptoetanol el antígeno Ni 65/60, se transfirió a papel de nitrocelulosa (A) y se incubó con suero de humano sano (B) y con 5 diferentes sueros de individuos positivos por ELISA a *T. cruzi* (C). Después se agregó un segundo anticuerpo anti humano unido a peroxidasa y finalmente se reveló con 3'3-Diaminobenzidina.

Ni 65/60, también es reconocido por los sueros de pacientes con leishmaniasis en ambas formas (fig. 19).

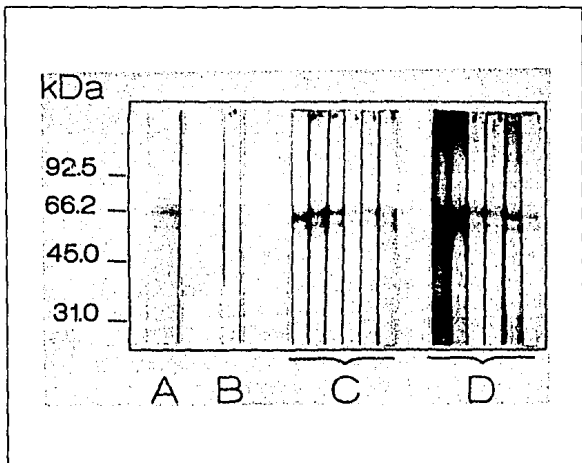


Figura 19. Determinación de reacción cruzada del Antígeno Ni65/60 por medio de Western-Blot. El antígeno Ni 65/60 se enfrentó a sueros de pacientes Leishmaniasicos: En (A) el antígeno Ni 65/60 transferido a papel de nitrocelulosa, B) suero de humano normal, C) suero de pacientes con leishmaniasis localizada y D) suero de pacientes con leishmaniasis diseminada.

Así mismo, se decidió investigar si esta molécula se encontraba en otros parásitos de humanos. Se obtuvieron sueros de humanos infectados con diferentes parasitosis comprobadas: Toxoplasma gondii (3), Entamoeba histolytica (5), Taenia solium (5), con cisticercosis (7). El antígeno Ni 65/60 fue reconocido por anticuerpos contra T. solium, pero no hubo reconocimiento cuando se utilizaron sueros de pacientes infectados con T. gondii, E. histolytica o con cisticercosis (figura 20).

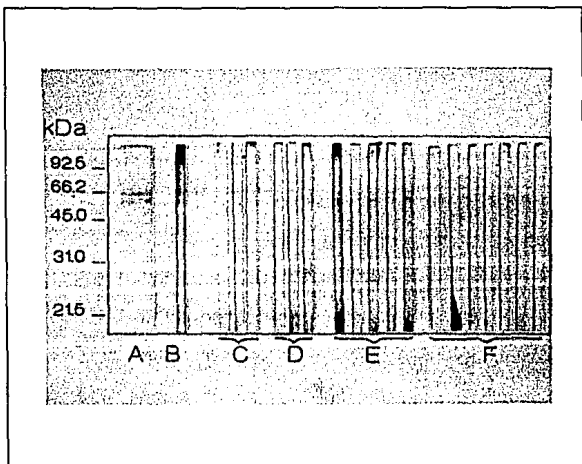


Figura 20. Determinación de reacción cruzada del Antígeno Nino 65/60 con otras parasitosis por Westem Blot. A) antígeno Ni 65/60 en papel de nitrocelulosa, B) suero control negativo, C) sueros de enfermos con Toxoplasma gondii, D) con Entamoeba histolytica, E) con Taenia solium y F) con cisticercosis; a una dilución 1:500.

V.1 DISCUSION

Se utilizaron varias cepas de *I. cruzi*, que al ser analizadas en SDS-PAGE en condiciones reductoras mostraron patrones proteicos heterogéneos, aún cuando todas estas cepas pertenecen a la misma especie, observándose que predominan las proteínas en el área de los 85 kDa a los 40 kDa (fig. 1).

Esta heterogeneidad ya se ha reportado en clones, aislados y cepas del parásito (McDaniel, Howard y Dvorak, 1986) y se ha encontrado también a nivel de isoenzimas (Tibayrenc y col., 1986a). Por otro lado se ha encontrado que existen diferencias sintomatológicas y grado de afección entre individuos infectados por el parásito (Velasco-Castrejón y col., 1992; Goldsmith y col., 1992). Recientemente se realizó un trabajo con cepas mexicanas analizando genes ribosomales del parásito, en el que se encontró que existe una alta heterogeneidad entre e intra cepas (Zavala-Castro, Velasco-Castrejón y Hernández, 1992).

Pero aún cuando el parásito presenta una alta heterogeneidad, también se observó que algunas proteínas son compartidas, por lo que se intentó la identificación de antígenos que pudieran ser utilizados en el diagnóstico y en la inmunoprevención de la enfermedad. Para esto se utilizaron conejos en los que se indujo una hiperinmunización. Este modelo animal ha sido utilizado por varios investigadores, ya que se pueden inducir altos títulos de anticuerpos anti *I. cruzi* y además se ha observado que la etapa crónica de la enfermedad es similar a la presente en humanos (Harth, Haidaris y So, 1987; McDaniel, Howard y Dvorak, 1986; Requena y col., 1992; Hudson, 1981). En nuestro caso, después

de la inmunización, que se utiliza como una herramienta para la caracterización de antígenos del parásito, se obtuvieron antisueros contra las cepas Ninoa y C₄, se observó que los anticuerpos reconocen a antígenos similares, en ambos extractos (fig. 2 y 3), esto puede deberse posiblemente a la existencia de familias y superfamilias de genes, que regulan la expresión de estos antígenos en los diferentes aislados, clonas y cepas del parásito (Campetella y col., 1992). Con esta metodología se logró, identificar a los antígenos de 100, 84, 80, en el área de 58 a 49 kDa, como los más evidentes.

La utilización de anticuerpos, para purificar proteínas antigénicas de *T. cruzi*, se ha usado anteriormente para la caracterización de antígenos (Carbonetto y col. 1990; Ouassi y col, 1991; González, Marcia y Yoshida, 1991; Araujo y Morein, 1991; Gongalves y col., 1991), ya que las proteínas purificadas de esta manera nos permite tener la seguridad de que estas moléculas están involucradas en la respuesta inmune del hospedero frente a *T. cruzi*.

Después de purificar las inmunoglobulinas se realizaron pruebas de electrotransferencia, para corroborar su actividad funcional, utilizando extractos de las cepas con las que se produjeron los anticuerpos policlonales Ninoa, C₄ y una cepa más Yuc H1, observando que los anticuerpos reconocen antígenos muy similares, dos bandas en el área de 65-60, 45, 40, 38, 35 y 28 kDa, además de una banda de 60 kDa muy marcada en el extracto de la cepa Yuc H1, con esto se reafirma lo dicho anteriormente sobre la conservación de moléculas antigénicas entre las cepas de *T. cruzi* (fig. 7).

La determinación de purificar antígenos de la cepa Ninoa, fue debido a que esta cepa se aisló de un individuo infectado residente del Estado de Oaxaca y existen varios reportes

(Goldsmith y col., 1992; Velasco-Castrejón y col., 1992; Salazar, de Haro y Uribarren, 1987), describiendo a esta área como una zona endémica para la enfermedad.

La cromatografía de afinidad se obtuvo una fracción que contenía cuatro proteínas antigénicas de una gran cantidad de moléculas identificadas por el anticuerpo en Western Blot. A esto antígenos se les llamo antígenos de la cepa ninoa (AgsNi), presentando un peso molecular de 90, 65-60, 45 y 28. Se purificó el doblete de 65/60 por que fue el antígeno en mayor concentración, observado con la tinción rutinaria de proteínas, aún cuando los cuatro antígenos antes mencionados fueron reconocidos por sueros humanos con la enfermedad, por Western Blot (fig. 9 y 10). La condición de poder visualizarlo con la tinción usual para proteínas, permitió el manejo del antígeno en el siguiente paso de purificación. El segundo paso de purificación consistió en la electroelución de la proteína de 65/60 kDa a partir de geles de acrilamida. Al antígeno puro electroeluido se le llamo antígeno de la cepa Ninoa de 65/60 kDa (Ni 65/60).

Se determinó que el antígeno Ni 65/60, probablemente es una molécula con residuos de azúcares, ya que fué positivo a la reacción PAS-Shiff (fig. 12). Chaplin y Kennedy (1987) en una recopilación reportaron esta técnica de reacción de PAS, aplicando ácido peródico y benzidina en acetona, sobre papel filtro (whatman), después de haber purificado los antígenos por cromatografía de afinidad, indicándonos la presencia de azúcares. En este trabajo la metodología usada, para la reacción de PAS-Shiff, esta basada en la referencia de Segrest y Jackson (1972), que además de visualizar con una reacción colorida los residuos de azúcar, con una sensibilidad de un 4% a 15%, determinó el peso molecular que presenta la glucoproteína, en geles de poliacrilamida después de

la electroforesis. Lo que no determina, esta técnica, es el tipo de azúcar del cual se trata, para lo cual se tendrían que emplear otras pruebas como son la utilización de lectinas e Inmovilización de las mismas en una matrix, cromatografía líquida de alta presión y métodos enzimáticos entre ellos, el rompimiento de los azúcares con enzimas específicas como la hidrazina que identifica proteínas con enlaces a residuos N-glicosídicos (Montreuil y col., 1987).

Después de identificar que posiblemente se trata de una glicoproteína, se determinó su peso molecular en geles de poliacrilamida en condiciones no reductoras observándose un peso aproximado de 120 kDa, que unido al peso observado en condiciones reductoras nos indica que se trata de un glicoproteína que consta de dos subunidades que están enlazados por puentes disulfuro (fig. 11). Proteínas con este peso molecular se han encontrado en los siguientes estudios: una glicoproteína antigénica de 120 kDa, junto con otras glicoproteínas fueron identificadas por sueros de pacientes enfermos en fase crónica en la superficie de tripomastigotes, al ser removidos por proteólisis de tripsina inhibe la entrada a las células hospederas por el parásito (Andrews, Katzin y Colli, 1984), el Antígeno Ssp-1 fué definido por un anticuerpo monoclonal 2H11, es una proteína aislada de tripomastigotes, la cual es excretada poco después de comenzar la transformación en el tripomastigote y presenta un masa molecular de 100, 120 y 150 kDa, mencionando que el polimorfismo se debe a la cantidad de azúcares presentes (Andrews y col., 1987). Lamentablemente nosotros no pudimos verificar si este antígeno se encuentra en la fase de tripomastigotes por carecer de material biológico para realizar dicha prueba.

Otra característica del antígeno Ni 65/60 puro, es que no se le encontró actividad enzimática, a pesar de que cuando se obtuvieron los antígenos Ninoa por cromatografía de afinidad se observó una actividad enzimática en el área de 60 kDa y 40 kDa, tal vez las condiciones de electroelución utilizadas no sean las más adecuadas para conservar la actividad enzimática de la glicoproteína (fig. 13).

Cuando se realizó el análisis inmunológico para verificar el posible uso potencial en el diagnóstico del antígeno Ni 65/60, ya que había sido reconocida por anticuerpos en suero de pacientes con la enfermedad en fase crónica (fig. 17) y por sueros de personas de una área endémica (fig. 18). En otra prueba más, se encontró que sueros de pacientes infectados con Leishmania también reconocen el antígeno Ni 65/60 (Fig. 19). Se han hecho estudios donde se observa que los antígenos de L. cruzi, pueden presentar reacciones cruzadas con antígenos Leishmania donovani y L. mexicana, que están relacionadas evolutivamente con L. cruzi (Carvalho, Reed y Johnson Jr., 1987), o bien que las enfermedades que producen ambos parásitos pueden coexistir al mismo tiempo dentro de un mismo individuo (Chiller, Samudio y Zoulek, 1990). En nuestro caso no se pudo comprobar cual de las dos posibilidades provocó los resultados observados. El antígeno Ni 65/60 podría ser utilizado en cambio en estudios de profilaxis o de protección pasiva. Por ejemplo, existen reportes de antígenos, que al ser usados para proteger generan una respuesta inmune favorable (Rowland, Mikhail y McCormick, 1992). El hecho de que el antígeno Ni 65/60 sea reconocido también por sueros de pacientes infectados Leishmania, plantea la posibilidad de usarlo para la protección a ambas enfermedades en diferentes individuos, o aún más, en el mismo individuo, ya que existen reportes

de la coexistencia de ambas enfermedades en un mismo individuo, que generalmente vive en un área endémica para los dos parásitos (Chiller, Samudio y Zoulek, 1990; Badaro y col., 1986).

Con respecto a el reconocimiento por anticuerpos anti Taenia solium, no existe reporte alguno de reacción cruzada entre individuos pertenecientes a estas dos phyla.

Por último, se logró producir anticuerpos policlonales anti antígeno Ni 65/60 en ratón, fueron usados para realizar la inmunofluorescencia (IFI) para la localización del antígeno Ni 65/60 en el parásito. Se observó que con el suero hiperinmune (fig. 16.B) anti Ninoa de ratón, utilizados como control positivo, detecta a todo el parásito, fluoresciendo intensamente, en comparación con el suero de anticuerpos policlonales anti Ni 65/60 (fig. 16.F), se observó que estos detectan, sólo una estructura en el interior del cuerpo. En casi toda la población revisada de parásitos, se observó que principalmente está en la parte anterior al núcleo, en los restantes se observó en la parte media y posterior a el núcleo, esto puede ser que el organelo detectado sea posiblemente el cinetoplasto. Ahora bien, el hecho que el anticuerpo reconociera una estructura interna del parásito, puede ser debido a que al realizar el proceso de fijación, permeabilizaran los parásitos, estos pudieron haber sufrido un choque hipotónico durante la técnica, rompiendose la membrana del mismo y permitiendo la entrada de los anticuerpos hacia el interior del parásito.

Al obtener este resultado y comparar con los estudios hechos sobre localización de antígenos del parásito, solo se encontró una similitud con el antígeno Ssp-1 (Andrews y col., 1987), este es una glicoproteína de un peso molecular 100-120-150 kDa, específico

de la fase de tripomastigotes, reportado por Andrews y col. (1987), encontraron que con la prueba de IFI es detectado por anticuerpos monoclonales (2H11) en dos cepas probadas (Y y G) en el interior y superficie del cuerpo del parásito. Como ya se había mencionado anteriormente Ssp-1, presenta un peso molecular semejante con el antígeno Ni 65/60 en condiciones no reductoras, que es una glicoproteína y ahora se podría agregar el resultado de la prueba de IFI con los anticuerpos anti antígeno Ni 65/60 producidos en este trabajo, ya que es localizado sólo en el interior del protozooario, aunque ellos reportan que es específico de tripomastigotes. La diferencia que se presenta en ambos antígenos se podría atribuir a la utilización de cepas sudamericanas, en tanto que aquí se está utilizando una cepa mexicana, así mismo los investigadores que reportan el Ssp-1, encuentran diferencias entre las dos cepas utilizadas en cuanto a la expresión del antígeno en el proceso de la diferenciación intracelular y extracelular. Esto podría ser debido a la heterogeneidad, que se presenta entre las cepas del parásito (Heterogeneidad, apartado I.1.D).

V.2 CONCLUSIONES.

Se encontró que el parásito protozoario Trypanosoma cruzi causante de la enfermedad de Chagas tiene un amplio espectro proteico al analizar a través de la separación de extractos solubles totales en geles de poliacrilamida varias cepas (Ninoa, C₄, Yuc H1 Y Z21).

Se determinó que los anticuerpos producidos en conejo reconocen antígenos similares en las cuatro cepas analizadas, principalmente proteínas con pesos moleculares de 65/60, 45, 38, Y 28 kDa.

Se purificó un antígeno de la cepa mexicana Ninoa por cromatografía de afinidad y por electroelución.

se determinó por análisis en geles de poliacrilamida, que el antígeno presentó un peso molecular aproximado de 120 kDa, constituida por dos subunidades de 65 y 60 kDa, y es de naturaleza glucosídica.

Se detectó al antígeno en una estructura interna del parásito que corresponde al cinetoplasto.

El análisis inmunológico determinó que la glicoproteína purificada, fue reconocida por pacientes Chagásicos crónicos y tal vez también por pacientes en fase aguda o indeterminada, pues fue reconocido por individuos seropositivos viviendo en zonas endémicas para esta enfermedad.

Se encontró que este antígeno también está presente en Leishmania, pero ausente en otros protozoarios.

En resumen los estudios realizados en esta Tesis aportaron datos preliminares sobre una molécula de T. cruzi que es antigénica y compartida con Leishmania, que amerita ser estudiada con más profundidad para determinar su función y su posible uso como antígeno protector.

BIBLIOGRAFIA.

Affranchino J.L., Ibañez, C.F., Luquetti, R.A., Reyes M.B., Macina R.A., Aslund L., Pettersson U. and Frasch A.C.C. (1989), Identification of a Trypanosoma cruzi Antigen that is Shed During the Acute Phase of Chagas' Disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34: 221-228.

Affranchino J.L., Pollevick G.D. and Frasch A.C.C. (1991), The Expression of the Major Shed Trypanosoma cruzi Antigen Results from the Developmentally-regulated Transcription of Small Gene Family. *F.E.B.S.* 280: 316-320.

Almeida E., Krieger M.A., Carvalho M.R., Colemann W. and Golberg S. (1990), Use of Recombinant Antigens for the Diagnosis of Chagas Disease and Blood Bank Screening. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 85:513-517.

Anderson N., Morales A., Nava E., Martínez E., Rodríguez I., Young P., Howard M.K. and Miles M.A. (1990), Trypanosoma cruzi Infection in the Mexican State of Guerrero: A Seroepidemiological (ELISA) Survey of 20 Communities. *J. Trop. Med. Hig.* 93:341-346.

Andrews N.W. (1990), The Acid-Active Hemolysin of Trypanosoma cruzi. *Exp. Parasitol.* 71:241-244.

Andrews N.W., Abrans S., C.L., Slatin L. and Griffiths G. (1990), A T. cruzi-Secreted Protein Immunologically Related to the Complement Component C9: Evidence for Membrane Pore

Forming Activity at Low pH. Cell. 61:1277-1287.

Andrews N.W., Hong K., Robbins E.S. and Nussenzweig V. (1987), Stage-Specific Surface Antigens Expressed During the Morphogenesis of Vertebrate Forms of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasit. 64:474-484.

Andrews N., Katzin A.M. and Coll W. (1984), Mapping of Surface Glycoproteins of T. cruzi by Two-dimensional Electrophoresis. Eur. J. Bull. FEBS. pp. 599-604.

Andrews N.W., Robbins E.S., Ley V., Hong K.S. and Nussenzweig V. (1988), Developmentally Regulated, Phospholipase C-Mediated Release of the Major Surface Glycoprotein of Amastigotes of Trypanosoma cruzi. J. Exp. Med. 167:300-314.

Andrews N.W. and Whitlow M. B. (1989), Secretion by Trypanosoma cruzi of a Hemolysin Active at Low pH. Mol. Biochem. Parasitol. 33:249-256.

Araujo F.G. and Morein B. (1991), Immunization with Trypanosoma cruzi Epimastigotes Antigens Incorporated into Iscoms Protects Against Lethal Challenge in Mice. Infect. Immun. 59:2909-2914.

Arruda M. V., Coll W. and Zingales B. (1989), Terminal 8-D-Galactofuranosyl Epitopes Recognized by Antibodies that Inhibit Trypanosoma cruzi Internalization into Mammalian Cells.

Eur. J. Biochem. 182: 413-421.

Badaro R., Reed S.G., Barral A., Orge G. and Jones T.C. (1986), Evaluation of the Microenzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Antibodies in American Visceral Leishmaniasis Antigen Selection for Detection of Infection Specific Respons., Am. J. Trop. Med. Hyg., 35: 72-78.

Beltz L.A., Szein M.B. and Kierszenbaum F. (1988), Novel Mechanism for Trypanosoma cruzi Induced Suppression of Human Lymphocytes. J. Immunol. 141:289-294.

Beltz L.A, Kierszenbaum F. and Szein M.B. (1989), Selective Suppression Effects of T. cruzi on Activated Human Lymphocytes. Infect. Immun. 57:2301-2305.

Bogliolo A.R. and Gofrey D.G. (1987), Isoenzyme Changes the Life Cycle of Trypanosoma cruzi. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 81:22-229.

Bollag D. M. and Edelstein S.J. (1991), Protein Methods. Ed. Willey-Liss., U.S.A., N.Y.

Bradford M.M. (1976), A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Brumpt A.E. (1989), Trypanosoma cruzi, En: Katz M., Despommier D.D. and Gwadz R.W. (Eds), Parasitic Diseases, Springer-Verlag, N.Y.

Buschiazzo A., Campetella O.E., Macina A., Salceda S., Frasch A.C.C. and Sánchez D.O. (1992), Sequence of the Gene for a Trypanosoma cruzi Protein Antigenic During the Chronic Phase of Human Chagas Disease. Mol. Biochem. Parasitol. 54:125-128.

Calderon R.O. and De Fabro S. P. (1983), Trypanosoma cruzi: Fusogenic Ability of Membranes from Cultured Epimastigotes in Interaction with Human Syncytiotrophoblast. Exp. Parasitol. 56:169-179.

Camargo E.P. (1964), Growth and Differentiation Trypanosoma cruzi. I Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. Rev. do Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 6:93-100.

Campetella O., Sánchez D., Cazzulo J.J. and Frasch A.C.C. (1992), A Superfamily of Trypanosoma cruzi Surface Antigens. Parasitology Today. 8:378-381.

Carbonetto C.H., Malchiodi E.L., Chiamonte M., Durante De Isola F., C.A. and Magni R.A.(1990), Isolation of Trypanosoma cruzi Antigen by Affinity Chromatography with a Monoclonal Antibody. Preliminary Evaluation of its Possible Applications in Serological test. Clin. Exp. Immunol. 82:93-96.

Carvalho E.M., Reed S.G. and Johnson Jr., W.D. (1987), Cross Reactivity between Trypanosoma cruzi and Leishmania Antigens in the Lymphocytes to Blastogenesis Assay., Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 81: 82-84.

Castanys S., Gamarro F., Ruiz-Pérez L.M. and Osuna A. (1990), Purification of a Glycoprotein Excreted by Trypanosoma cruzi to Increase the Permeability of Host-cell Membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun. 166:736-742.

Cazzulo J.L., Couso R., Ralmondi A., Wernstedt L. and Hellman U. (1989), Further Characterization and Partial Amino acid Sequence of a Cysteine Proteinase from T. cruzi. Mol. Biochem. Parasit. 33:33-42.

Celentano A. M. and González C., S. M. (1992), Induction of Macrophage Activation and Opsonizing Antibodies by T. cruzi Subpoblations. Parasit. Immunol. 14:155-157.

Cerrone M. C. and Kuhn R.E. (1991), Macrophage Regulation of Immune Response of Spleen Cells from Mice Infect with Trypanosoma cruzi. Cell. Immunol. 138:423-436.

Cerrone M.C., Ritter D.M. and Kuhn R.E. (1992), Effect of Antigen-Specific T Helper Cells or Interleukin-2 on Suppressive Ability of Macrophage Subsets Detec in Spleens of Trypanosoma cruzi Infect Mice as Determined by Limiting Dilution Partition Analysis. Infect. Immun. 60:1489-1498.

Chagas C. (1909), Nova Trypanozomíaze Humana Estudos sobre Morfologia e Ciclo Evolutivo do Schizotrypanum cruzin. Gen, Spec, Agente Etiológico de Nova Entidade Morbida de Homem., Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1:159-218.

Chiller T.M., Samudio M.A. and Zoulek G., (1990), IgG Antibody Reactivity with T. cruzi and Leishmania Antigens in Sera of Patients with Chagas' Disease and Leishmaniasis., Am. J. Trop. Med. Hyg. 43: 650-656.

Clark I.A. and Howell M.J. (1990), Protozoan Parasites of Erythrocytes and Macrophages. En: Behnke J.M., Parasity Immunity and Pathology, Taylor y Francis, London.

Couto A.S., Gongalves M.F., Colli W. and M. de Lederkremer R. (1990), The N-Linked Carbohydrate Chain of the 85-Kilodalton Glycoprotein from Trypanosoma cruzi Trypomastigotes Contains Sialyl, Fucosyl and Galactosyl (α 1-3) Galactose units. Mol. Biochem. Parasitol. 39:101-108.

Cox F.E.G. (1987), Modern Parasitology. Parasitic Protozoa., Blachwell Ed., Oxford, Londres. pp 1-7.

Cuatrecasas P. (1970), Protein Purification by Affinity Chromatography. J. Biol. Chem. 24:12 pp 3059-3065.

Davis Ch.D. and Kuhn R.E. (1990), Detection of Antigen with Affinity for Host Cell Membrane Polypeptides in Culture Spermatans of Trypanosoma cruzi. Infect. Immun., 58:1812-1816.

De Castro S.L., Soeiro M.N. and Leal De Meirelles M. de N. (1992), Trypanosoma cruzi: Effect of Phenothiazines on the Parasite and its Interaction with Host Cells. Mem. Inst. Osw. Cruz. 87:209-215.

Dragon E.A., Brothers V.M., Wrightsman R.A. and Manning J. (1985), A Mr 90,000 Surface Polypeptide of Trypanosoma cruzi as a Candidate for a Chagas' Disease Diagnostic Antigen. Mol. Biochem. Parasitol. 16:213-229.

Flint J.E., Schechter M., Chapman M.D. and Miles M.A. (1984), Zymodeme and Species Specificities of Monoclonal Antibodies Raised Against Trypanosoma cruzi. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78:193-202.

Frasch A.C.C., Sánchez D.O. and Cazzulo J.J. (1990), Prospects of Defined Proteins for Vaccine Development. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85:523-529.

Gershoni J.M. and Palade G.E. (1982), Electrophoretic Transfer of Proteins From Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to a Positively Charged Membrane Filter. Anal. Biochem. 124: 396-405.

- Gershoni J.M. and Palade G.E. (1983), Protein Blotting: Principles and Applications. Anal. Biochem. 131:1-15.
- Goding J.W. (1986), Monoclonal Antibodies, Principles and Practice, Academic Press, U.S.A., San Diego.
- Goldsmith R.S., Zarate R.J., Zarate L.G., Morales G., Kagan I., Drickey R. and Jacobson L.B. (1992), Clinical and Epidemiologic Studies of Chagas' Disease in Rural Communities of Oaxaca, Mexico and an Eight-year Followup: Il Chila., Bull. PAHO. 26:47-57.
- Gongalves M.F., Umezawa E.S., Katzin A.M., De Souza W. Alves M.J.M., Zingales B. and Colli W. (1991), Trypanosoma cruzi: Shedding of Surface Antigens as Membrane Vesicles. Exp. Parasitol. 72:43-53.
- González J., Marcia F. A. and Yoshida N. (1991), Resistance to Acute Trypanosoma cruzi Infection Resulting from Immunization of Mice with a 90-Kilodalton Antigen from Metacyclic Trypomastigotes. Infect. Immun. 59:863-867.
- Guhl F. (1990), Purified Trypanosoma cruzi Specific Glycoprotein for Discriminative Serological Diagnosis of South American Trypanosomiasis (Chaga's Disease). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85:531-532.

- Harlow E. and Lane D. (1988), Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor.
- Harth G., Haldaris C.G. and So M. (1987), Neuraminidase from Trypanosoma cruzi: Analysis of Enhanced Expression of the Enzyme in Infectious forms. Proc. Natl. Acad. Sci. 84:8320-8324.
- Harth G., Haldaris C.G. and So M. (1989), Purification and Characterization of Stage-specific Glycoproteins from Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 33:143-150.
- Hernández-Munain C., De Diego J.L., Alcina A. and Fresno M. (1992), A Trypanosoma cruzi Membrane Protein Shares an Epitope with a Lymphocyte Activation Antigen and Induces Crossreactive Antibodies. J. Exp. Med. 175:1473-1482.
- Hernández-Munain C. Fernández M.A., Alcina A. and Fresno M. (1991), Characterization of a Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Membrane Protein from Trypanosoma cruzi. Infect. Immun. 59:1409-1416.
- Heussen C. and Dowdle E.B. (1980), Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activator in Polyacrylamide Gel Containing Sodium Dodecyl Sulphate and Copolymerized Substrates. Anal. Biochem. 102:196-202.
- Hoff R. and Boyer M.H. (1985), Immunology of Chagas' Disease, En: I. Tizard (Eds),

Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis, CRC. PRESS., Florida, U.S.A.

Hudson L. (1981), Immunobiology of Trypanosoma cruzi Infection and Chagas' Disease. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 5:493-498.

Hudson L. (1985), Autoimmune Phenomena in Chronic Chagasic Cardiopathy. Parasitology Today. 1:6-9.

Hudson L. and Britten V. (1985), Immune Response to South American Trypanosomiasis and its Relationship to Chagas' Disease. British Med. Bull. 41:175-180.

Instructions GE 200, Sixpac gel Eluter (1991), Hoefer Scientific Instruments, San Francisco.

Jacobson K.C., Washburn R. G. and Khun R. (1991), Binding of Complement to Trypomastigotes of a Brazil Strain of Trypanosoma cruzi: Evidence for Heterogeneity within the Strain. J. Parasitol. 78:697-704.

Katz M., Despommier D.D. and Gwadz R.W. (1989), Parasitic Diseases, Springer-Verlag, N. Y., U.S.A., Segunda Ed. pp. 170-176.

Kahn S., Colbert T.G., Wallace J.C., Hoagland N.A. and Eisen, H. (1991), The Major 85-kDa Surface Antigen of the Mammalian-Stage Forms of Trypanosoma cruzi is a Family of

Sialidases. Proc. Natl. Acad. Sci. 88:4481-4485.

Khan S., Khan M. and Eisen H. (1992), Polyreactive Autoantibodies to Negatively Charged Epitopes Following Trypanosoma cruzi Infection. Eur. J. Immunol. 22:3051-3056.

Kierszenbaum F. (1985), Is There Autoimmunity in Chagas Disease? Parasitology Today. 1:4-6.

Kierszenbaum F., Cuna W.R., Beltz L.A. and Szteln M.B. (1989), T. cruzi Reduces the Number of High-Affinity IL-2 Receptors on Activated Human Lymphocytes by Suppressing the Expression of the p55 and p70 Receptor Component. J. Immunol. 143:275.

Kirchhoff L.V. and Nava F. (1983), Chagas' Disease in Latin American Immigrants. JAWA. 254:3058-3060.

Laemmli O.K. (1970), Cleavage of Structural Proteins the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature(London) 227:680-685.

Lanham S.M., Grendon J.M., Miles M.A., Povoia M.M. and Almelda de Zocuzza A.A. (1981), A Comparison of Electrophoretic Methods for Isoenzyme Characterization of Trypanosomatids. I Standard Stocks of T. cruzi Zymodemes from Northeast Brasil. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 75:742-750.

Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E.G., Deroux G G., Grain J., Hinigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page E.C., Poljansky G. Sprague V., Vavra J. and Wallace F.G. (1980), A Newly Revised Classification of the Protozoa., J. Protozool. 27:37-58.

Ley V. Robbins E.S., Nussenzweig V. and Andrews N.W. (1990), The Exit of T. cruzi from Phagosome Is Inhibited by Raising the pH of Acidic Compartments. J. Exp. Med. 171:401-413.

Manual del Fabricante Bio-Rad., Literature, 1., Activated Immunoaffinity Supports., pp. 1-38.

Mazzotti L. (1940), Dos Casos de Enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca. Gac. Med. Mex. 70:417-420.

McDaniel J.P., Howard R.J. and Dvorak J.A. (1986), Identification and Analysis of Epimastigotes Surface and Metabolic Proteins in Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 19:183-194.

Mendonca-Previato L., Gorin P.A.J., Braga A.F., Sacharstein J. and Previato J.O. (1983), Chemical Structure and Antigenic of Complexes Obtained from Epimastigotes of Trypanosoma cruzi. Biochemistry. 22:4980-4987.

Miles M.A., Toye P.J., Oswald S.C. and Gofrey D.G. (1977), The Identification by Isoenzyme Patterns of two Distinct Strain-Groups of Trypanosoma cruzi, Circulating Independently in a Rural Area of Brazil. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 71:217-225.

Miles M.A., Lanham S.M., De Souza A.A. and Póvoa M. (1980), Further Enzymic Characters of Trypanosoma cruzi and Their Evaluation for Strain Identification. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 74:221-237.

Montreuil J., Bouquetet S., Debray H., Fournet B., Spik G. and Strecker G. (1987) Glycoproteins, En: Chaplin M.F. and Kennedy A.F. (Eds), Carbohydrates Analysis Approach., Edít IRL Press., Inglaterra.

Murta A.C.M., Persechini P.M., de Souto Padron T., de Souza W., Guimaraes J.A. and Scharfstein J. (1990), Structural and Functional Identification of GP57/51 Antigen of Trypanosoma cruzi as a Cysteine Proteinase. Mol. Biochem. Parasitol. 43:27-38.

Neiva A. En: Velasco-Castrejón O., Guzman C., Cruz J., López O. y Gonzáles F., La enfermedad de Chagas., Publicación Técnica del I.N.D.R.E. No. 8, México, D.F.

Noble E.R., Noble G.A., Schad G.A. and MacInnes A.J. (1989), Parasitology, The Biology of Animal Parasites., Lea y Febiger. 6ta Ed. Philadelphia, Londres.

Nogueira N., Chaplan S., Tydings J.D., Unkeless J. and Cohn Z. (1981), Trypanosoma cruzi Surface Antigens of Blood and Cultures Forms. J. Exp. Med. 153:623-639.

Oakley B.R., Kirsch D.R. and Morris N.R. (1980), A Simplified Ultrasensitive Silver Stain for Detection Proteins in Polyacrylamide Gels. Anal. Biochem. 105:361-363.

Ouaisi M.A., Dubremetz J.F., Kusnierz J.P., Cornette J., Loyens M., Taibi A., Marty B., Velge P., Rizvi F. and Capron, A. (1990a), Trypanosoma cruzi: Differential Expression and Distribution of an 85-kDa Polypeptide by in vitro Developmental Stages. Exp. Parasitol. 71:207-217.

Ouaisi M.A., Taibi A., Cornette J., Velge P., Marty B., Loyens M., Esteva M., Rizvi F.S. and Capron A. (1990b), Characterization of Major Surface and Excretory-secretory Immunogens of Trypanosoma cruzi Trypomastigotes and Identification of Potential Protective Antigen. Parasitol. 100:115-124.

Ouaisi M.A., Taibi A., Loyens M., Martin U., Afchain D., Maldana C., Caudloti C. Cornette J. Martelleur A., Velge P., Marty B. and Capron A. (1991), Trypanosoma cruzi A Carbohydrate Epitope Defined by a Monoclonal Antibody as a Possible Marker of the Acute Phase of Human Chagas' Disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 45:214-225.

Pereira M.E.A., Loures M.A., Villalta F. and Andrade A.F.B. (1980), Lectin Receptors as

Markers for Trypanosoma cruzi, Developmental Stages and Study of the Interaction of Wheat Germ Agglutinin with Sialic Acid Residues on Epimastigotes Cells. J. Exp. Med. 152:1375-1392.

Pereira M.A. (1990), Cell of T. cruzi., En: Wyler D.J.(Eds), Modern Parasite Biology, Cellular, Immunological and Molecular Aspects, W.H. Freeman and Company, N. Y., U.S.A., pp. 64-78.

Piuevezam M.R., Russo D.M., Burns Jr. J.M., Skelky Y.A.W., Grabstein K.H. and Reed S.G. (1993), Characterization of Responses of Normal Human T Cells to Trypanosoma cruzi Antigens. J. Immunol. 150:916-924.

Prickett K.S., Amberg D.C. and Hopp T.P. (1989), A Calcium-Dependent Antibody for Identification and Purification of Recombinant Proteins. Bio. Techniques. 7:580-589.

Prioli R.P., Mejia S.J. and Pereira M.E.A. (1990), Monoclonal Antibodies Against Trypanosoma cruzi Neuraminidase Reveal Enzyme Polymorphism, Recognize a Subset of Trypamastigotes, and Enhance Infection in Vitro. J. Immunol. 144:4384-4391.

Reisfeld R.A., Lewis U.J. and Williams D.E. (1962), Disk Electrophoresis of Basic Proteins and Peptide on Polyacrylamide Gels. Nature. 195:281-283.

Requena J.M., Jiménez-Ruiz A., Soto M., Assiego R., Santarén F., López M.C., Patarroyo M. E. and Alonso C., (1992), Regulation of Hsp70 Expression in T. cruzi by Temperature and Growth Phase., Mol. Biochem. Parasitol. 53:201-212.

Romaña C. En: Velasco-Castrejón O., Guzman C., Cruz J., López O. y González F., La Enfermedad de Chagas., Publicación Técnica del I.N.D.B.E. No. 8., México, D.F.

Rowland E.C., Mikhail K.S. and McCormick T.S. (1992), Isotype Determination of Anti-Trypanosoma cruzi Antibody in Murine Chagas' Disease. J. Parasitol. 7:557-561.

Salazar P.M., De Haro Artega I. and Uribarren Berrueta, T. (1988), Chagas Disease in Mexico. Parasitol. Today. 4:348-351.

Salisbury T.(1990), Disruption Cell, En: Harris E. and Angal S. (Eds), Protein Methods a Practical Approach., Irl Press, Englaterra.

Scharfstein J., Luquetti A., Murta A.C.M., Senna M., Rezende J.M., Rassi A. and Mendonca-Previateo L. (1985), Chagas' Disease: Serodiagnosis with Purified Gp 25 Antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34:1153-1160.

Scharfstein J., Schechter M., Senna M., Peralta J.M., Mendonca-Previateo L. and Miles M.A. (1986), Trypanosoma cruzi: Characterization and Isolation of a 57/51,000 m.w. Surface

Glycoprotein (GP57/51) Expressed by Epimastigotes and Bloodstream Trypomastigotes. *J. Immunol.* 137:1336-1341.

Schenkman S., Jiang Man-Shiow, Hart G.H. and Nussenzweig V. (1991), A Novel Cell Surface Trans-sialidase of Trypanosoma cruzi Generates a Stage-Specific Epitope Required for Invasion of Mammalian Cells. *Cell.* 65:1117-1125.

Schenkman S., Pontes de Carvalho L. and Nussenzweig V. (1992), Trypanosoma cruzi Trans-sialidase and Neuraminidase Activities can be Mediated by the Same Enzymes. *J. Exp. Med.* 175: 567-575.

Schmidt G.D. and Roberts L.S. (1989), Foundations of Parasitology, Tiner Mirror/ Mosby College Publishing, U.S.A., Cuarta Ed., pp. 55-65.

Schofield C.J. and Dias J.C.P. (1991), A Cost-Benefit Analysis of Chagas Disease Control. *Mem. Ints. Oswal. Cruz.* 86:285-295).

Segrest J.P. and Jackson R.L. (1972), Molecular Weight Determination of Glycoproteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulphate. *Meth. Enzimol.* 28:54-63.

Silva J.S., Morrissey P.J., Grabstein K.H., Mohler K.M., Anderson D. and y Reed S.G. (1992), Interleukin 10 and Interferon γ Regulation of Experimental Trypanosoma cruzi infection. *J. Exp.*

Med. 175:169-174.

Snary D. and Hudson L. (1979), Trypanosoma cruzi Cell Surface Protein: Identification of One Major Glycoprotein. FEBS LETTERS. 100:166-170.

Snary D. (1985), Biochemistry of Surface Antigens of Trypanosoma cruzi. British Med. Bull. vol. 41, No.2, pp. 144-148.

Souto-Padrón T., Campetella O.E., Cazzulo J.J. and De Souza W. (1990), Cysteine Proteinase in Trypanosoma cruzi: Immunocytochemical Localization and Involvement in Parasite-Host Cell Interaction. J. Cell Sc. 96:485-490.

Spínella S., Llegeard P. and Hontebeynie-Joskowicz M. (1992), Trypanosoma cruzi: Humoral Response During Experimental Chagas' Disease. Exper. Parasit. 74:46-56.

Sztejn M.B. Cuna W.R. and Kierszenbaum F. (1990), Trypanosoma cruzi Inhibits the Expression of CD3, CD4, CD8 y IL-2R by Mitogen-Activated Helper and Cytotoxic Human Lymphocytes. J. Immunol. 144:3558-3562.

Tarleton R. (1991), Regulation of Immunity in Trypanosoma cruzi Infection. Exp. Parasit. 73:106-109.

- Ternynck T., Bleox C. Gregoïne J., Auraneas S. and Kanellopoulos-Langenium C. (1990), Comparison Between Autoantibodies Arising During Trypanosoma cruzi Infection in Mice and Natural Autoantibodies. J. Immunol. 144:1504-1511.
- Tibayrenc M., Hoffman A., Poch O. Echalar L., Le Pont F., Lemesre J.L., Desjeux P. and Ayala F.J. (1986b), Additional Data on Trypanosoma cruzi Isozymic Strains Encountered in Bolivian Domestic Transmission Cycles. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 80:442-447.
- Tibayrenc M., Wards P., Moya A. and Ayala F.J. (1986a), Natural Populations of Trypanosoma cruzi, the Agent of Chagas Disease, have a Complex Multiclonal Structure. Proc. Natl. Acad. Sci. 83:115-119.
- Velasco-Castrejón O., Guzman C., Rodríguez J.C., López O. y González F. (1991), La enfermedad de Chagas, Publicación Técnica del I.N.D.R.E., No. 8. México, D.F.
- Velasco-Castrejón O., Valdespino J.L., Tapia-Conyie R., Salvatierra B., Guzmán-Bracho C., Magos C., LLausas A., Gutierrez G. y Sepulveda J. (1992), Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en México., Salud Pública de México., 34:186-196.
- Vianna G. (1989) Trypanosoma cruzi, En: Katz M., Despommier D.D. and Gwadz R.W. (Eds), Parasitic Diseases., Springer-Verlag, Segunda Ed., N.Y., U.S.A.

Villalta F., Lima M.F., Howard S.A., Zhou L. and Ruiz-Ruano A. (1992), Purification of a Trypanosoma cruzi Trypomastigotes 60-kilodalton Surface Glycoprotein that Primes and Activates Murine Lymphocytes. *Infect. Immun.* 60:3025-3032.

Voller A., Bidwell D.E. and Bartlett A. (1979), The Enzyme Linked Immunosorbente Assay, (ELISA), A Guide with Abstracts of Microplate Applications., Dinattech Laboratories, Inc., pp. 7-118.

Wirth J.L., Kierszenbaum F., Sommenfeld G. and Zlotnik, A. (1985), Enhancing Effects of Gama Interferon on Phagocytic Cell Association with Killing of Trypanosoma cruzi. *Infect. Immun.* 49:61-66.

Zavala-Castro J. E., Velasco-Castrejón O. and Hernández R. (1992), Molecular Characterization of Mexican Stocks of Trypanosoma cruzi Using Total DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47:201-209.

Zingales B., Martin N., Lederkremer R.M. and Colli W. (1982), Endogenous and Surface Labelling of Glycoconjugates from the Tree Differentiation stages of T. cruzi.-*FEBS. Lett.* 142:238-242.

Zingales B., Gruber A., Ramalho C.B., Umezawa E.S. and Colli W. (1990), Use of Two Recombinant Proteins of Trypanosoma cruzi in the Serological Diagnosis of Chagas' Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85:519-522.

ANEXOS.

Anexo I

Protocolo de electroforesis en condiciones reductoras.

Todas las técnicas realizadas de análisis electroforéticos de los antígenos purificados por cromatografía de afinidad y el antígeno electroeluido, se realizarán en una cámara Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad).

Preparación de los geles.

a) Gel Separador al 10%.

Acrilamida al 30% - Bisacrilamida al 1%	1.66 ml
4XTris-HCl 1.5 M/SDS 0.4% pH 8.8	1.25 ml
Agua desionizada	2.08 ml

Degasificar al vacío con agitación continua la solución de 10 a 15 min antes de agregar los siguientes reactivos.

Amonio persulfato al 10%	0.016 ml
Temed	0.003 ml

Colocar el gel entre los cristales ya montados y agregar agua para visualizar cuando ya haya polimerizado.

b) Gel Concentrador al 5%.

Acrilamida al 30%- Bisacrilamida al 0.8%	0.27 ml
4XTris-HCl 0.5 M/SDS 0.4% pH 6.8	0.417ml
Agua desionizada	1.017ml

Degasificar al vacío con agitación continua la solución durante 5 min antes de agregar los siguientes reactivos.

Amonio persulfato al 10% 0.008ml

Temed 0.002ml

Vaciar el agua que se encuentra sobre el gel separador y agregar el gel concentrador colocando un peine con los pozos necesarios para el número de muestras que se van a analizar.

c) Preparación de la muestra

La muestra a analizar se prepara 1:1 volumen con el siguiente amortiguador:

Tris-HCl pH 6.8 0.5 M

Glicerol 20%

SDS 2%

2-β-mercaptoetanol 2%

Azul de bromofenol 1%

La muestra se hierve durante 5 min y se coloca en el gel con micropipetas.

d) Condiciones de corrida.

Se coloca el amortiguador de corrida, Tris 25mM, Glicina 192mM y SDS 0.1%, a 200 volts durante 45 min aproximadamente.

e) Fijación.

Al término de la electroforesis el gel se coloca durante una hora en la siguiente solución:

Isopropanol 50%

Acido acético 7%

f) Tinción.

Después se coloca en un solución de azul de Coomasie durante una hora:

Metanol	50%
Acido acético	10%
Azul de coomasie	0.05%
Agua desionizada	40%

Para aclarar y visualizar las proteínas se preparo la siguiente solución:

Metanol	20%
Acido acético	7%

Se realizaron varios cambios hasta aclarar totalmente el gel.

Anexo II

Protocolo para Western blot.

Todas las técnicas que se realizaron de Western Blot se utilizó la cámara Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Bio Rad.

1.- La preparación del gel para inmunoblot se realiza de la misma manera como se explica en el Anexo I, solo que el gel separador se forma con un peine para geles preparativos. En este caso este se incubaba en el amortiguador de transferencia en vez de fijar el gel.

2.- Transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa.

a: Se prepara un amortiguador de Tris 25 mM, Glicina 192mM, Metanol 20% a pH 8.3, en el cual se incubaba un par de esponjas, un par de papeles filtro, el gel y papel de nitrocelulosa por 15 min antes de proceder a la transferencia. Después de este período se procede a colocar en un dispositivo de acrílico en forma de un emparedado: una esponja, un papel filtro, el gel y el papel de nitrocelulosa; nuevamente un papel filtro y la esponja. Todo esto debe quedar totalmente centrado en el cassette y libre de burbujas para evitar resistencia de las proteínas a transferirse a el papel de nitrocelulosa.

Cuidando que el gel se encuentre hacia el electrodo negativo y el papel de nitrocelulosa hacia el positivo.

b: El mismo amortiguador es utilizado para la transferencia. Dentro de la cámara debe colocarse una unidad de enfriamiento con agua desionizada congelada previamente. El tiempo del proceso es de 75 min a 100 volts.

c: Al terminar el paso anterior para monitorear la transferencia de proteínas se tiñe una tira del papel transferido con amido black al 0.1%, isopropanol al 25% y ácido acético al 10%

durante cinco min y se destiñe en isopropanol al 25% y ácido acético al 10% por 10 min

d: Para evitar un pegado inespecífico el resto del papel se bloquea con albúmina al 1% en PBS durante toda la noche con agitación continua a temperatura ambiente.

3.- Formación de la reacción inmunoenzimática en la membrana.

a: Se corta en tiras el papel de 0.4 cm con 6µg de proteína por tira de papel e incuban con los sueros a analizar diluidos en albúmina al 1% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación continua.

b: Las tiras de papel se lavan con PBS-tween 20 al 0.1% 5 min/seis veces.

c: Se añade un segundo anticuerpo unido peroxidasa en PBS-tween 20 al 0.1% diluido 1:2000. Este se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación continua.

d: Nuevamente se lavan las tiras de papel con PBS-tween 20 al 0.1% cada 5 min/ seis veces.

e: Para revelar la reacción se agrega el sustrato 3'3-diamonobenzidina en una concentración 0.5mg/ml disuelto en PBS más 0.02% de peróxido de hidrógeno y se espera una reacción colorida.

f: La reacción se detiene quitando el sustrato y agregando agua desionizada. Y las tiras se secan entre papel filtro.

Anexo III

Protocolo para la reacción de Shiff-Pas.

1.- Preparación del reactivo de Shiff, para 200 ml.

Fucsina básica	2gr
Metabisulfito de potasio	1 gr
Acido clorhídrico 1N	10ml
Carbón activado	2 gr

a) En agua hirviendo y agitando se agrega el colorante, mantener a 50°C, sin dejar de agitar.

b) Filtrar y añadir en el momento el ácido clorhídrico 1N a temperatura ambiente.

c) Agregar el metabisulfito de potasio.

d) Dejar la solución preparada durante 12 hrs.

e) Añadir el carbón y agitar por un min y filtrar dos veces en papel whatman no.1, almacenar a 4°C.

2.- Fijar el gel durante una hora en la solución que se disuelve el azul de Comasie, e inmediatamente colocarlo en ácido tricloroacético al 10% durante 12 hrs, cuidando que se encuentre a 4°C.

3.- Lavar con ácido acético al 7% durante 30 min a temperatura ambiente.

4.- Colocar el gel en ácido peryódico al 0.02% a 4°C durante 45 min en oscuridad.

5.- Se coloca en el reactivo de Shiff, inmediatamente después de un rápido lavado con ácido acético al 7%. Se mantiene en oscuridad durante toda la noche.

6.- Finalmente se deja a temperatura ambiente, la reacción se observa cuando comienza a

parecer una coloración rosada sobre el gel, llegando hasta un tono rosa fuerte o casi rojo.

7.- Por último se aclara el fondo del gel con dos o tres lavados de ácido acético al 7%, manteniéndose las proteínas positivas.

8.- Por último el gel se deja en agua desionizada.

Anexo IV

Protocolo para la detección de actividad enzimática.

1.- Preparación del gel utilizado en la detección de actividad enzimática de proteínas.

a) Gel separador al 10%

Acrilamida al 30%/ bisacrilamida al 1%	1.65 ml
4X Tris-HCl 1.5 M/ SDS 0.4% pH 8.8	1.125ml
PBS	0.05 ml
Gelatina al 1%	0.45 ml
Agua desionizada	1.225ml

Se mezcla perfectamente todas las soluciones y después se agregan los siguientes reactivos.

Amonio persulfato al 10%	0.010 ml
Temed	0.005 ml

b) Gel concentrador al 5%

Se prepara siguiendo la metodología especificada en el anexo I.

c) Amortiguador de corrida.

4XTris-HCl pH 8.8 0.025 M	1.211 gr
Glicina 0.192 M	5.765 gr
SDS 4%	0.4 gr

d) Preparación de la muestra.

Para preparar cinco ml del amortiguador.

SDS 2.5%	0.5 gr
----------	--------

Sacarosa 1% 0.2 gr

Rojo de fenol 4 μ g/ml 0.0020gr

La muestra se coloca 1:1 volumen, sin hervir en los pozos del gel.

Las condiciones de colocación de la muestra y corrida para la electroforesis deben ser a 4°C, a 100 volts durante 2:30 hrs.

2.- Al término de la electroforesis al gel se le dará el siguiente tratamiento:

a) El gel se coloca durante una hora agitando generosamente en una solución de Tritón X-100 al 2.5%, en un volumen de 300 ml, para remover el SDS.

b) Se transfiere a un baño a 37°C de glicina-NaOH al 0.1 M pH 8 e incuba durante 2 horas.

c) El se fija y tinte durante una hora en la siguiente solución:

Amido black 0.1% 0.05 gr

Metanol 30% 150 ml

Acido acético 10% 50 ml

Agua desionizada 60% 300 ml

d) El gel es aclarado en la misma solución sin amido black.

3.- La actividad se detecta en bandas claras, donde el sustrato a sido digerido por la proteasa correspondiente.