



11261/2
2E

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ACCION DE UN INMUNOGENO EN CONTRA
DE TRYPANOSOMA CRUZI**

T E S I S
PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(PARASITOLOGIA)

P R E S E N T A

JOSE TRINIDAD SANCHEZ VEGA



FALLA DE ORIGEN

México, D. F. Ciudad Universitaria

1995



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.

Acción de un Inmunógeno en contra de *Trypanosoma cruzi*

I N D I C E

| | Pág. |
|---|------|
| I. INTRODUCCION | 1 |
| I.1 Sinónimos | 1 |
| I.2 Definición | 1 |
| I.3 Etiología | 1 |
| I.4 Epidemiología | 2 |
| I.4.1 Taxonomía y clasificación de triatomíneos | 9 |
| I.4.2 Ciclo de transmisión de <i>T. cruzi</i> por los triatomíneos | 10 |
| I.4.3 Reservorios | 12 |
| I.5 Morfología | 12 |
| I.6 Ciclo biológico | 17 |
| I.7 Mecanismo de transmisión | 19 |
| I.8 Patología y Fisiología | 21 |
| I.8.1 Fase aguda | 22 |
| I.8.1.1 Exámenes específicos | 28 |
| I.8.1.2 Exámenes inespecíficos | 28 |
| I.8.1.3 Diagnóstico diferencial | 28 |
| I.8.1.4 Tratamiento de la Enfermedad de Chagas aguda. | 29 |
| I.8.2 Fase crónica | 30 |
| I.8.2.1 Fase crónica indeterminada | 30 |
| I.8.2.2 Cardiopatía chagásica crónica | 31 |
| I.8.2.3 Curso clínico y pronóstico de la cardiopatía crónica chagásica | 36 |
| I.8.2.4 Tratamiento sintomático de la cardiopatía crónica chagásica | 36 |
| I.8.3 Esofagopatía chagásica | 37 |

| | | |
|----------|--|----|
| 1.8.3.1 | Esofagopatía chagásica (clasificación evolutiva). | 38 |
| 1.8.3.2 | Esofagopatía chagásica (tratamiento). | 39 |
| 1.8.4 | Colopatía chagásica. | 39 |
| 1.8.5 | Otras alteraciones de la enfermedad de Chagas crónica. | 40 |
| 1.8.5.1 | Duodeno. | 40 |
| 1.8.5.2 | Estómago. | 40 |
| 1.8.5.3 | Intestino delgado. | 40 |
| 1.8.5.4 | Hígado. | 41 |
| 1.8.5.5 | Vías biliares extrahepáticas. | 41 |
| 1.8.5.6 | Glándulas salivales. | 41 |
| 1.8.5.7 | Sistema nervioso. | 41 |
| 1.9 | Tratamiento específico de la enfermedad de Chagas. | 42 |
| 1.9.1 | Nifurtimox. | 42 |
| 1.9.2 | Benzonidazol. | 42 |
| 1.10 | Respuesta inmune en la infección por <i>T. cruzi</i> . | 43 |
| 1.10.1 | Respuesta inmune en la fase aguda. | 43 |
| 1.10.2 | Respuesta inmune en la infección crónica. | 45 |
| 1.10.3 | Respuesta inmune asociada a la resistencia. | 46 |
| 1.10.3.1 | Células fagocíticas. | 46 |
| 1.10.3.2 | Anticuerpos. | 47 |
| 1.10.3.3 | Inmunidad celular. | 49 |
| 1.10.4 | Respuesta inmune asociada a la agresión tisular. | 50 |
| 1.11 | Profilaxis. | 51 |
| 1.11.1 | Lucha contra el vector. | 51 |
| 1.11.2 | Control en la transmisión transfusional. | 52 |
| 1.11.3 | Elaboración de vacunas. | 52 |
| 2. | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. | 55 |
| 3. | OBJETIVO. | 56 |
| 4. | DISEÑO EXPERIMENTAL. | 57 |
| 4.1 | Preparación de medios de cultivo de Novy, Mc Neal y Nicolle (NNN). | 57 |
| 4.2 | Selección de diversas cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> . | 58 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4.3 | Mantenimiento y estandarización de cepas de <i>T. cruzi</i> en medios NNN. | 59 |
| 4.4 | Preparación de Inmunógeno de <i>T. cruzi</i> | 60 |
| 4.5 | Determinación de la DI100 de las cepas de <i>T. cruzi</i> | 61 |
| 4.6 | Inmunización de animales de experimentación. | 66 |
| 4.7 | Reto con tripomastigotes sanguíneos de cepa virulenta. | 66 |
| 4.8 | Determinación de parasitemias en los animales. | 68 |
| 4.9 | Búsqueda de nidos de amastigotes en diversos órganos y tejidos de los animales infectados. | 69 |
| 5 | RESULTADOS. | 71 |
| 5.1 | Presencia de tripomastigotes sanguíneos en sangre periférica. | 71 |
| 5.2 | Presencia de amastigotes en diversos tejidos. | 74 |
| 5.3 | Análisis estadístico. | 74 |
| 6. | DISCUSION. | 77 |
| 7. | CONCLUSIONES. | 80 |
| 8. | AGRADECIMIENTOS. | 81 |
| 9. | BIBLIOGRAFIA. | 82 |

***A ti que eres omnipotente
con mi eterno agradecimiento.***

Quiero dedicar con todo cariño esta tesis, a todas aquellas personas que de una u otra manera, contribuyeron a la culminación de esta etapa de mi carrera.

A mis padres:

Teresita y Carlos

***con cariño y gratitud por el
enorme sacrificio que realizaron
para mi formación profesional.***

***Mis metas alcanzadas, siempre serán
el triunfo de ellos.***

***A todos y cada uno de mis maestros
que han dedicado su valioso tiempo
en orientarme hacia el saber, mi mayor
gratitud y respeto, gracias.***

A Lilla Robert

***Por su comprensión, ayuda y estímulo
a seguir adelante en los momentos
difíciles.***

A mis hijos :

Nacho y Nini Nana

**quienes me han servido de motivo
de superación.**

A mis hermanos y tíos.

***Por su cariño incondicional y apoyo
inquebrantable que siempre me han
brindado.***

A mis compañeros y amigos

A Rulo en especial.

***Por su amistad, porque juntos
compartimos una idea, una esperanza
y una realidad.***

Al Doctor Jorge Tay Zavala

***Maestro por vocación, de amplios y profundos
conocimientos, con su ejemplo en la labor cotidiana
va creando mística de trabajo y esfuerzo como base
de superación.***

***Porque me dió de la Parasitología
Juicio para entenderla,
Criterio para aplicarla y
Actitud para responder por ella.***

***Gracias por su valiosa ayuda como director de este
trabajo, por su sencillez, por su gran calidad humana
y su valiosa e inapreciable amistad.***

A la

***Universidad Nacional Autónoma de México por
haberme brindado el privilegio de aprender y
compartir su ideología.***

"Como las ramas de un árbol
devuelven la savia a la raíz...
de donde vino,
como un río derrama su corriente
en el mar
de donde provino,
así el corazón del agradecido
se deleita en devolver el
beneficio recibido".

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de
Parasitología del Departamento de
Microbiología y Parasitología, Facultad de
Medicina, Universidad Nacional Autónoma de
México, bajo la Asesoría y Supervisión
directa del Dr. Jorge Tay Zavala.**

1. INTRODUCCION.

1.1. Sinónimos.

La tripanosomiasis americana es conocida también como Enfermedad de Chagas Mazza, enfermedad de Chagas Mazza-Romaña y *Trypanosomiasis cruzi*.⁽¹⁾

1.2. Definición.

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*; fue descrita por el doctor Carlos Justiniano Ribiero DAS Chagas en 1909 ⁽²⁾, acontecimiento singular en la historia de la medicina, al ser un solo investigador el responsable del descubrimiento, de su agente etiológico, de su vector, de sus reservorios y de la descripción de la enfermedad.

Esta parasitosis hística y hemática afecta particularmente miocardio, esófago y colon. Se transmite por las deyecciones de artrópodos de la familia Triatominae conocidos en nuestro medio como chinches besuconas, hociconas, talajes, piçk, de Compostela ⁽³⁾, etc. aunque también puede ser adquirida por vía transplacentaria *in útero*, por transfusión sanguínea, a través de la leche materna, por ingestión de los artrópodos transmisores, por ingestión de animales semicrudos y por la falta de cuidado al trabajar con animales o material en el laboratorio así como por el transplante de órganos ^(4, 5).

1.3 Etiología.

El agente etiológico es *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909), parásito flagelado, perteneciente al: Reino Protista, Subreino Protozoa, Phylum Sarcocystophora, Subphylum Mastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, suborden Trypanosomatina, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, sección Stercoralia, especie *T. cruzi*.⁽⁶⁾

1.4 Epidemiología.

Esta enfermedad se encuentra distribuida en amplias áreas silvestres del Continente Americano, de donde evolucionó hacia el ciclo doméstico de la infección, mediante procesos ecológicos, permaneciendo en el ciclo a través del hombre, vectores y mamíferos naturalmente infectados ^(7, 8, 9).

Con las migraciones de las poblaciones rurales hacia las grandes ciudades, el parásito acompañó al hombre y pasó a ser transmitido por transfusiones de sangre, dentro del ambiente hospitalario, configurándose una verdadera "urbanización de la enfermedad" ^(10, 11).

Las condiciones socioeconómicas sobre todo el tipo de vivienda en las cuales viven las personas principalmente en América Latina, juegan un papel importante en la prevalencia de esta enfermedad ^(12, 13).

La coexistencia del hábitat entre el hombre y los reservorios silvestres y domésticos así como la presencia de los artrópodos transmisores, están íntimamente relacionados con las condiciones de vivienda, características de los países en vías de desarrollo (Fig. 1), principalmente en construcciones con materiales como madera, adobe o piedra, sitios donde se forman criaderos de estos insectos transmisores. ^(4, 14, 15, 16, 17)

Al igual que todas las parasitosis, la tripanosomiasis Americana es una enfermedad ligada a la pobreza. En 1970, la Organización Panamericana de la Salud, la declaró enfermedad social, debido a las grandes implicaciones socioeconómicas que produce ⁽¹⁸⁾.



Fig. 1 Vivienda típica donde pueden alojarse los transmisores. (Oaxaca, Oax. Méx).

La enfermedad de Chagas se encuentra únicamente en las Américas, desde el paralelo 41, 198 Norte, al Sureste de Estados Unidos, hasta el 45, 198 Sur al sureste de Argentina. De acuerdo al reporte de la Organización Mundial de la Salud publicado el 24 de agosto de 1990, la prevalencia de la infección chagásica en el continente alcanza los 16 millones de casos, existiendo aproximadamente 90 millones de personas en riesgo de contraer la infección con *T. cruzi* por vivir en lugares donde coexisten todos los elementos necesarios para que esta parasitosis sea prevalente ^(4, 5, 12, 13, 19).

Los países donde el mal de Chagas es endémico, pueden ser divididos en 4 grupos de acuerdo a la magnitud de la transmisión, cantidad y calidad de información epidemiológica disponible, y la existencia o no de acciones

coordinadas para el control de la enfermedad.

Grupo I: Argentina, Brasil, Chile, Ecuador, Honduras, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela con alta prevalencia de infecciones humanas y alta infestación de casas por triatomeos con programas de control establecidos.

Grupo II: Bolivia, Colombia, Costa Rica y México, con evidencia de transmisión intradomiciliaria, con una clara asociación entre las infecciones de *T. cruzi* y alteraciones electrocardiográficas, sin programas de control establecidos.

Grupo III: El Salvador, Guatemala, Nicaragua y Panamá donde hay evidencia serológica de la infección pero no hay información epidemiológica apropiada que correlacione la presencia del vector infectado con la existencia de pacientes chagásicos.

Grupo IV: Bahamas, Belice, Cuba, República Dominicana, Granada, Guayanas, Haití, Jamaica, Estados Unidos de América, en donde la enfermedad es enzoótica.

En la República Mexicana se considera como área endémica la porción de terreno localizada entre los 0 y 2200 metros sobre el nivel del mar, dado que en esos sitios se han encontrado triatóminos infectados por *T. cruzi* dentro de la habitación humana así como personas y animales infectados (Tabla 1).

Los estados donde se han encontrado mayor número de casos humanos son Oaxaca, Jalisco, Chiapas, Michoacán, Guerrero, Zacatecas, Yucatán, Veracruz y México ^(4, 12, 20, 21, 22, 23) (Fig. 2).

TABLA 1

Relación por localidades y estados de 187 casos humanos de tripanosomiasis americana comprobados en México hasta 1991.

| Nº de casos | Localidades | Investigadores y años |
|-------------|---|---------------------------------|
| 2 | Teojomulco, Oaxaca | Mazzotti 1940 |
| 1 | Mérida, Yucatán | Palomo, 1948 |
| 1 | Tutuapan, Edo. de México | Biagi y col., 1958 |
| 1 | Guaymas, Sonora | Palencia y Montaño, 1959 |
| 1 | Atoyac de Alvarez, Guerrero | *Rodríguez y col., 1961 |
| 1 | Mixteca Baja, Oaxaca | Tay y col., 1961 |
| 1 | Tetiltán, Guerrero | Biagi y col., 1964 |
| 1 | Compostela, Nayarit | *Pérez Reyes, 1964 |
| 1 | Tierra Blanca, Veracruz | *Hernández, L. 1965 |
| 1 | El Limón, Oaxaca | Biagi y Arce, 1965 |
| 1 | Tutupec, Oaxaca | Biagi y Arce, 1965 |
| 5 | Tepechitlán y Jalpa, Zacatecas | |
| | Chimatitlán, Sta. María de los | |
| | Angeles, Jalisco y Acatlán, Jal. | Cuartero y col., 1967 |
| 2 | Tonalá, Jalisco | Velasco y Tellaache, 1967 |
| 1 | Acatlán de Juárez, Jalisco | Velasco y col., 1970 |
| 1 | Chila, Oaxaca | Goldsmith, 1971 |
| 1 | Tepechitlán, Zacatecas | Martínez Marañón y col., 1972 |
| 1 | Jojutla, Morelos | González y col., 1962 |
| 1 | Hunuema, Yucatán | Zavala, 1973 |
| 3 | Atotonilco, Jalisco | Velasco y col., 1974 |
| 6 | Muna, Tizincab, Yucatán | Quintal y col., 1975 |
| 74 | Varias localidades (Chiapas, Jalisco, Oaxaca y Zacatecas) | Tellaache, 1976 (CNEP) |
| 8 | León Brindis, Palenque, Chiapas | Ortega y col., 1976 |
| 3 | Agua Azul, Chilón, Chiapas | Ortega y col., 1976 |
| 1 | Magdalena, Jalisco | *Velasco y col., 1976 |
| 18 | Yucatán | Zavala y col., 1974 |
| 8 | Zoccalco de Torres, Jalisco | Tay y col., 1974 |
| 1 | Sn. Juan Colorado, Oaxaca | Salazar y col., 1979 |
| 3 | Atoyac, Jalisco | Velasco y col., 1979 |
| 1 | Tomaltepec, Oaxaca | Salazar y col., 1984 |
| 4 | Miahuatlán, Jalisco | Tay y col., 1974 |
| 5 | Santiago Yosotiche, Oaxaca | *Cortés, 1985 |
| 10 | Tuxcueca, Jalisco | Velasco y Guzmán, 1986 |
| 1 | Cocula, Jalisco | Depto. Sal. Públ. Jalisco, 1986 |
| 2 | Sayula, Jalisco | Depto. Sal. Públ. Jalisco, 1986 |
| 1 | Tareta, Michoacán | *Gutiérrez y Tay, 1987 |
| 1 | Culiacán, Sinaloa | *Candil, 1990 |

* Comunicación Personal

CNEP = Comisión Nacional de Erradicación del Paludismo

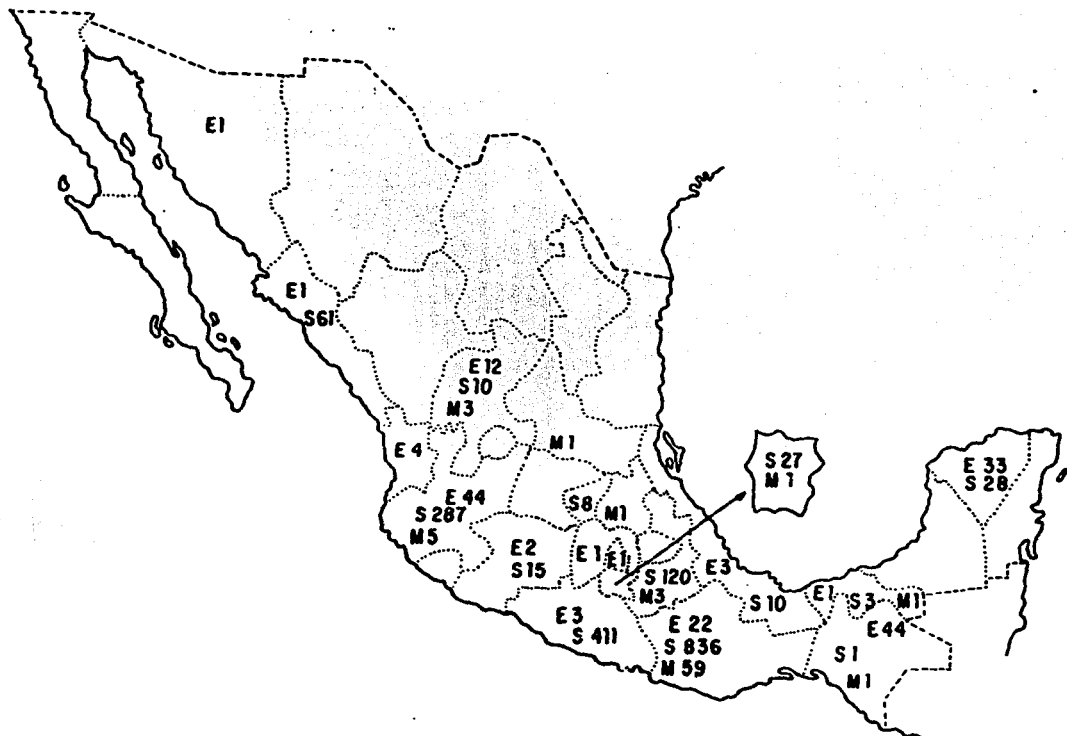


Figura 2.- Distribución por estados del número de casos humanos de infección por *T. cruzi* y de miocarditis compatible con dicha etiología registrados en México hasta 1991. E= diagnóstico etiológico. S= diagnóstico serológico. M= con miocarditis compatible con etiología chagásida.

En forma natural *T. cruzi* posee buena capacidad para infectar a gran número de reservorios vertebrados y experimentalmente a una amplia variedad de artrópodos, entre los que figuran; Cimex, garrapatas de las familias Argasidae e Ixodidae y ejemplares de las familias Hipoboscidae (mosca de los borregos).⁽¹⁾

²⁴⁾ Sin embargo el único transmisor natural de la enfermedad es del orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominea.

Estos insectos miden entre 1 y 6.5 cm de longitud (*Triatoma protracta* y *Dipetalogaster maximus* respectivamente); su cuerpo es segmentado: cabeza - tórax - abdomen (Fig. 3).

En la porción cefálica poseen dos ojos prominentes, el tilos, dos antenas largas segmentadas en 4 porciones y la proboscis, misma que es recta y con tres segmentos.

Tienen sexos separados, tubo digestivo completo y aparato excretor constituido por los tubos de Malpighio, ambos finalizan en una cavidad común.

Poseen tres pares de patas y los adultos presentan un par de alas membranosas y un par de hemiólitros.

Son animales de actividad nocturna, durante el día reposan en sus criaderos naturales o en las hendiduras de paredes, techos, etc. Por la noche, comen ingiriendo cantidades variables de sangre dependiendo el estadio en que se encuentren (Fig. 4), así por ejemplo las ninfas de los primeros estadios ingieren en promedio 0.5 ml. y los adultos hasta 5 ó 6 ml., como es el caso de *D. maximus*.

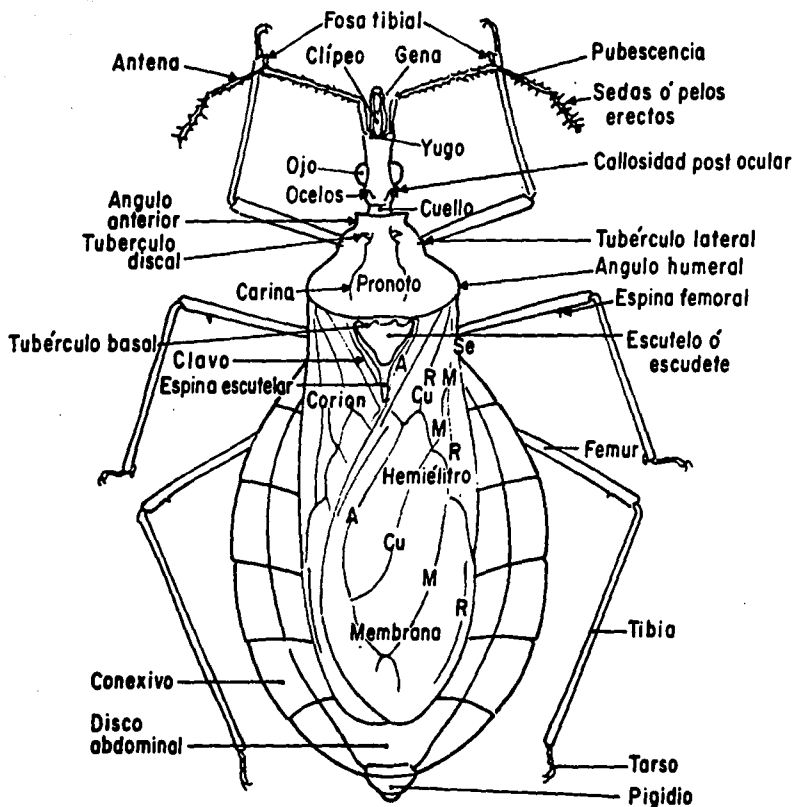


Figura 3.- Estructuras usadas en la clasificación de triatomíneos

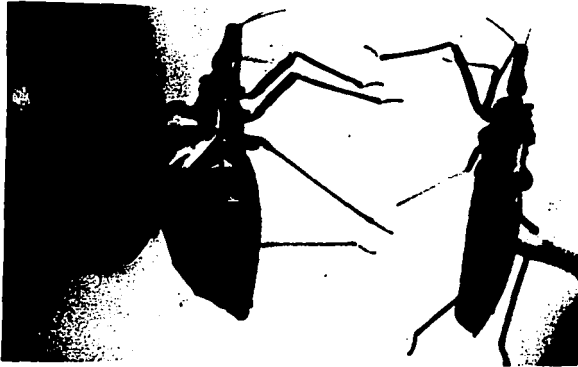


Fig. 4 Adultos de *Triatoma phyllosoma pallidipennis*. El de la izquierda ya se ha alimentado con sangre, el de la derecha aún no ha comido. (Fotografía cortesía Dr. Tey)

Tienen metamorfosis incompleta (paurometábolos) por lo que la ninfa del primer estadio se parece al adulto en su forma y hábitos alimentarios.

La duración de su ciclo vital depende de la temperatura ambiental por lo que oscila entre 4-6 meses hasta un año, término al cual se forma un adulto después de pasar por cinco etapas ninfales a partir de la eclosión del huevo (Fig. 5).



Fig. 5 Distintos estadios morfológicos por los que pasa *Triatoma pallidipennis* durante su vida. (Fotografía cortesía Dr. Tay).

1.4.1 Taxonomía y clasificación de triatóminos.

La subfamilia Triatominae se divide en cinco tribus:

1. **Balboderini:** Agrupa 4 géneros
 - Balbodera
 - Belminus
 - Parabelminus
 - Microtriatoma
2. **Cavernicoli:** Agrupa 1 género
 - Cavernícola
3. **Rhodniini:** Agrupa 2 géneros
 - Psammolestes
 - Rhodnius
4. **Alberproseniini.** Agrupa 1 género
 - Alberproseniini
5. **Triatomini:** Agrupa 8 géneros
 - Pastrongylus

FALLA DE ORIGEN

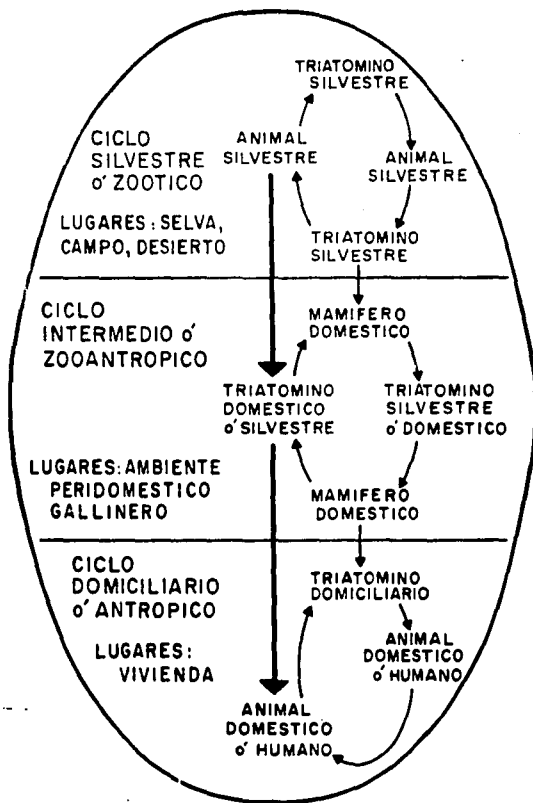
Dipetalogaster
Paratriatoma
Neotriatoma
Nesotriatoma
Linchosteus
Triatoma

1.4.2 Ciclo de transmisión de *T. cruzi* por los triatóminos.

En relación directa con su antropofilia *T. cruzi* realiza tres diferentes ciclos (Fig. 6).

1. **Ciclo silvestre o enzoótico o triatóminos silvestres que ocasionalmente pican al hombre.**
2. **Ciclo peridoméstico, intermedio, zooantropótico: lo realizan los artrópodos que habitan en las cercanías de la vivienda humana en los echaderos de animales tales como gallinas, perros, cerdos y otros, así como en nidos de ratas, ratones, tlacuaches y armadillos.**
3. **Ciclo doméstico, domiciliario o antropótico: insectos que tienen como principal fuente de alimento al hombre e incluso, viven en la misma habitación humana.**

Figura 6- LOS TRIATOMINOS Y SUS CICLOS EN LA NATURALEZA



Carcavallo, R.D.: Aspects of the epidemiology of Chagas Disease in Venezuela and Argentina, American Trypanosomiasis Research. PAHO Sc Pub.N. 318, 1975

1.4.3. Reservorios.

En general, existen pocos reportes realizados de estudios de los reservorios de *T. cruzi*. En la República Mexicana (Fig. 7) se han capturado reservorios infectados con *T. cruzi* en 10 estados, entre los huéspedes vertebrados reportados figuran: *Canis familiaris* (perro), *Bos taurus* (bovino), *Mus musculus* (ratón), *Rattus norvegicus* (rata noruega) *Dasyplus novemcinctus mexicanus* (armadillo).^[23]

La mayor parte del territorio nacional carece de datos a este respecto, no porque no existan reservorios, sino porque no se han realizado estudios que permitan conocer la situación del problema^[4, 12, 20, 23-31].

1.5 Morfología.

Trypanosoma cruzi en la naturaleza se presenta con cuatro estadios morfológicos: tripomastigote, promastigote, epimastigote y amastigote.

El tripomastigote es un flagelado de cuerpo alargado con 20 a 30 micras de longitud. Presenta un núcleo grande vesiculoso, un cinetoplasto subterminal posterior al núcleo formado por DNA y mitocondrias, de este cinetoplasto nace la membrana ondulante, misma que recorre al parásito a todo lo largo de su cuerpo saliendo libre en la porción anterior (Fig. 8).

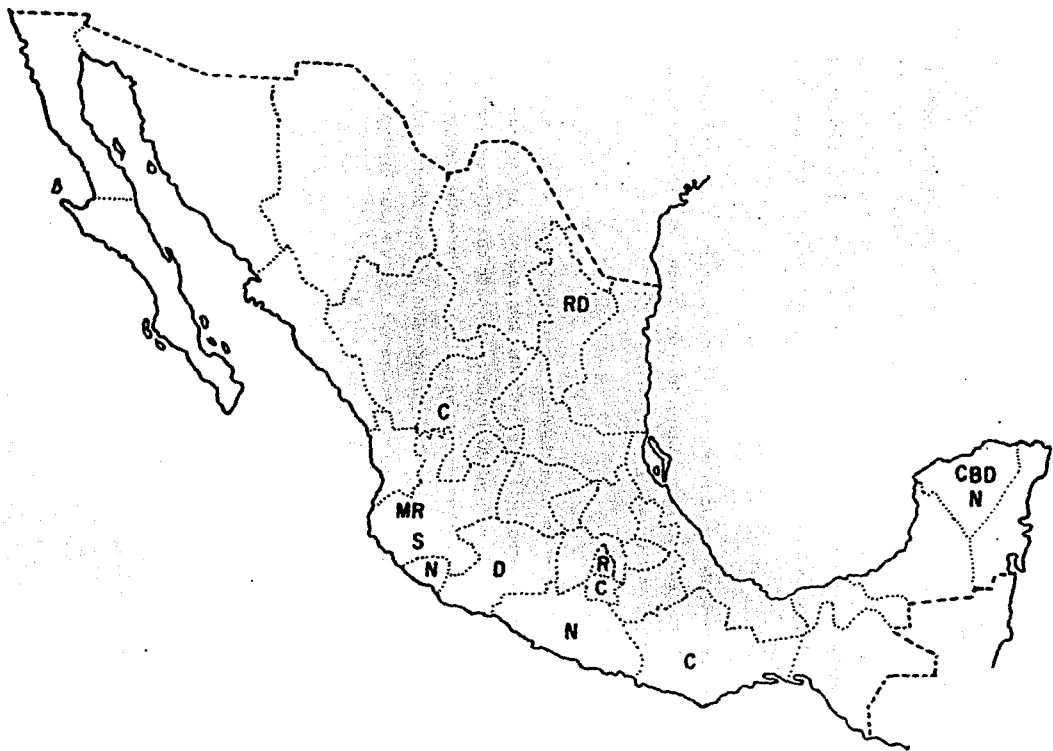


Figura 7.- Reservorios infectados con *T. cruzi* encontrados en México hasta 1985. C = Canis familiaris (perro). B = Bos taurus (vaca). M = Mus musculus (ratón). R = Rattus norvegicus (rata noruega). S = Sciurus vulgaris (ardilla). D = Didelphis marsupialis (tlacuache). N = Dasyus novemcinctus mexicanus (armadillo).



Fig. 8 Frotis sanguíneo, en el que se observan claramente las características de los tripomastigotes sanguíneos, sobre todo el núcleo, el cinetoplasto y la forma en C o S que adoptan (1000X).

Al tripomastigote se le encuentra en la sangre de los mamíferos y en el intestino posterior de los triatomíneos infectados, a este último se le denomina tripomastigote metacíclico, mismo que corresponde a la forma infectante para el hombre y otros animales (Fig. 9).

FALLA DE ORIGEN

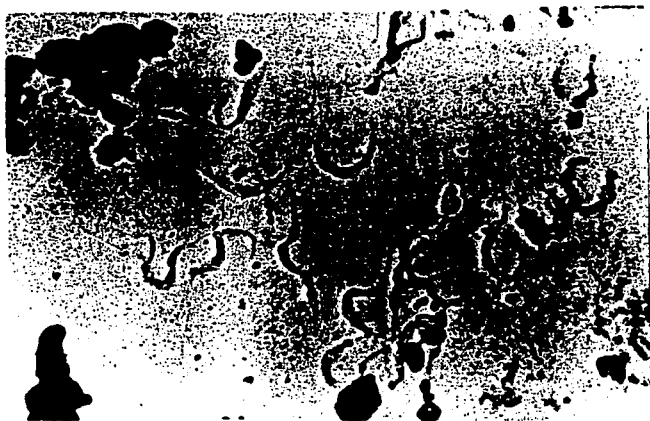


Fig. 9 Examen de excremento de Triatomino en el que se observan abundantes tripomastigotes metacíclicos vistos al microscopio de luz (1000X).

El promastigote es alargado, mide de 20 a 25 micras de longitud, posee un núcleo y un cinetoplasto, este se localiza en la porción anterior y lejos del núcleo y de él nace un flagelo mismo que sale libre por la porción anterior, este estadio morfológico no presenta membrana ondulante y es muy fugaz.

El epimastigote es fusiforme (Fig. 10), de 20 a 25 micras de longitud, el cinetoplasto ha migrado de la porción anterior del cuerpo, a la porción cercana al núcleo pero todavía anterior, el flagelo forma una membrana ondulante pequeña. En este estadio morfológico, el parásito se multiplica en el intestino de los triatominos profusamente, para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos.



Fig. 10

Epimastigotes de *T. cruzi* en cultivo (1000X).

El amastigote es redondeado, se le conoce también como forma leishmanoide o cuerpo de Leishman Donovan, mide de 2 a 5 micras de diámetro, posee un gran núcleo y cinetoplasto, carece de flagelo libre. Este estadio morfológico se localiza dentro de las células del huésped mamífero donde se multiplica activamente (Fig. 11).

FALLA DE ORIGEN



Fig. 11 Corte histológico de miocardio de ratón infectado con *T. cruzi* y teñido con hematoxilina-eosina, en el cual se observan claramente las fibras musculares, y un gran nido de amastigotes (X1000).

1.6 Ciclo biológico.

Se inicia cuando el triatómino pica a un mamífero y le succiona sangre con tripomastigotes sanguíneos circulantes, los cuales pasan al interior del intestino del artrópodo para transformarse en epimastigotes, estos se multiplican por fisión binaria longitudinal y en pocos días ya se cuenta con los tripomastigotes metacíclicos, formas infectantes para un nuevo huésped mamífero.

A medida que el triatómino esta ingiriendo sangre, puede también estar defecando sobre su huésped; hecho importante para comprender el fenómeno de la transmisión, dado que en sus deyecciones van contenidos los tripomastigotes metacíclicos mismos que son introducidos por el propio

FALLA DE ORIGEN

huésped al rasgar su piel o llevarlos a sus ojos o por el mismo artrópodo al arrastrar con sus patas las deyecciones hacia el agujero dejado por la proboscide al momento de picar.

Una vez que han penetrado los tripomastigotes por debajo de la piel, mucosas o conjuntiva ocular, se introducen en las células de los tejidos, teniendo especial predilección por las células del sistema retículo endotelial, en donde adoptan la forma de amastigote, se multiplican por fisión binaria y una vez que la célula donde se encuentran ya no es capaz de contenerlos, la rompen liberándose a la circulación; rápidamente se transforman en tripomastigotes sanguíneos y se diseminan a todo el organismo vía hematógena. Penetran por nueva cuenta a otras células, donde se transforman en amastigotes, se multiplican activamente y rompen las células para repetir el procedimiento antes descrito, hasta que aparecen anticuerpos circulantes que destruyen a los tripomastigotes sanguíneos pero no a los amastigotes que están dentro de los tejidos y que son los principales responsables del cuadro clínico (Fig. 12).

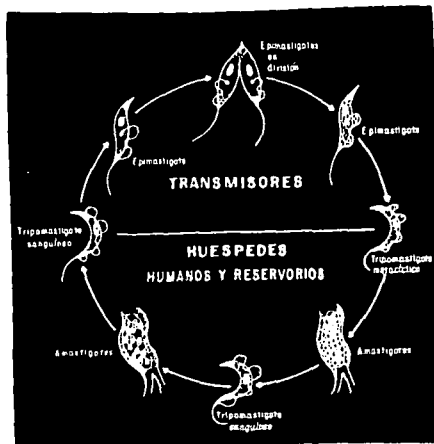


Fig. 12

Representación esquemática del ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* en el que se distinguen los eventos morfológicos que suceden en los transmisores (triatóminos) y en los huéspedes vertebrados (Reservorios y humanos).

El ciclo biológico se completa cuando un triatómino libre de infección pica y chupa sangre con tripomastigotes sanguíneos y se infecta.⁽³¹⁾

1.7 Mecanismo de transmisión.

Se mencionó anteriormente que aunque *Trypanosoma cruzi* se puede encontrar en otros insectos hematófagos (por ejemplo *Cimex*), el único transmisor natural y el mecanismo más importante para adquirir la infección es a través del triatómino; el tripanosoma penetra al organismo del vertebrado por medio de la contaminación de las heces en el sitio de la piel donde el insecto picó para alimentarse, donde la piel presenta abrasiones ó escoriaciones resultantes del rascado, o al frotarse los ojos o la boca con las manos contaminadas, donde *T. cruzi* finalmente penetra las mucosas.^(32, 33)

La transmisión por transfusión sanguínea es un mecanismo importante en áreas endémicas o en las grandes ciudades donde el control de la sangre de banco no es adecuado.^[34-40]

La transmisión congénita o transplacentaria ocurre en 2 a 4% de los neonatos de madres infectadas, en donde los amastigotes son encontrados en las células de Hofbauer, de donde son liberados y entran a la circulación fetal.^[41-48]

La transmisión por ingestión accidental o voluntaria del insecto es posible y probablemente sea un modo de infección común en los animales y entre algunos grupos étnicos. Se ha especulado acerca de la posibilidad de transmisión a través de carne mal cocida de animales como el armadillo o el tlacuache; este último animal convive a la perfección con *T. cruzi* y lo puede eliminar incluso a través de la orina.^[38-49]

La transmisión accidental en el laboratorio ocurre fácilmente al manipular cultivos, sangre infectada o animales infectados.^[35-38]

La transmisión por leche materna puede ocurrir en bebés de madres que presentan parasitemia importante en el momento de la lactancia.^[50, 51]

La presencia de tripomastigotes en la sangre menstrual es una potencial fuente de contagio sexual, que no ha tenido comprobación experimental.^[52]

La transmisión por medio del trasplante de órganos ocurre cuando el órgano a ser donado presenta amastigotes en las células de sus tejidos^[52-59] y por último, la transmisión de la infección puede ocurrir de un vector a otro por coprofagia o por canibalismo.

1.8 Patología y Fisiopatología.

En la enfermedad de Chagas, la susceptibilidad parece ser universal dado que carece de importancia la raza, la edad o el sexo, no ocurre así respecto al nivel socioeconómico y a la región geográfica, ya que es un padecimiento endémico propio de zonas rurales y subrurales y por lo tanto afecta a personas que habitan dichas áreas, por estas razones en la enfermedad de Chagas la interrelación parásito huésped es bastante dinámica y se relaciona con múltiples factores y condiciones ligadas al tripanosoma (cepa, virulencia, inoculación), al hombre y al medio ambiente. ^(3, 7, 10, 15, 22, 60)

La enfermedad presenta tres etapas:

- Aguda (inicial rápida)
- Indeterminada
- Crónica (tardía)

La enfermedad aguda predomina entre los menores de edad, la crónica suele aparecer muchos años después y por lo común posterior a un largo período de latencia (Fase indeterminada).

La edad tiene importancia en el pronóstico de la enfermedad aguda, ya que es mucho más grave en el feto, lactante y adolescente.

Una vez que ha penetrado *T. cruzi* al vertebrado, invade a las células, principalmente leucocitos polimorfonucleares y mononucleares, si logra escapar del fagolisosoma, los tripanosomas cambian de forma y activamente se reproducen utilizando los aminoácidos y enzimas citoplásmicas, colonizan células del sistema reticuloendotelial, neuronas del sistema nervioso central, esófago, colon y muy particularmente miocardio. ⁽⁶⁰⁻⁶³⁾

1.8.1 Fase aguda.

Comprende el período inicial de la infección caracterizado por parasitemia abundante, transitoriedad de los síntomas y signos, por las incipientes defensas humorales específicas y por un cuadro agudo febril.

Independientemente de la forma de transmisión del parásito, su duración generalmente se limita de 2 a 4 meses. En las zonas endémicas, la enfermedad de Chagas aguda es más intensa en los menores de edad, posiblemente este hecho se une a condiciones de inmadurez del sistema de defensa en individuos más jóvenes, coincidiendo con la mayor gravedad de la infección aguda y mayor letalidad de los mismos. ^(5, 14, 15, 64)

El período de incubación oscila entre 4 y 10 días, siendo generalmente asintomático. Durante este período y en los casos de transmisión por triatomíneos, se pueden notar manifestaciones cutáneas caracterizadas por lesiones generalmente sólidas, eritematopapulosas, que pueden presentar pequeñas vesículas. Más raramente las picaduras de insectos pueden provocar grandes reacciones eritematoinduradas, o generar fenómenos anafilácticos graves.

Aparentemente el período de incubación de la enfermedad de Chagas es de mayor duración en los casos de transmisión transfusional, pudiendo prolongarse hasta 20 ó 40 días. ^(20, 32, 38)

El cuadro clínico de la fase aguda se presenta en general asintomático u oligoasintomático, sobre todo en grupos etáreos de mayor edad, configurándose así una forma aguda inaparente. Este hecho dificulta bastante la identificación de pacientes agudos frente a la desvalorización del cuadro por el médico o por el propio paciente, facilitando su confusión con cuadros febriles discretos o pasajeros (gripe, faringitis etc.).

Los cuadros clínicos aparentes, configuran un conjunto más o menos definido de manifestaciones clínicas, que como se ha señalado, son más frecuentes y exuberantes en edades pediátricas, entre los datos clínicos figuran: fiebre, edema, adenomegalia, hepato y esplenomegalia.

La fiebre se presenta en el 95% de los casos detectados, oscilando entre 37 y 38°C con un perfil intermitente e irregular y según Carlos Chagas ⁽²⁾, puede ser continua y alta relacionándose con el estado de gravedad de la infección.

Generalmente la fiebre se acompaña de otros síntomas tales como astenia, mialgias, anorexia, cefalea y artralgias.

Los signos de puerta de entrada, también llamados "Chagomas", son lesiones cutáneo mucosas bastante importantes en los casos de transmisión por el artrópodo, hallándose presentes en el 60 a 80% de los casos agudos descritos, correlacionándose con la penetración del tripanosoma en el ser humano, resultante de la reacción local del organismo en las primeras fases de invasión.

De los chagomas descritos, el más típico es el que envuelve a la región ocular constituyendo un complejo denominado "Signo de Romaña", descrito por el argentino Cecilio Romaña ⁽⁶⁶⁾; esta alteración comprende un edema elástico indoloro bpalpebral en un ojo, con reacción conjuntival y ganglionar satélite (Figs. 13 y 14).

Los ganglios más afectados son los preauriculares y las cadenas cervicales principalmente las submaxilares homolaterales. Los párpados edematizados se tornan rosa violáceos produciendo también secreción conjuntival, frecuentemente con hipertrofia de la glándula lagrimal.

El comportamiento de las adenopatías es otro signo importante de la

enfermedad de Chagas aguda, tienen evolución lenta y pueden persistir por meses después de la desaparición de la fiebre. Los ganglios están moderadamente infartados, son móviles, endurecidos, no adheridos y discretamente dolorosos.

La hepatoesplenomegalia se presenta en el 30 a 40% de los casos descritos, estando prácticamente en todos aquellos de transmisión congénita. El hígado suele aumentar rápidamente de tamaño, si se instala una insuficiencia cardíaca aguda.



Fig. 13



Fig. 14

Figs. 13 y 14: Dos casos distintos de signo de Román de Miahuatlán Oaxaca, en los cuales se aprecia el edema bpalpebral y mancha discromica alrededor del ojo afectado.

Otras manifestaciones menos comunes son las exantemáticas. Asumiendo aspecto escarlatiniforme de distribución generalizada, en ocasiones presentan aspecto de eritema polimorfo.

Los fenómenos meningo-encefálicos son raros y de pronóstico sombrío, preferentemente se presentan en edades pediátricas (meningoencefalitis chagásica).^(66, 67) En estos casos son comunes los fenómenos convulsivos generalizados, con crisis frecuentes o espaciadas. En casos menos graves, el compromiso del sistema nervioso central se limita a una irritación fugaz de las meninges, pudiendo surgir contracturas o parálisis musculares localizadas.^(68, 69)

Con respecto al compromiso cardiaco, este es bastante frecuente, reportándose una miocarditis aguda, difusa e intensa. Para muchos autores, la miocarditis es la lesión anatómo patológica más constante de la fase aguda, ocurriendo aún en aquellos pacientes que en vida, presentan mínimos signos de compromiso

cardíaco.^(70, 71)

Clinicamente la cardiopatía chagásica aguda se manifiesta como otras miocarditis. El pulso se torna débil y rápido, existiendo tendencia a la hipotensión arterial.

El área cardíaca suele estar normal, sólo en los casos graves se encuentra acentuada. Esta cardiomegalia se debe a miocarditis y también a derrame pericárdico, siendo regresivo al cesar el cuadro inflamatorio.

A la auscultación cardíaca, se presenta ritmo regular, levemente hipofonético. Signos de pericarditis pueden o no estar presentes.

Los casos más graves evolucionan hacia la insuficiencia cardíaca congestiva derecha o izquierda, en ocasiones de instalación súbita y curso violento. Estos casos están relacionados con altas parasitemias e intensa reacción inflamatoria, principalmente en las edades pediátricas.^(60, 72)

Los hallazgos electrocardiográficos más frecuentes son las alteraciones difusas de la repolarización ventricular y los bloqueos auriculoventriculares de primer grado.⁽⁷³⁾

Otros signos y síntomas de la enfermedad aguda pueden ocurrir, especialmente a nivel digestivo como inapetencia, vómito y diarrea. Además Carlos Chagas desde sus primeras descripciones de esta enfermedad⁽²⁾, refería fenómenos disfágicos con cardiospasmos en algunos pacientes, sugiriendo un compromiso precoz del esófago.

La evolución y pronóstico de la fase aguda generalmente es benigna, llevando al paciente hacia una remisión gradual del cuadro entre los 30 y 90 días

posteriores a su instalación.

El sustrato fisiopatológico básico, de esta etapa comprende la acción del parásito, capaz de alcanzar e instalarse en todo el organismo desencadenando una pronta e intensa reacción inflamatoria. Anticuerpos específicos (IgM e IgG) comienzan a ser formados a partir de la primera semana del período de estado, condicionando paulatinamente la declinación de la parasitemia y por ende delimitando la duración de esta etapa y, en cierto modo, la gravedad del cuadro.

Con el transcurso de las semanas aparecen títulos elevados y persistentes de anticuerpos IgG y la demostración del parásito deja de ser posible por los métodos directos (en fresco y gota gruesa), caracterizándose así la entrada del paciente a la fase indeterminada.

La mayoría de los casos agudos evolucionan en forma benigna, se ha observado por ejemplo que en el 10 al 15% hay persistencia de alteraciones electrocardiográficas ⁽⁷⁴⁾, especialmente aumento del intervalo PR, lo que significa posiblemente la existencia de miocarditis activa en estos casos.

La detección de la fase aguda es muy importante, dado que hay posibilidad de que graves lesiones tardías de la fase crónica ("patías") dependan o se hayan originado a partir de fenómenos ocurridos en el período agudo⁽⁷⁴⁾. "El destino del chagásico se define en la fase aguda".

Establecida la sospecha clínica de la enfermedad de Chagas aguda sobre los datos epidemiológicos del paciente, en el laboratorio se realizará la confirmación diagnóstica. En general, los exámenes más importantes se agrupan en:

- a) Específicos e
- b) Inespecíficos

1.8.1.1 Específicos

La fase aguda se caracteriza por bajo nivel de anticuerpos en los primeros 10-15 días y una alta parasitemia, por lo que en este momento es importante demostrar al parásito mediante la búsqueda directa en sangre circulante a través del examen en fresco; las variantes de este método son: frote, gota gruesa y el método de Strout. En esta fase aguda es posible encontrar anticuerpos anti *T. cruzi* tipo IgM por inmunofluorescencia. Entre otros métodos específicos se cuenta con la realización del xenodiagnóstico, hemocultivo de la sangre del paciente y la inoculación de esta misma sangre en ratones jóvenes; finalmente también es posible realizar inmunodiagnóstico por las reacciones comunes de detección de IgG (reacción de fijación del complemento, hemaglutinación e inmunofluorescencia) realizadas repetidamente y con técnicas cuantitativas. ⁽⁷⁵⁾

1.8.1.2. Inespecíficos

Estos exámenes ayudan a dilucidar las sospechas clínicas y auxiliar en la evolución de los casos ya diagnosticados.

La biometría hemática se muestra normal o poco alterada, reportándose anemia hipocrómica con leucocitosis discreta y la velocidad de sedimentación acelerada.

El examen de orina reporta albúmina elevada. ⁽⁷⁶⁾

1.8.1.3 Diagnóstico diferencial

Las manifestaciones clínicas de la fase aguda comúnmente se confunden con una serie de entidades febriles, tales como enfermedades infecto contagiosas de la infancia, procesos exantemáticos, glomerulonefritis difusa aguda, toxoplasmosis aguda, malaria, fiebre tifoidea etc.; así como también con los linfomas y leucemias.

Especialmente en la edad pediátrica, la enfermedad de Chagas puede ser

confundida con encefalitis y meningoencefalitis producidas por otros agentes. La cardiopatía chagásica aguda tiene las mismas características de la miocarditis, endocarditis y pericarditis de otras etiologías. Por todo lo anteriormente comentado, los antecedentes epidemiológicos son de gran importancia para sospechar la enfermedad de Chagas aguda, por lo que siempre hay que tener en mente la procedencia inmediata del paciente, contacto con triatomíneos y antecedentes de transfusión sanguínea.

El médico debe tener presente que es necesario pensar en la enfermedad de Chagas aguda, aún en ausencia del signo de Romaña o de otros signos de puerta de entrada. Por otro lado se debe recordar la existencia de una serie de lesiones cutáneas que habría que diferenciar de las ocasionadas por el triatomíneo: miosis oculares, picaduras de insectos y edema angioneurótico.

1.8.1.4 Tratamiento de la enfermedad de Chagas aguda

La terapéutica específica debe ser instituida rápida y precozmente en esta fase de la infección.

Las drogas hasta ahora disponibles, poseen nítida acción supresiva sobre *Trypanosoma cruzi* y sin duda presentan su mejor efectividad en el período agudo de la infección. Su acción en general, va seguida de la disminución de la fiebre y la rápida desaparición de la parasitema así como la negativización de las reacciones serológicas.

Son dos los medicamentos de uso oral de gran utilidad en el tratamiento de la enfermedad de Chagas aguda: el nifurtimox a dosis diarias de 8 a 10 mg/Kg y el benzanidazol a dosis de 7 mg/kg. Ambos se deben administrar hasta por 120 días y la supresión de la parasitemia es casi invariable, con lo cual los pacientes agudos pueden quedar permanentemente curados. ^(77, 78, 79)

1.8.2 Fase crónica

En esta etapa de la infección se establece un equilibrio dinámico entre el parásito y las defensas del huésped, la parasitemia es baja, con gran cantidad de nidos intracelulares y nivel elevado y persistente de anticuerpos. Las lesiones inflamatorias son mínimas, pero a largo plazo se van formando fibrosis en sustitución de tejidos nobles, destruidos por la secuencia de ciclos del tripanosoma.

Las manifestaciones clínicas dependerán de la localización y extensión de las lesiones producidas durante el curso de la infección, a través de una serie de mecanismos fisiopatogénicos. Factores ligados al parásito (cepas, virulencia, antigenicidad) y al huésped (edad-estado nutricional, actividad) son capaces de influir en el curso de la enfermedad y redundar en diferencias individuales o regionales de sus portadores. ⁽⁸⁰⁾

Una vez concluido el período agudo, la gran mayoría de los pacientes pasará a una etapa clínicamente silenciosa y sin manifestaciones detectables: **la fase indeterminada.**

1.8.2.1 Fase Crónica Indeterminada

En esta fase, desaparece la sintomatología y el individuo se considera curado. Sin embargo la serología persiste positiva, el electrocardiograma, y las radiografías de corazón, esófago y colon, se reportan normales.

Esta etapa es la forma más frecuente e importante epidemiológicamente ya que se presenta en la mayoría de los chagásicos crónicos menores de 25 años, para posteriormente evolucionar después de esta edad, con un porcentaje elevado a las formas cardíacas o digestivas, permaneciendo indefinidamente en la forma indeterminada. ⁽⁸¹⁾

1.8.2.2 Cardiopatía Chagásica Crónica

Es la forma más importante de alteración y limitación para el paciente chagásico y sobre todo, la principal causa de muerte.⁽⁸²⁾ La cardiopatía chagásica crónica incide básicamente entre los 20 y 50 años de edad, su evolución natural es el avance lento y progresivo hacia el síndrome de insuficiencia cardíaca pero frecuentemente esta secuencia es interrumpida por muerte súbita.⁽⁸³⁾ En por lo menos el 40% de los casos, esta cardiopatía tiene una evolución benigna, permitiendo una sobrevida del paciente hasta los 60 ó más años de edad.

En forma sumaria los principales componentes sindromáticos de la cardiopatía chagásica crónica son:

a) **Insuficiencia cardíaca congestiva:** Esta es de predominio derecho, con cardiomegalia global severa, retorno venoso alterado, hígado crecido, edema podálico bilateral e ingurgitación yugular. Se puede presentar derrame pericárdico en la medida que el cuadro se agrava y el corazón aumenta de tamaño. La insuficiencia cardíaca del chagásico es de mal pronóstico y por lo general su descompensación significa poco tiempo de vida, dado que existen fenómenos de destrucción celular y fibrosis con carácter progresivo e irreversible.

b) **Arritmias y trastornos de conducción:** El corazón del chagásico crónico es mucho muy exitable, proviniendo de ello una gran frecuencia de ritmos ectópicos, principalmente extrasístoles ventriculares. También es característico el bloqueo completo de la rama derecha, asociado o no a un hemibloqueo anterior izquierdo. Cuando se llegan a presentar bloqueos aurículo-ventriculares completos, fibrilación auricular, bloqueo completo de rama izquierda y extrasístoles ventriculares multifocales, el pronóstico es fatal.

c) **Fenómenos tromboembólicos:** Son originados por la hipocontractibilidad y estasis sanguínea, ocurren especialmente en corazones ya crecidos e

insuficientes. La muerte puede ocurrir como consecuencia de infartos pulmonares y cerebrales.

d) Fenómenos de hipoquinesia miocárdica: Estos fenómenos son los responsables de la formación de fibrosis y aneurismas, especialmente a nivel ventricular (punta del ventrículo izquierdo).

e) Fenómenos isquémicos: Los grandes vasos no muestran lesiones importantes a no ser que existan placas ateromatosas. En cambio, los pequeños vasos coronarios presentan lesiones secundarias a la fibrosis, mismas que son las responsables de las alteraciones de la repolarización observada en los electrocardiogramas.

En suma, las manifestaciones de la cardiopatía chagásica crónica dependen básicamente de la gravedad de las alteraciones del miocardio, de la presencia y del tipo de arritmias y de la existencia de insuficiencia cardíaca.^(73, 84, 85)

La auscultación del paciente chagásico en esta etapa, nos da datos relativamente pobres, dado que los ruidos cardíacos pueden ser normo o hipofonéticos, es común el desdoblamiento del segundo ruido sobre todo en los casos de bloqueos completos de la rama derecha. Raramente se detectan soplos por lesiones valvulares, existen soplos que son muy suaves de eyección en la punta con carácter proto ó protomesosistólicos.

Desde el punto de vista radiológico, la silueta cardíaca es normal al finalizar la fase aguda y durante algún tiempo de la fase crónica mientras, se va agudizando la insuficiencia cardíaca. La mayoría de las veces, el corazón se agranda con predominio de los diámetros transversales sobre los longitudinales, es decir, se observa una silueta ensanchada (Fig. 15).



Fig. 15 **Cardiomegalia producida por *Trypanosoma cruzi* de un caso mexicano procedente del estado de Oaxaca.**

Por lo regular, los pacientes con insuficiencia cardíaca desarrollan grandes cardiomegalias con o sin derrame pericárdico.

En la ventriculografía se puede observar la característica lesión apexiana de la cardiopatía chagásica crónica o "aneurisma de la punta", también conocida como pico de cigüeña, de loro etc.⁽⁸⁶⁾ (Fig. 16 y 17).



Fig. 16

Aspectos de un corazón afectado por *T. cruzi* en el que macroscópicamente se observa el adelgazamiento de las paredes del ápice cuya presencia se incrementa al ponerle una fuente luminosa.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

FALLA DE ORIGEN



Fig. 17 Corte histopatológico de corazón chagásico en el que se observa la lesión del ápice dándole una apariencia de pico de cigüeña, de loro etc.

El electrocardiograma constituye el principal procedimiento diagnóstico de la cardiopatía chagásica crónica, inclusive superando a la sintomatología y al examen clínico. En áreas endémicas las alteraciones electrocardiográficas aparecen precozmente incluso muchos años antes de que se establezcan los cuadros de la insuficiencia cardíaca. Los trastornos electrocardiográficos que se observan en la cardiopatía chagásica crónica son variados, pero se destacan los trastornos de formación y conducción del estímulo, siendo los de peor pronóstico las arritmias ventriculares, la fibrilación auricular, el bloqueo de rama izquierda, el bloqueo aurículo-ventricular completo y las áreas eléctricamente inactivas, es decir, la fibrosis; el bloqueo completo de rama derecha es la alteración electrocardiográfica más característica de la miocarditis chagásica crónica afortunadamente esta es una alteración "benigna".

FALLA DE ORIGEN

De acuerdo a las alteraciones electrocardiográficas y a la sintomatología se ha establecido una clasificación evolutiva de la cardiopatía crónica chagásica con el objeto de establecer el grado de severidad de la misma.^(73, 74)

- 1er. Período:** Infección por *T. cruzi* demostrado serológicamente, pero sin ninguna evidencia clínica, radiológica o electrocardiográfica de compromiso.
- 2do. Período cardíaco:** Sintomatología ausente o discreta, área cardíaca normal o levemente agrandada en la radiografía y presencia de alteraciones "benignas" en el electrocardiograma (Bloqueo completo de rama derecha).
- 3er. Período:** Sintomatología evidente, cardiomegalia moderada y presencia de alteraciones importantes en el electrocardiograma (arritmias ventriculares, fibrilación auricular).
- 4to. Período:** Sintomatología acentuada con insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomegalia importante a los Rx y severas alteraciones electrocardiográficas (fibrosis).

Se considera que el paciente puede fallecer súbitamente en cualquiera de los períodos excepto en el primero.

1.8.2.3 Curso Clínico y pronóstico de la Cardiopatía Crónica Chagásica

Regularmente las lesiones cardíacas de la tripanosomiasis se desarrollan y progresan hacia la instalación de la insuficiencia cardíaca, misma que puede ser la principal responsable de la muerte del chagásico.

1.8.2.4 Tratamiento Sintomático de la cardiopatía Chagásica Crónica

Esta afección generalmente es rebelde a los esquemas terapéuticos habituales

y disponibles, especialmente en los grados más avanzados de su evolución, por lo que el tratamiento sintomático es el único recurso del que se dispone para atenuar el sufrimiento dado que el específico no es eficaz y por tanto no producirá beneficio sobre las lesiones ya instaladas, así entonces las arritmias, la fibrilación auricular y los bloqueos auriculoventriculares no responden a la estimulación farmacológica. La fibrosis miocárdica es otro fenómeno irreversible, no conociéndose aún el modo de atenuar su evolución.

Algunos pacientes sobre todo aquellos ubicados en el 1er. y 2do. período se les corrige por tiempos breves su insuficiencia cardíaca con cardiotónicos como Digoxina y/o Lanatocido, sin embargo, la insuficiencia cardíaca lleva al paciente a una serie de manifestaciones como edemas, hipotensión y ascitis, esto sin mencionar la angustia al ver que se hace demasiado esfuerzo para contrarrestar todos estas afecciones y sin embargo, los resultados son nulos, en todo este "proceso" no hay que pasar por alto además, todos los actos quirúrgicos a los cuales muchos pacientes son sometidos con la finalidad de ver menguados los efectos de esta enfermedad, con la aplicación de marcapasos.

Se entiende objetivamente que la condición socio-económica de la gran mayoría de los chagásicos también influye para no permitirles seguir un tratamiento continuo. Desafortunadamente algunas indicaciones terapéuticas se tornan inaccesibles, tales como el reposo, dieta adecuada y disminución de la actividad laboral.

1.8.3 Esofagopatía Chagásica.

También conocida como megaesófago chagásico o aperistalsis chagásica esofágica. Se reporta en individuos del sexo masculino, hecho aún sin explicación satisfactoria. El esófago presenta dilataciones en diferentes grados con hipertrofia y alteraciones en la mucosa (paraqueratosis).⁽⁸⁷⁾ Microscópicamente es característica la destrucción neuronal parasimpática, encontrándose áreas de inflamación crónica. Fisiopatológicamente en la

esofagitis chagásica hay pérdida progresiva de la motilidad y de la capacidad contráctil del órgano por la destrucción neuronal.⁽⁸⁸⁾ Clínicamente es asintomática en las fases iniciales, los síntomas sobrevienen por el aumento de la incoordinación motora y el inicio de la dilatación especialmente disfagia, dolor y regurgitación.

1.8.3.1 Esofagopatía Chagásica: Clasificación Evolutiva

La clasificación evolutiva predominante hasta la fecha ^(87, 89-92) es:

- Grupo 0:** Paciente asintomático, esófago normal al examen radiológico.
- Grupo I:** Disfagia ocasional o discreta, principalmente para alimentos sólidos. Esófago con diámetro dentro de valores normales con cierta incapacidad para vaciar el medio de contraste.
- Grupo II:** Disfagia constante. Regurgitación activa y odinofagia. Al examen radiológico, el esófago está aumentado de su diámetro con retención moderada del material de contraste, con zonas de espasmos segmentados e hipertonia de la porción inferior.
- Grupo III:** Disfagia menos intensa con regurgitación constante, incluso durante el sueño, ocasionando frecuentemente tos. A los Rx el esófago está hipotónico con acentuada retención del medio de contraste.
- Grupo IV:** Disfagia poco importante para el paciente (no la comenta). Regurgitaciones frecuentes (igual grupo III). A los Rx esófago atónico, con desdoblamiento de la cúpula diafragmática.

1.8.3.2 Esofagopatía Chagásica

Tratamiento

Básicamente se trata de procedimientos paliativos con el objeto de facilitar el vaciamiento esofágico y la disminución de los fenómenos del reflujo y esofagitis. No se conocen fármacos que beneficien la función motora del órgano. Ocasionalmente para los grupos I y II se intenta la dilatación del esfínter inferior mediante balones hiperbáricos. El tratamiento quirúrgico es sobre todo para el grupo III y IV, implicando las resecciones totales o segmentarias del esófago.

1.8.4 Colopatía Chagásica

Esta afección frecuentemente se encuentra en la enfermedad de Chagas crónica, le sigue en orden de importancia a la cardiopatía y a la esofagopatía. Su fisiopatología es semejante a la del megaesófago, es decir, existe por la denervación parasimpática intramural, una disfunción motora de los segmentos del colon. La lesión anatómicamente se encuentra en los segmentos más distales del intestino grueso especialmente sigmoides y recto.^(89, 89) El megacolon a diferencia del megaesófago se encuentra indistintamente en ambos sexos y por lo regular se manifiesta posterior a la cardio y esofagopatía chagásica. La expresión clínica básica del megacolon es la constipación, misma que es progresiva exigiendo esfuerzos, posiciones especiales, uso de enemas y laxantes. Al examen clínico se detecta abdomen prominente y asimétrico, con matidez a la percusión en las zonas de fecalomas y timpanismo en las zonas con meteorismo.^(93, 94)

La radiografía simple de abdomen permite visualizar los acúmulos gaseosos y las radiografías contrastadas facilitan mejor el diagnóstico, sin embargo estas últimas representan un riesgo de perforación en los casos de colon muy dilatado y de altas presiones del contraste. Es importante realizar diagnóstico diferencial con el megacolon congénito, neoplasias y diferentes causas de constipación,

dado que una de las principales complicaciones del megacolon chagásico es la torsión del mega lo que complica el cuadro por ser una urgencia quirúrgica.⁽⁸³⁾

El tratamiento es también paliativo, restringiendo de la dieta el exceso de fibras que pudieran facilitar la formación de fecalomas, otras veces se realiza intubación descompresiva mediante sonda de Nelaton con monitorización recto sigmoidoscópica, esta maniobra generalmente da buenos resultados, sin embargo, el procedimiento puede conllevar el riesgo de la perforación intestinal. El tratamiento quirúrgico consiste en practicar la rectosigmoidectomía.^(88,95, 96)

1.8.5 Otras Alteraciones de la Enfermedad de Chagas Crónica

Las bases fisiopatogénicas comentadas anteriormente en la fase crónica, pueden provocar alteraciones en diversos órganos, teniendo como punto inicial la acción directa del parásito, la denervación, la éstasis sanguínea y los fenómenos isquémicos y tromboembólicos, por lo que también es común encontrar alteraciones en:

1.8.5.1 Duodeno

Esta porción del tubo digestivo resulta afectado después del esófago y colon, además de dilatación (bulbar o total) el enfermo refiere fenómenos dispépsicos frecuentes. La radiografía apoya al diagnóstico y la cirugía en los casos muy avanzados, realizándose anastomosis duodeno yuyenal.^(88, 93)

1.8.5.2 Estómago

La gastropatía chagásica se observa con menor frecuencia que las alteraciones esofágicas o del colon y casi siempre su presencia esta asociada con estas dos alteraciones. Su evolución es lenta y solo en las fases avanzadas de enfermedad chagásica crónica se manifiesta dilatación o hipertrofia pilórica.^(89, 97)

1.8.5.3 Intestino delgado

Son raras las alteraciones descritas para yeyuno, ileon y apéndice. La peristalsis se encuentra alterada, pudiendo encontrarse disminuída o acelerada, todo ello

debido a los efectos de la denervación provocada por el parásito.

1.8.5.4 Hígado

Generalmente se afecta en forma secundaria en los casos de insuficiencia cardíaca congestiva. El hígado en la fase aguda es asiento de importantes procesos inflamatorios, mientras que en la fase crónica, se presentan alteraciones aisladas que no llegan a alterar la fisiología del órgano.

1.8.5.5 Vías biliares extrahepáticas

Se han detectado en necropsias casos esporádicos de megavesícula biliar y megacolédoco, generalmente asociados con dilataciones del colon y/o esófago.
(98)

1.8.5.6 Glándulas salivales

Las alteraciones secretorias básicamente se presentan a nivel de las glándulas salivales con hipersecreción ante estímulos comunes; en pacientes con megaesófago es característica una gran hipertrofia bilateral de las parótidas, que confiere al enfermo una apariencia bastante característica.

1.8.5.7 Sistema nervioso

La existencia de alteraciones en el sistema nervioso en la fase crónica es motivo de controversias, sobre todo en base a la claridad y seguridad de las descripciones originales de Chagas, lo que se contrapone con la escasez de informaciones posteriores en la literatura.

Cabe recordar que los fenómenos de denervación autonómica, constituyen un hecho principal e innegable en la enfermedad de Chagas crónica, especialmente la destrucción neuronal parasimpática intramural.

1.9 Tratamiento Específico de la Enfermedad de Chagas

Este tratamiento tiene por objeto suprimir la infección por *T. cruzi* a través de agentes capaces de destruir al parásito en el interior del huésped. A la fecha se han ensayado una serie considerable de drogas y esquemas terapéuticos, tanto en el laboratorio como en la clínica, estableciéndose así poco a poco un consenso sobre la metodología, los problemas y los principales medicamentos disponibles; antimaláricos, arsenicales y antagonistas purínicos muestran cierta capacidad para reducir la parasitemia, pero nunca al punto de erradicar la infección en el hombre.

1.9.1 Nifurtimox (Lampit)

Este derivado nitrofurámico, presenta una buena acción tripanomicida sobre las formas sanguíneas, evidenciándose también una acción sobre amastigotes intracelulares, pero este efecto es menos efectivo. Se observa supresión de la parasitemia durante la administración del compuesto, acompañada de anorexia, parestesias, polineuropatías periféricas y un efecto Antabus; éstas alteraciones desaparecen al dejar de administrar el medicamento, pero al suprimir este se exacerba la parasitemia. ^(79, 99, 100)

1.9.2 Benzonidazol [RO-7, 1051, NR Radanil].

Su acción también es evidente contra los tripomastigotes sanguíneos, solo que sus efectos colaterales son más marcados, refiriéndose cefalea, anorexia y reacciones urticariantes; estos efectos tienen una relación directa con el aumento de la dosis del medicamento. ^(79, 99, 100)

La fase experimental de los medicamentos ha sido tortuosa y de lo expuesto se puede concluir que por ahora no existe un medicamento capaz de ofrecer resultados realmente aplicables a la práctica médica. ^(79, 101-105)

1.10 Respuesta inmune en la infección por *Trypanosoma cruzi*

1.10.1 Respuesta inmune en la fase aguda.

Al momento de la infección por *T. cruzi*, el huésped mamífero presenta una respuesta inmune, la cual juega un importante papel en el control de los parásitos en el organismo.⁽¹⁰⁸⁾ Los diversos mecanismos inmunes que se presentan no son del todo eficientes ya que el parásito no logra ser erradicado estableciéndose entonces una relación huésped-parásito condicionada por las características de ambos, lo cual tiende a llevar la infección aguda a la cronicidad.⁽¹⁰⁷⁾ Durante la fase aguda de la infección se presentan dos eventos, primero existe activación de células B y T, posteriormente aparece una fase de inmunodepresión cuyo significado biológico no está bien dilucidado.⁽¹⁰⁸⁾

En los primeros días de la infección se elevan los linfocitos B y T, la activación policlonal ocurre con diferentes inóculos, pudiendo participar un componente mitogénico del parásito, esto se considera, ya que la inoculación experimental de parásitos muertos induce una activación semejante.⁽¹⁰⁹⁾

En esta activación temprana, las células T tanto de la fase proliferativa como de las ya diferenciadas y capaces de realizar funciones efectoras, se encuentran activadas y colaboradoras para la activación de células B.⁽¹¹⁰⁾ Como en esta etapa de la infección se observa un aumento en la producción de interleuquina-2 (IL-2) se cree que probablemente esta activación esté mediada por células T colaboradoras (Th).⁽¹¹¹⁾

Otro mecanismo observado relacionado con la actividad policlonal es el incremento de la actividad NK (Natural Killer) y del interferón sérico (IFN) detectado 24 horas posterior a la infección.^(112, 113)

En suma la activación de todos estos mecanismos protectores probablemente participe en la resistencia a la infección.

Se ha observado ocasionalmente en algunos pacientes un fenómeno de inmunodepresión, sobre todo en las etapas tardías de la fase aguda.⁽¹¹⁴⁾ Pudiéndose mencionar por ejemplo, que los anticuerpos contra los antígenos del parásito están abatidos.⁽¹¹⁵⁾ También están deprimidas las respuestas proliferativas *in vitro* a antígenos del parásito y mitógenos B y T así como las respuestas de hipersensibilidad retardada *in vivo* (DTH) contra antígenos del parásito, esta inmunodepresión ha sido atribuida a defectos en la función de las células T, a la actividad de células adherentes supresoras y a la presencia de células T supresoras que actúan regidas por la prostaglandina E2.^(116, 117, 118) La cinética de la inmunodepresión es semejante a la parasitemia, por lo que podría estar relacionada con la sobreestimulación antigénica y la activación policlonal previa. *T. cruzi* es capaz de alterar la proliferación de algunas subpoblaciones linfocitarias, además se ha observado que al administrar *in vivo* preparaciones antigénicas del parásito, se presenta en ocasiones inmunodepresión.⁽¹¹⁹⁾

De igual forma se han descrito factores solubles originados del huésped y del parásito involucrados tal vez en la inmunodepresión, entre estos se menciona a un compuesto protéico producido por los esplenocitos en la fase aguda experimental, esta proteína de 15 Kda es capaz de suprimir respuestas proliferativas a mitógenos *in vitro*⁽¹²⁰⁾; los esplenocitos murinos en la fase aguda de la infección no proliferan ni producen IL2 ante la estimulación con concanavalina A (Con A) aún en presencia de interleuquina 1 (IL-1) ó IL-2 exógenas.⁽¹²¹⁾ Sin embargo, la estimulación con ionóforo de calcio que es un activador de la calmodulina induce la producción de IL-2⁽¹¹⁸⁾ lo que indica que la falta de producción de IL-2 no es debida a incapacidad celular, sino a alteraciones en la transducción de la señal del mitógeno al unirse a su receptor. La expresión de los receptores para IL-2 de baja o alta afinidad, responsables de la transducción de la señal disminuye en los esplenocitos de los animales infectados y en células de sangre periférica humana infectadas *in vitro* con *T. cruzi*, esto explicaría la incapacidad para responder a Con A, aún en presencia de IL-2.⁽¹²²⁾ La regulación de la inmunodepresión varía dependiendo las

características genéticas del huésped,⁽¹²³⁾ por lo que es posible que sean diversos los mecanismos que interactúan en la infección experimental por *T. cruzi*, y por ende la deficiente respuesta del huésped infectado a los antígenos del parásito reduce su defensa ante la infección. Cabe resaltar, que los enfermos chagásicos no presentan infecciones concomitantes que estuvieran relacionadas con la inmunodepresión observada, ni sintomatología característica de una enfermedad autoinmune sistémica, posible consecuencia de la activación policlonal de células B o T anteriormente mencionadas.

1.10.2 Respuesta Inmune en la Infección Crónica

La existencia de los anticuerpos específicos circulantes en la enfermedad de Chagas se conoce desde ya hace mucho tiempo, cuando se encontraron anticuerpos fijadores de complemento,⁽¹²⁴⁾ ahora su detección es un criterio diagnóstico de infección por *T. cruzi*. Los anticuerpos específicos en los sujetos infectados no tratados, se conservan de por vida, a pesar de ello no se conocen fluctuaciones significativas en sus títulos a lo largo de su infección crónica. Al igual que en toda infección, la primera inmunoglobulina específica detectada es la IgM, que en humanos aparece de 7 a 30 días después de la infección, entre los 10 y 40 días se detecta la IgG específica.⁽¹²⁵⁾

En la infección crónica se restablece la reactividad inmune del huésped en forma parcial o total, dependiendo del parámetro inmunológico, cepa del parásito, la especie y cepa del huésped estudiado. Durante la infección crónica la respuesta inmune humoral contra antígenos no relacionados al parásito se encuentra parcialmente inhibida.⁽¹²⁶⁾ El trabajar con diversas cepas de ratones ha permitido relacionar el nivel de la depresión con la sensibilidad a la infección y observar que la presencia de la infección e intensidad dependen de la vía de inoculación del antígeno heterólogo y de la cepa del parásito infectante.⁽¹²⁷⁾ Sin embargo, esta depresión se modifica revertiéndose con la administración de IL2 al cultivo de células de bazo de ratón.^(128, 129)

Continuamente se realiza la detección de la respuesta inmune celular en animales de experimentación crónicamente infectados o inmunizados con fracciones subcelulares del parásito, por lo que se ha observado la respuesta proliferativa y la hipersensibilidad retardada (DTH) específica,⁽¹³⁰⁾ así como la capacidad de diferentes antígenos del parásito para inducir respuestas de DTH en presencia de adyuvantes.^(130, 131)

Los linfocitos periféricos de los individuos crónicamente infectados proliferan en respuesta a la estimulación con diferentes preparaciones antigénicas⁽¹³²⁾ o con parásitos inactivados,^(133, 134) también se observa que se encuentra incluida la migración leucocitaria ante fracciones del parásito⁽¹³⁵⁾ y producen IL-2 en respuesta a Con A.⁽¹³⁶⁾

Tanto en humanos como en animales de experimentación crónicamente infectados, se ha encontrado que las células linfoides son capaces de producir factores que activan a los macrófagos a fin de provocar la destrucción intracelular del parásito.⁽¹³⁷⁾ La mayoría de los pacientes presentan reactividad celular frente a los antígenos del parásito, por lo que se considera que un 70 u 80% de los enfermos chagásicos crónicos presentan hipersensibilidad retardada frente a diferentes antígenos del parásito.⁽¹³⁸⁾

1.10.3 Respuesta inmune asociada a la resistencia

1.10.3.1 Células fagocíticas

T. cruzi tiene la capacidad dentro del macrófago de escapar de la vacuola fagocítica al citoplasma sitio donde se multiplica, a su vez los macrófagos ante las linfoquinas producidas por linfocitos T adquieren capacidad tripanocida. La opsonización de los parásitos por anticuerpos facilita su entrada a los macrófagos, indicando la existencia de un efecto sinérgico de los anticuerpos con los factores activadores de macrófagos para la destrucción de los parásitos.⁽¹³⁹⁾

La correlación que existe entre la capacidad de las células esplénicas para generar factores estimulantes de macrófagos ante antígenos del parásito y la resistencia de los ratones a la infección experimental, sugiere que el sistema "célula T-linfoquinas-macrófagos" juega un papel muy importante para la resistencia a la infección.⁽¹⁴⁰⁾ El principal activador de fagocitos es el interferón (IFN) mismo, que aumenta la capacidad citotóxica de los macrófagos y neutrófilos contra bacterias y parásitos.⁽¹⁴¹⁾ *In vitro* el IFN incrementa la producción de peróxido de hidrógeno⁽¹⁴²⁾ incrementando así la capacidad tripanocida de los macrófagos.⁽¹⁴³⁾ Se conoce también que el IFN inhibe el crecimiento de diferentes parásitos intracelulares en células no fagocíticas⁽¹⁴⁴⁾ y se cree que ejerce un efecto tripanostático en células cardíacas murinas.⁽¹⁴⁵⁾ Se ha observado también que al administrar IFN durante la fase aguda de la infección experimental con *T. cruzi* se incrementa la resistencia y se revierte parcialmente la inmunodepresión,⁽¹⁴⁶⁾ mientras que la administración de anticuerpos anti-INF incrementa la parasitemia.⁽¹⁴⁷⁾

Existen otras citoquinas capaces de activar *in vitro* la actividad tripanocida de los macrófagos y granulocitos (factor necrosante de tumores y factor estimulante de formación de granulocitos y macrófagos),⁽¹⁴⁸⁾ sin embargo su actividad es menor que la del INF.

1.10.3.2 Anticuerpos

Los anticuerpos tienen una acción central en la protección del huésped durante la infección aguda por *T. cruzi*, lo anterior quedó demostrado con la alta sensibilidad a la infección de ratones con baja capacidad humoral y al infectar ratas genéticamente deficientes en linfocitos B.^(149, 150) De igual forma se conoce la participación de mecanismos independientes a los anticuerpos⁽¹⁵¹⁾ que actúan en la protección, confirmando la posibilidad de conferir protección mediante transferencia pasiva de anticuerpos de animales infectados o sensibilizados con antígenos del parásito⁽¹⁵²⁾ quedando esta transferencia limitada a la cepa de parásitos utilizada.⁽¹⁵³⁾

Los sueros de los animales infectados con algunas cepas del parásito, disminuyen la infectividad de los tripomastigotes de *T. cruzi*, efecto que no depende de la capacidad aglutinante o lítica del suero⁽¹⁵⁴⁾ sino a anticuerpos mediadores de lisis por complemento (Acs-CoML) de la forma de tripomastigote de los parásitos⁽¹⁵⁵⁾ y capaces de mediar reacciones de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)⁽¹⁵⁶⁾ lo que influye en la resistencia a la infección.⁽¹⁵⁷⁾ Estos Acs-CoML se han reportado en pacientes chagásicos y ante la eliminación de la infección mediante drogas tripanocidas, desaparecen estos Acs-CoML⁽¹⁵⁵⁾ probablemente debido a la disminución de los títulos de anticuerpos totales. Sin embargo la lisis de los tripomastigotes con complemento no parece ser un mecanismo efectivo para destruir al parásito durante la fase aguda de la infección, ya que se ha observado que los animales deficientes en complemento presentan elevada parasitemia y mortandad, semejante a los animales con complemento normal,⁽¹⁵⁸⁾ por otro lado, a pesar de que IgG e IgM anti-*T. cruzi* activan la vía alterna de la cascada del complemento,⁽¹⁵⁹⁾ los fragmentos Fab de los mismos, no son capaces de aumentar la potencialidad *in vivo* de *T. cruzi*.⁽¹⁶⁰⁾

De lo comentado anteriormente se deduce que de tener algún papel biológico en la infección los Acs-CoML, participarían en el control de la parasitemia durante la fase crónica.

Los anticuerpos también podrían participar en las reacciones de ADCC que son realizadas por células fagocíticas con receptores para macrófagos, eosinófilos y neutrófilos,⁽¹⁶¹⁾ esta acción requiere de la presencia de pocos anticuerpos y es rápida y efectiva, destruyendo al *T. cruzi* en presencia de anticuerpos específicos⁽¹⁶²⁾; los anticuerpos ADCC se han localizado en pacientes chagásicos estudiados⁽¹⁵⁶⁾ siendo sus valores séricos mayores y de aparición más temprana en ratones resistentes a la infección que en ratones sensibles⁽¹⁶³⁾ lo que sugiere que los mecanismos de ADCC podrían estar involucrados en la protección.

1.10.3.3 Inmunidad Celular

La importancia de las células T en la protección a *T. cruzi* en la fase aguda, se pone de manifiesto por la mayor susceptibilidad a la infección de los animales genéticamente atímicos⁽¹⁶⁴⁾ o timectomizados,⁽¹⁶⁵⁾ igual aumento de la sensibilidad a la infección se logra con la administración de medicamentos supresores de células T como la cortisona o la ciclosporina.⁽¹⁶⁶⁾ El papel de las células T en la fase crónica de la infección, no está aún bien dilucidado. En forma experimental la infección crónica se exacerba ante el tratamiento con los medicamentos arriba mencionados⁽¹⁶⁷⁾ y en pacientes chagásicos el medicamento inmunodepresor produjo reactivación con encefalitis aguda y severo compromiso infeccioso.⁽¹⁶⁸⁾ Sin embargo, este fenómeno no siempre se presenta, dado que existen otros pacientes en donde no se alteró el curso de la infección ni mostraron signos histológicos de reactivación.⁽¹⁶⁹⁾ Estas respuestas aparentemente discordantes, no tienen una interpretación sencilla, dado que no se conocen todos los efectos que estos tratamientos tienen sobre la respuesta inmune.

Durante la infección aguda existen niveles elevados de parasitemia así como parásitos extracelulares por la liberación o ruptura de la célula huésped y por consiguiente se liberan al medio antígenos del parásito que pueden incorporarse o no a las membranas de las células parasitadas.⁽¹⁷⁰⁾ Estas células expresando antígenos de *T. cruzi* son el blanco de los linfocitos T CD8 (CTL) y/o de ADCC los primeros son capaces de destruir células alogénicas o singénicas parasitadas o cubiertas con antígenos del parásito, los segundos actúan contra células singénicas cubiertas con antígenos de *T. cruzi* pero no contra células parasitadas.⁽¹⁷¹⁾

La participación de NK en la protección frente al parásito, fue demostrada por la mayor resistencia a la infección de ratones con NK aumentada a través de la acción con IFN.⁽¹⁷²⁾ Las células NK están probablemente involucradas en el control de la infección, debido a su capacidad lítica y/o a su capacidad de

síntesis de IFN que regula la actividad tripanocida de las células fagocíticas.

La inmunidad celular tiene un papel central en la protección del huésped infectado por *T. cruzi*, sin embargo, aún no es posible dilucidar la importancia que tienen las distintas subpoblaciones celulares así como tampoco la reactividad contra células que tienen los antígenos del parásito, todo ello demuestra la gran complejidad de los mecanismos celulares y las dificultades prácticas para el diseño de experimentos que los aclaren.

1.10.4 Respuesta inmune asociada a la agresión tisular

En esta fase de la infección se pueden mencionar a mecanismos agrupados en tres categorías: mimetismo molecular, cambios en antígenos endógenos y perturbaciones de la respuesta inmune del huésped.⁽¹⁷³⁾ Los determinantes antigénicos comunes al parásito y a las células del huésped (mimetismo molecular) pueden generar una respuesta autoinmune. *T. cruzi* comparte determinantes antigénicas con la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico muscular⁽¹⁷⁴⁾ y con las neuronas de mamíferos.⁽¹⁷⁵⁾ Adicionalmente podría generarse una reacción autoinmune por acción de anticuerpos anti-idiotipo dirigidos contra anticuerpos que reconocen aquella porción del parásito que forma parte del sistema de unión con las células huésped, dado que el idiotipo del primer anticuerpo tendría la arquitectura del receptor de la célula huésped.

La infección puede promover la presentación de antígenos propios como nuevos, lo que provoca que la inserción de antígenos del parásito en la membrana de las células del huésped se transformen en estructuras propias a inmunogénicas y/o en blanco de mecanismos citotóxicos.

Muchos pacientes chagásicos crónicos presentan anticuerpos dirigidos contra fibras de músculo cardíaco⁽¹⁷⁶⁾ y contra la miosina,⁽¹⁷⁷⁾ esta autoreactividad podría ser subsecuente al daño tisular, ya que no se ha demostrado reacción cruzada entre antígenos cardíacos y del parásito⁽¹⁷⁸⁾.

Como se ha observado, la infección parasitaria perturba en forma generalizada al sistema inmune modificando componentes y reguladores de la respuesta, generando con ello un desencadenamiento de mecanismos autoagresivos. De hecho los linfocitos periféricos CD-4 de enfermos chagásicos sintomáticos o asintomáticos al interactuar *in vitro* con tejido cardíaco liberan factores solubles que afectan la contractilidad cardíaca.⁽¹⁷⁸⁾

Uno de los apoyos más fuertes del origen inmunológico de la patología chagásica crónica es la factibilidad de inducir daño tisular semejante al que produce la infección crónica con *T. cruzi* mediante la inoculación de componentes del parásito en animales no infectados,⁽¹⁸⁰⁾ otro ejemplo para apoyar este efecto, es el uso de la fracción microsomal de epimastigotes (Mc) para estimular *in vitro* la proliferación de linfocitos en pacientes chagásicos crónicos con mayor especificidad que otros antígenos del parásito,⁽¹³²⁾ además los pacientes con cardiomiopatía chagásica tienen títulos muy elevados de anticuerpos anti-MC que los pacientes sin compromiso cardíaco.⁽¹⁸¹⁾ Este fenómeno que no se encuentra al estudiar la respuesta linfoproliferativa frente a Mc⁽¹⁸²⁾ se debe al efecto acumulado de presentar anticuerpos que reconocen mayor número de componentes parasitarios y a anticuerpos dirigidos contra proteínas de MC.⁽¹⁸³⁾

1.11 Profilaxis

En la práctica, la prevención de la infección chagásica humana se realiza a tres niveles:

- Lucha contra el vector
- Control en la transmisión transfusional
- Elaboración de vacunas.

1.11.1 Lucha contra el vector

Esta acción se puede enfocar desde dos puntos de vista, el ofensivo (lucha contra el vector utilizando insecticidas) y el defensivo, donde las acciones de

este último van encaminadas a la mejora de la vivienda. Los insecticidas más utilizados son los de contacto y largo poder residual como el HCH (30% de isómerogama, polvo soluble en líquido), órgano fosforados (Rhodiatox) y el Dieldrim (clorado como el HCH)^(184, 185) El uso de insecticidas naturalmente ofrece algunos riesgos de intoxicación para el hombre y resistencia inducida en los triatomíneos así como la contaminación ambiental, sin embargo, es un procedimiento accesible y satisfactorio a corto y mediano plazo en zonas endémicas y pobres como las que existen en Latinoamérica.

El mejoramiento de la vivienda es una medida fundamental, que consiste, sino en el cambio de residencia, si modificación del material precario con que esté construida.

1.11.2 Control en la transmisión transfusional

Como es conocido, *T. cruzi* se transmite de hombre a hombre vía transfusional, esta acción reviste vital importancia en las zonas endémicas, involucrando particularmente a los centros donde se efectúan transfusiones sanguíneas, al personal médico y paramédico, etc. sin embargo, este rubro que parecería ser sencillo, se torna cada día más complejo debido a ciertas "circunstancias": emergencias médicas, falta del conocimiento del problema, mercantilismo, etc. ⁽¹⁸⁶⁻¹⁸⁸⁾

1.11.3 Elaboración de vacunas

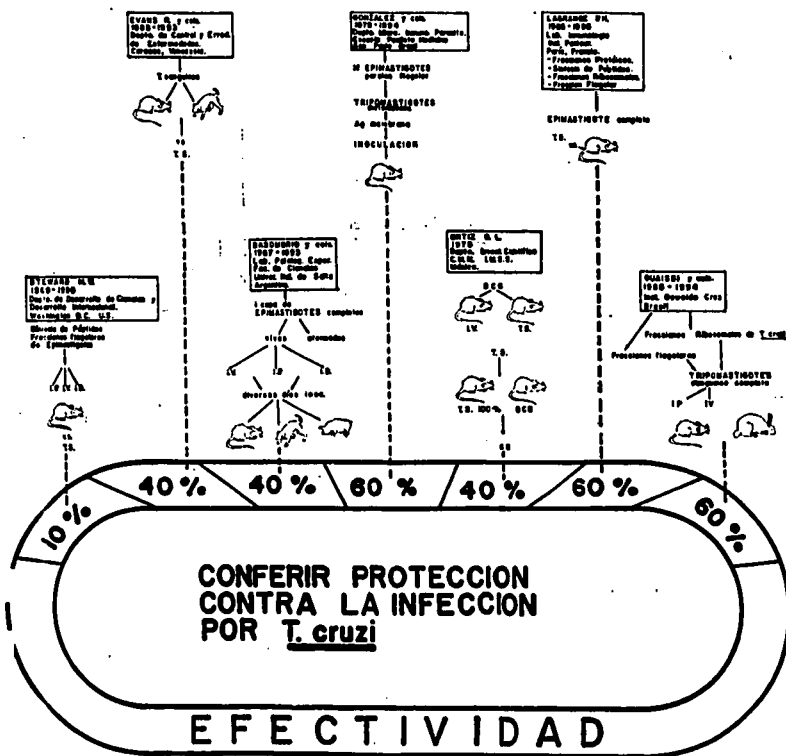
Al referirnos anteriormente en el capítulo de la respuesta inmune en la infección con *T. cruzi*, pudimos contemplar aunque no profundamente (por no ser el objetivo específico de este trabajo) que la infección por este protozoo produce serias alteraciones del sistema inmune del huésped, cuyas consecuencias en la enfermedad de Chagas no son aún del todo bien dilucidadas. Sin embargo, como otra medida más para tratar de atacar el problema producido por esta enfermedad, diversos grupos de investigación de diferentes partes del mundo realizan acciones tendientes a investigar diversos mecanismos de protección

contra este agente, uno de los principales pioneros en esta investigación fué Culbertson⁽¹⁸⁹⁾ quien tomó el campo de la inmunología como un elemento más para tratar de combatir este padecimiento; desde ese momento a la fecha se han continuado utilizando diversos inmunógenos y vacunas con la finalidad de conferir protección contra infecciones experimentales por *T. cruzi* en animales de laboratorio. (Fig. 18) Así por ejemplo en México, el grupo de Librado y cols.⁽¹⁹⁰⁾, buscaron conferir protección a animales mediante el uso del bacilo de Calmette-Guerin (BCG), este fué aplicado a ratones vía intraperitoneal para posteriormente retarlos con tripomastigotes sanguíneos, con esta acción este grupo reportó un 40% de sobrevida en sus ratones infectados; en San Paulo Brasil desde 1978 a la fecha González y cols., han buscado conferir protección mediante la porción flagelar de una cepa de epimastigotes así como con la utilización de antígenos de membrana de tripomastigotes metacíclicos,⁽¹⁹¹⁾ este grupo es de los pocos que han obtenido 60% de sobrevida en los ratones estudiados; aproximadamente a partir de 1985 aparecen reportes de dos grupos de investigación. Evans y cols. de Caracas, Venezuela y Lagrange y cols. del Instituto Pasteur de Francia, el primer grupo ha estado trabajando principalmente con inmunógeno del parásito completo, una variante aquí es la utilización de caninos además de murinos a quienes se les retó con tripomastigotes sanguíneos, reportando un 40% de efectividad hasta este momento; en cambio el segundo grupo ha trabajado con fracciones protéicas, síntesis de péptidos, fracciones ribosomales y fracciones flagelares, sin embargo, con la utilización de inmunógenos realizados con epimastigotes completos reportan 60% de protección en los ratones manejados⁽¹⁹²⁾; en Argentina el grupo de Basombrio y cols. del laboratorio de Patología experimental de la Universidad de Sofía, también ha trabajado con epimastigotes completos, en sus diversos reportes se observa que sus inmunógenos han sido con parásitos vivos y atenuados, lo novedoso quizá de este grupo de investigación es la utilización de diversas vías de inoculación de su inmunógeno, dado que desde 1987 a la fecha en que han aparecido sus reportes, refieren la vía intravenosa, intraperitoneal y la intradérmica, así como

FIG. 18

TRIPANOSOMIASIS AMERICANA ELABORACION DE VACUNAS

CULTBERTSON J. T. 1938. "ACQUIRED IMMUNITY IN RATS AGAINST *T. cruzi*"
en JOURNAL OF PARASITOLOGY 24. p.p. 83-90.



FALLA DE ORIGEN

diferentes esquemas en cuanto a días de aplicación y diferentes grupos de animales utilizados, ya sea murinos, caninos y porcinos, independientemente de la vía de inoculación y/o de los animales utilizados, reportan un 40% de efectividad en la protección contra la infección por *T. cruzi*⁽¹⁹³⁾; Steward en Washington a estudiado también estas acciones con ratones utilizando principalmente síntesis de péptidos y fracciones flagelares de epimastigotes, este grupo utiliza también las vías intraperitoneal, intravenosa e intradérmica en sus modelos experimentales y al retarlos con tripomastigotes sanguíneos han obtenido el 10% de efectividad⁽¹⁹⁴⁾; finalmente otro grupo de investigación que también se ha destacado por trabajar esta línea, ha sido el de Ovassi y cols. del Instituto Oswaldo Cruz en Brasil, dicho grupo trabaja con fracciones ribosomales y fracciones flagelares de *T. cruzi*, ellos han utilizado para la aplicación de sus inmunógenos las vías intraperitoneal e intravenosa, los animales inmunizados han sido ratones y conejos y también a la fecha han reportado el 60% de efectividad en su protección contra la infección por *T. cruzi*.⁽¹⁹⁵⁾ Hasta ahora ninguno de los ensayos experimentales ha brindado una protección aceptable cuando los animales de experimentación fueron inmunizados y posteriormente desafiados con cepas de *T. cruzi* virulentas. Se observa además que la mayoría de los trabajos de investigación reportados, sólo refieren la sobrevivencia de los animales infectados como parámetro de efectividad de sus inmunógenos utilizados, pocos realizan la determinación cuantitativa de los parásitos en sangre (tripomastigotes sanguíneos) y casi nadie ha tomado además de estos parámetros la disminución de parásitos (nidos de amastigotes) en los tejidos para ver la efectividad del inmunógeno.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la trascendencia que tiene la Enfermedad de Chagas en el Continente Americano y en particular en países de América Latina como Brasil, Argentina, Chile y México, en los que constituye un importante problema de salud pública por su elevada morbi-mortalidad, ^(4, 20, 196-199) aunada a la presencia de *T. cruzi* en transmisores triatomínicos y reservorios vertebrados^{13, 17, 23, 27)} que se encuentran invadiendo dos terceras partes de la República Mexicana^(14, 23, 78) y poniendo en riesgo de adquirir la infección a muchos millones de mexicanos y el hecho de que los tratamientos quimioterápicos solo tienen acción sobre las formas de tripomastigotes sanguíneos, lo cual redundaría en que la gente que adquiere la enfermedad, una vez que desarrolla nidos de amastigotes en sus tejidos, hasta el momento, están condenados a no poder curarse y sufrir la enfermedad con las consecuencias inherentes a la misma. Por lo cual, consideramos que obtener protección a la infección por *T. cruzi* mediante la preparación e inoculación de un inmunógeno eficaz, resultaría ser una medida profiláctica, que de funcionar, evitaría que los diversos hospederos, incluyendo al ser humano, adquieran la enfermedad de Chagas.

3. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fué obtener un inmunógeno capaz de producir protección en ratones CD-1, al ser retados con una cepa virulenta de *Trypanosoma cruzi*.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la realización de este estudio, se tomaron en cuenta las siguientes acciones:

4.1 Preparación de Medios de Cultivo de Novy, Mc Neal y Nicolle (NNN).^(200, 201)

Material:

Reactivos

- Agar nutritivo
- Cloruro de sodio
- Cloruro de potasio
- Cloruro de calcio
- Bicarbonato de sodio

Solución

Agua destilada

Vidriería

- Matraz Erlenmeyer 250 ml y 1000 ml.
- Probeta 1000 ml.

Productos biológicos

- Sangre de borrego desfibrinada
- Sangre humana

Material de laboratorio

- Mechero Bunsen
- Estufa
- Autoclave

Método

En 900 ml. de agua destilada fría se disolvieron 14 gramos de agar nutritivo y 6 gramos de cloruro de sodio, posteriormente se calentó, llevándose a ebullición.

Una vez realizada perfectamente la mezcla de Agar, la solución se esterilizó a 120°C durante 20 minutos. Se dejó enfriar aproximadamente a 50°C y se añadió 100 ml. de sangre en forma lenta y progresiva para que la solución quedara bien homogeneizada. Finalmente se repartió en matraces estériles a fin de que en el interior de ellos el medio solidificara. Para preparar la solución Ringer, se realizó el siguiente procedimiento: en 1000 mililitros (ml) de agua destilada fueron disueltos 8 gramos de cloruro de sodio, .2 gramos de cloruro de potasio, .2 gramos de cloruro de calcio y .2 gramos de bicarbonato de sodio; una vez preparado el Ringer, se añadió al medio solidificado a una proporción doble de la fase sólida. Este medio mixto de NNN, fue incubado a 37°C durante 48 hrs. como prueba de esterilidad.

4.2 Selección de diversas cepas de *Trypanosoma cruzi*

Desde hace más de 30 años, el laboratorio de Parasitología del Depto. de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina a cargo del Dr. Jorge Tay Zavala, ha trabajado en la línea de investigación de la Enfermedad de Chagas, dentro de este rubro se han aislado diversas cepas de *T. cruzi* a partir de casos humanos, heces de triatóminos infectados recolectados intradomiciliariamente y de reservorios, dichas cepas son mantenidas en animales de experimentación y en cultivos de NNN, mediante pases sucesivos cada 30 días como promedio.

De las diversas cepas se seleccionaron aquellas que han presentado un buen desarrollo en medios de cultivo.

| CEPA | ORIGEN |
|------------|--------------------------------------|
| JUANITA | <i>TRIATOMA DIMIDIATA</i> (VERACRUZ) |
| QUERETARO | <i>T. BARBERI</i> (QUERETARO) |
| DE LA CRUZ | PACIENTE (OAXACA) |
| CHIAPAS | <i>T. PALLIDEPENIS</i> (CHIAPAS) |
| COCULA | <i>T. PALLIDEPENIS</i> (JALISCO) |

4.3 Mantenimiento y estandarización de cepas de *T. cruzi* en medios NNN.

Material

Vidriería

- Tubos de tapón de rosca 15 x 150 mm.
- Matraz Erlenmeyer graduados: 125, 200, 500, 1000, 2000 y 4000 ml.
- Micropipetas cuenta glóbulos blancos.

Material de laboratorio

- Microscopio óptico.
- Cámaras Neubauer.
- Gradillas.
- Torundas con alcohol.
- Mechero Bunsen.
- Campana de flujo laminar.

Productos biológicos

- Medio de cultivo NNN.

Método

De las cepas regularmente mantenidas en el laboratorio de Parasitología, se seleccionaron 5 de ellas a fin de que fueran mantenidas en medios de cultivo NNN a 26°C a fin de obtener abundante crecimiento y desarrollo de epimastigotes, por lo que cada 15 a 20 días, bajo condiciones estrictas de esterilidad, se realizaba conteo de parásitos mediante cámara de Neubauer, micropipetas cuenta glóbulos blancos y campo microscópico con objetivo 10X y ocular 10X.

El crecimiento y desarrollo de epimastigotes de cada una de las cepas seleccionadas se inició en tubo de rosca conteniendo 10 mililitros de cultivo NNN, a medida que se

notaba incremento, desarrollo y estandarización de los parásitos, se fue aumentando gradualmente el volumen de los medios de cultivo, hasta 4000 ml.

4.4. Preparación de inmunógeno de *T. cruzi*.

Material

Reactivos

- Formol 2%

Solución

Solución salina isotónica.

Vidriería

Matraz Erlenmeyer 4000 ml.

Pipetas Pasteur con bulbo

Frascos ampula de 5 ml.

Productos biológicos

- Cultivo NNN

Material de laboratorio

- Cámara de Neubauer.
- Engargolador para frasco ampula.
- Campana de flujo laminar.
- Mechero Bunsen.
- Microscopio compuesto.
- Torundas con alcohol.
- Ultracentrífuga.
- Tubos cónicos 5 ml. para centrifuga.
- Autoclave.
- Refrigerador 4°C.

Una vez obtenido abundante crecimiento de rosetas de epimastigotes de *T. cruzi* en los medios de cultivo (10 a 20 rosetas por campo microscópico con objetivos de 10X y ocular 10X) se mezclaron perfectamente las cinco cepas para ultracentrifugarlas a 15000 unidades g por minuto durante 15 minutos (min). El sobrenadante se descartó y al sedimento obtenido se le añadió formol al 2% con la finalidad de matar a los parásitos, una vez resuspendidos en esta solución durante 5 minutos, a los parásitos se les añadió solución salina isotónica estéril y se centrifugaron a 15 000 unidades g por 15 min., posteriormente se retiró el sobrenadante y se repitió en dos ocasiones sucesivas este lavado, finalmente el paquete de parásitos fué suspendido en solución salina isotónica estéril y mediante cámara de Neubauer se ajustó a una concentración de 1000 000 de parásitos por .1 ml. de suspensión. El inmunógeno así preparado, fue repartido en alícuotas de 1 ml. y puesto en frascos ampula estériles, mismos que fueron sellados mediante engargolado y conservados a 4°C para su posterior utilización.

4.5 Determinación de la DL₁₀₀ de las cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Material:

Reactivos

- Cloroformo 100%
- Albúmina de Meyer
- Tinción Hematoxilina-Eosina

Soluciones

- Formol 10%
- Agua destilada
- Alcohol 40%
- " 50%
- " 60%
- " 70%
- " 80%
- " 90%
- " 100%

Vidriería

- Pipetas Pasteur con bulbo
- Portaobjetos 25 x 75 mm.
- Cubreobjetos 22 x 22 mm.
- Frasco de vidrio de boca ancha 500 ml.

Productos biológicos

- Ratones cepa CD1 hembras de 20 grs. de peso.
- Tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepas: Juanita-Querétaro-De la Cruz-Chiapas y Cocula.

Material de laboratorio

- Cámara Neubauer
- Microscopio compuesto
- Torundas con alcohol
- Tijeras
- Pinzas disección
- Guantes cirujano
- Jeringas de 1 ml
- Micropipetas cuenta glóbulos blancos
- Refrigerador
- Parafina 56-60°C
- Microtomo de 4 μ
- Cuchillas Jung.

Método

Se integraron cinco lotes de ratones, constituido de 20 animales cada lote, mismos que fueron numerados del I al V, con la finalidad de observar el comportamiento de cada una de las cepas seleccionadas.

| LOTE | CEPA |
|-------------|-------------------|
| I | JUANITA |
| II | QUERETARO |
| III | DE LA CRUZ |
| IV | CHIAPAS |
| V | COCULA |

A cada uno de los ratones de cada una de las cepas, se les inoculó 1000 000 de tripomastigotes sanguíneos vía intraperitoneal (IP) de cada cepa correspondiente. Cada tercer día mediante sangre obtenida del extremo distal de la cola, cámara de Neubauer, micropipeta cuenta glóbulos blancos y campo microscópico objetivo 10X, ocular 10X, se observó el curso de la parasitemia de los 100 ratones infectados experimentalmente. (Tabla 2)

TABLA 2
COMPORTAMIENTO DE LOS ANIMALES POST-INOCULADOS CON
TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS DE *T. cruzi*.

| DIA | LOTE I CEPA JUANITA | LOTE II CEPA QUERETARO | LOTE III CEPA DE LA CRUZ | LOTE IV CEPA CHIAPAS | LOTE V CEPA COCULA |
|-----|-------------------------------|--|-----------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 3 | 0 | 200 000 | 0 | 200 000 | 0 |
| 5 | 0 | 400 000 | 0 | 200 000 | 0 |
| 8 | 0 | 800 000 | 200 000 | 400 000 | 200 000 |
| 12 | 200 000 | 1 800 000 * (12) | 400 000 | 600 000 | 400 000 |
| 15 | 600 000 | 2 600 000 * (10) ** (4) *** (8) | 600 000 | 800 000 | 800 000 |
| 18 | 800 000 | 4 000 000 * (7) ** (8) *** (11) | 1 200 000 | 1 200 000 | 1 400 000 |
| 21 | 1 200 000 | 4 600 000 * (2) ** (9) *** (13) | 1 600 000 | 1 400 000 | 1 800 000 |
| 24 | 2 000 000 * (8) | 8 200 000 ** (3) *** (17) | 1 800 000 * (2) | 1 000 000 | 2 000 000 * (2) |
| 27 | 2 200 000 * (8) ** (11) | 12 000 000 *** (20) | 2 000 000 * (2) ** (11) | 2 000 000 | 2 400 000 * (1) ** (3) |
| 30 | 2 600 000 * (2) ** (3) | ** | 2 400 000 * (1) *** (1) | 2 600 000 | 2 800 000 *** (3) |
| 33 | 2 800 000 | ** | 4 000 000 *** (2) | 2 000 000 | 4 400 000 *** (5) |
| 36 | 1 800 000 | ** | 8 400 000 *** (2) | 2 000 000 | 8 200 000 *** (8) |
| 39 | 1 200 000 | ** | 6 000 000 | 1 400 000 | 8 200 000 |
| 42 | 600 000 | ** | 2 400 000 | 800 000 | 6 400 000 *** (3) |
| 45 | 0 | ** | 2 000 000 | 200 000 | 4 000 000 |
| 48 | 0 | ** | 1 250 000 | 0 | 2 400 000 |
| 51 | 0 | ** | 400 000 | 0 | 1 600 000 |
| 54 | 0 | ** | 0 | 0 | 800 000 |
| 57 | 0 | ** | 0 | 0 | 200 000 |
| 60 | 0 | ** | 0 | 0 | 0 |

Cifras por ml. de sangre

- * Diarrea
- ** Parálisis trasera
- *** Defunción

A todos los ratones de cada una de las cepas se les realizó postmortem improntas, cortes histológicos y tinciones para búsqueda de nidos de amastigotes en cerebro, hígado, riñón, bazo y corazón. En los ratones de los lotes I y IV no se localizaron parásitos intracelulares (Tabla 3).

TABLA 3
PRESENCIA DE NIDOS DE AMASTIGOTES PROMEDIO, EN DIVERSOS
TEJIDOS DE ANIMALES INFECTADOS CON *T. cruzi*.

| | LOTE | | |
|---------|-------------------------|---------------------------|---------------------|
| | II Cepa Querétaro | III Cepa De la Cruz | V Cepa Cocula |
| CEREBRO | 2 | 0 | 0 |
| HIGADO | 1 | 0 | 0 |
| RIÑÓN | 0 | 0 | 0 |
| BAZO | 0 | 0 | 0 |
| CORAZON | 12 | 4 | 6 |

De las cinco cepas utilizadas, Querétaro fue la que inicialmente reportó parásitos en sangre circulante, produjo tempranamente trastornos digestivos, parálisis trasera, picos elevados de parasitemias, muerte del 100% de los animales y mayor número de amastigotes en sus tejidos (Tabla 2 y 3).

Por lo antes señalado, dicha cepa fué seleccionada para ser utilizada en el reto de los distintos lotes de ratones experimentados en el presente trabajo.

4.6 Inmunización de animales de experimentación, y

4.7 Reto con tripomastigotes sanguíneos de una cepa virulenta

Material

Soluciones

- Solución salina isotónica estéril

Vidriería

- Pipetas Pasteur con bulbo
- Micropipetas cuenta glóbulos blancos
- Cajas de Petri

Productos biológicos

- Ratones hembras CD-1, 20 gramos de peso.
- Ratones infectados con tripomastigotes sanguíneos, cepa Querétaro.
- Vacuna B.C.G. liofilizada preparada por el Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salubridad y Asistencia. Cepa 1331, procedente del Instituto Serológico de Copenhage Dinamarca, envasada en ampollitas de 50 dosis con 500 000 unidades viables de bacilos bovinos atenuados por dosis de 0.1 ml.
- Inmunógeno preparado de multicepas de *T. cruzi*.
- Epimastigotes vivos contenidos en medios NNN, cepas Juanita, Querétaro, De la Cruz, Chiapas y Cocula.

Material de laboratorio

- Jeringas de 1 ml.
- Guantes cirujano
- Torundas con alcohol
- Cámara de Neubauer
- Tijeras

Método

Se prepararon seis lotes de 20 ratones cada uno, mismos que fueron denominados con números romanos del I al VI.

- Lote I:** Los roedores de este lote recibieron vía intraperitoneal (I.P.), 1 000 000 de tripomastigotes sanguíneos viables cepa Querétaro.
- Lote II:** Cada uno de los ratones de este lote, recibió I.P., 0.8 mililitros (ml) de vacuna B.C.G. conteniendo este inóculo 4 000 000 de bacilos, 15 días después fueron retados I.P. con 1 000 000 de tripomastigotes sanguíneos cepa Querétaro.
- Lote III:** Intraperitonealmente a cada ratón se le inoculó 0.1 ml de inmunógeno a los días 1 y 15, para desafiarlos al día 30 I.P. con 1 000 000 de tripomastigotes sanguíneos viables cepa Querétaro.
- Lote IV:** A los ratones de este lote se les aplicó vía I.P., 4 000 000 de bacilos de BCG, al segundo día, vía I.P. se les inoculó 0.1 ml de inmunógeno; diez días después, los animales recibieron un segundo inóculo de BCG por la misma vía y con la misma cantidad, al 11° día recibieron un 2° inóculo de inmunógeno con la misma característica de la primera aplicación, al día 26, se desafiaron I.P. con 1 000 000 de tripomastigotes sanguíneos viables cepa Querétaro.
- Lote V:** Los ratones fueron inoculados el primer día I.P. con 4 000 000 de bacilos mezclados con 0.1 ml. de Inmunógeno y 1 000 000 de tripomastigotes sanguíneos, viables cepa Querétaro, diez días después se repitieron los mismos inóculos y al 25 se desafiaron con 1 000 000 de tripomastigotes sanguíneos viables cepa Querétaro.

Lote VI: Constituido por inóculo I.P. de la mezcla de epimastigotes viables de las cinco cepas utilizadas para preparar el inmunógeno, ajustándose el inóculo a 1000 000 de parásitos en 0.1 ml. de solución salina isotónica. Quince días después, los ratones fueron desafiados con inóculo I.P. con 1000 000 de tripomastigotes sanguíneos viables cepa Querétaro.

4.8 Determinación de parasitemias en los animales inoculados

Material

Productos biológicos

- Ratones CD1- lotes I al VI.

Vidriería

- Cámara Neubauer
- Pipetas cuenta glóbulos blancos

Soluciones

- Solución salina isotónica estéril

Material de laboratorio

- Tijeras
- Guantes cirujano
- Torundas con alcohol
- Contador de teclas
- Microscopio compuesto
- Hojas de registro

Método

A todos los ratones de cada uno de los seis lotes se les tomó muestra de sangre del extremo distal de la cola para búsqueda y cuenta de tripomastigotes en circulación sanguínea periférica utilizando pipeta cuenta glóbulos blancos y cámara de Neubauer, las

cuentas de la parasitemia se realizaron cada tercer día hasta la muerte de los ratones.

4.9 Búsqueda de nidos de amastigotes en diversos órganos y tejidos de los animales infectados

Material

Reactivos

- Cloroformo
- Formol 10%
- Parafina 56-60°C
- Albúmina Meyer
- Sulfato doble de aluminio y potasio
- Oxido mercurico
- Alcohol absoluto

Soluciones

- Agua destilada
- Alcohol 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 95°.

Productos biológicos

- Ratones de los lotes I al VI

Vidriería

- Frascos ampula de 5 ml.
- Portaobjetos de 25 x 75 mm.
- Cubreobjetos de 22 x 22 mm.

Material de laboratorio

- Guantes de cirujano
- Tijeras
- Pinzas de disección

- Torundas con alcohol
- Desecador con algodón empapado con cloroformo
- Algodón
- Gasas
- Microtomo de 4 micras (μ)
- Cuchillas Jung
- Microscopio óptico
- Contador de teclas
- Hojas de registro
- Refrigerador
- Estufa

Método

A los ratones que durante el transcurso del presente estudio fallecieron, así como a los que sobrevivieron por más de 100 días y que tiempo posterior al cual fueron sacrificados; se les realizó disección de cerebro, corazón, hígado, bazo y riñón con la finalidad de realizar cortes histológicos, después de haber fijado las piezas con formol al 10%, deshidratadas con alcoholes y montadas en parafina, para posteriormente ser cortadas con microtomo y teñidas mediante la técnica de hematoxilina-eosina. De los bloques de parafina de cada uno de los órganos de todos los ratones de los seis lotes, se realizaron 100 cortes seriados de cuatro micras de espesor, tomando una muestra de tejido cada diez cortes, con la finalidad de contar con diez muestras de cada órgano de cada uno de los 120 ratones y a su vez teñirlos para finalmente observarlos con microscopio de luz con objetivo de inmersión 100X y ocular 10X y así buscar y contar los nidos de amastigotes presentes.

5. RESULTADOS

5.1. Presencia de tripomastigotes sanguíneos en sangre periférica.

A pesar de que la cantidad de tripomastigotes vivos de la cepa Querétaro utilizados para el desafío fue la misma en cada ratón, el promedio de las parasitemias encontradas en los animales fue muy irregular.

Lote I Testigo: A los seis días posteriores a la inoculación, el promedio de parásitos circulantes que se encontró en los animales testigo, fue de 780 000 por ml. de sangre para incrementarse considerablemente a los días 12, 15, 21 y 27 alcanzando en esta última fecha el promedio de 48 000 000 de parásitos por ml. de sangre (Grafica 1). A los pocos días de haber colocado los tripomastigotes (día 12) el 20% de los ratones de este lote presentaba parálisis trasera (PT) y el 30% ya había fallecido. Estas alteraciones fueron progresando en forma paralela con la parasitemia, así para el día 21 el 50% de los animales que sobrevivieron tenía parálisis del cuarto trasero y para el día 27 se alcanzó el 100% de mortalidad (DEFN).

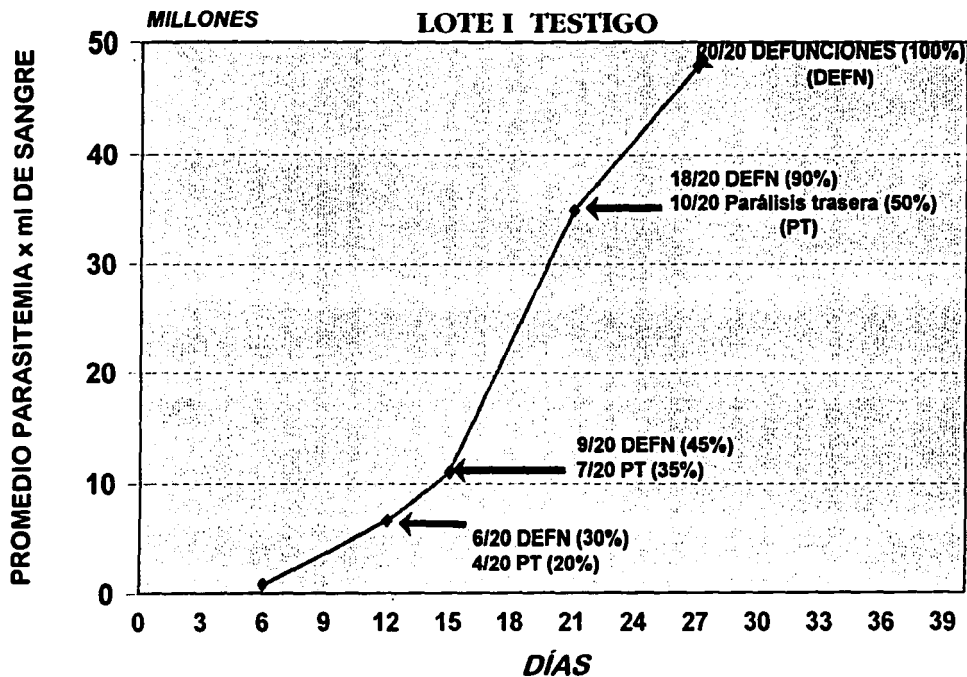
Lote II Inmunizados con BCG: La parasitemia en estos ratones se manifestó a los 3 días posteriores a la inoculación con 600 000 parásitos por ml. de sangre para incrementarse gradualmente hasta alcanzar a los 21 días, 14'575 000 parásitos por ml. de sangre, sin embargo, al día 24 se observó un decremento a 10 000 000 de parásitos; 3, 6 y 9 días después de esta fecha, la parasitemia se incrementó considerablemente alcanzando para el día 33, 27'400 000 parásitos por ml. de sangre (Grafica 2).

En este lote la PT y las DEFN se presentaron en forma muy temprana, ya que a los 3 días de iniciado el reto se tenía el 20% de animales muertos y al día 9 el 10% con PT, para el día 12 habían fallecido 30% de ratones, al 21 el 60%, al 24 el 80% y al día 33 el 100%.

Lote III Inmunógeno: A los 3 primeros días de haber iniciado el reto, se tuvo como

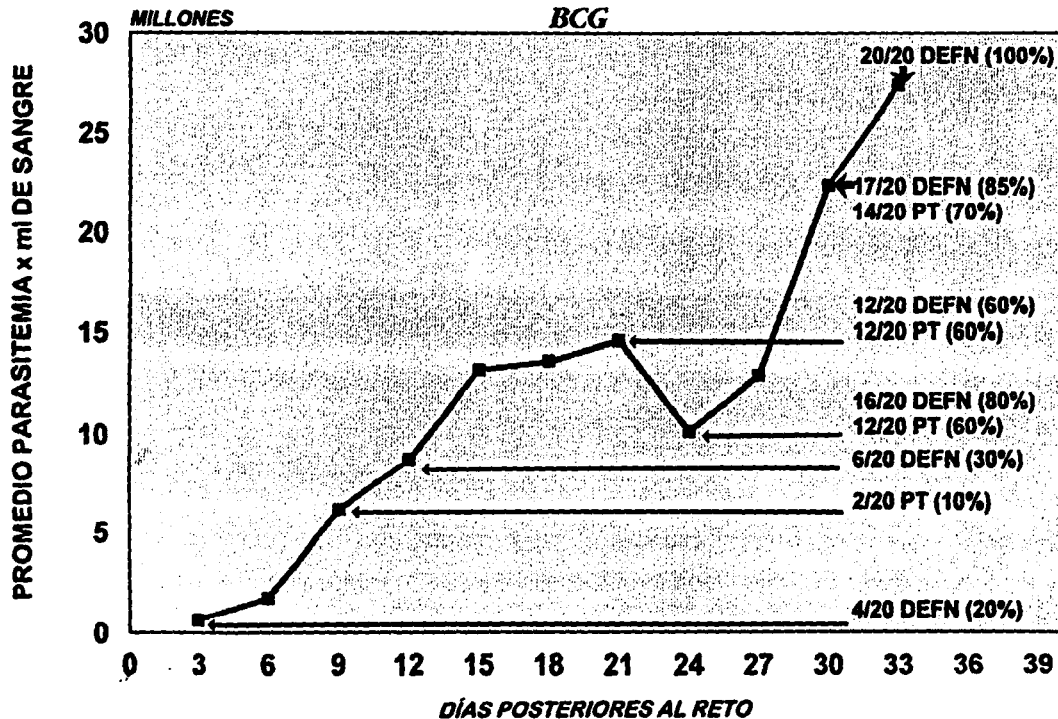
ACCIÓN DE UN INMUNÓGENO EN CONTRA T. CRUZI

GRÁFICA 1.



ACCIÓN DE UN INMUNÓGENO EN CONTRA DE T. CRUZI

GRÁFICA 2. LOTE II



promedio 50 000 parásitos por mililitro de sangre circulante, la parasitemia ascendió en forma lenta y progresiva para alcanzar su pico máximo el día 21 con 4 400,000 parásitos por ml. de sangre, posteriormente se observó descenso de la parasitemia, a tal grado que para el día 57 ya no se encontraron parásitos en sangre circulante (Gráfica 3).

En ninguno de los ratones de este lote se presentó parálisis trasera (PT). En cuanto a mortalidad se tuvo el 5% al día 12, el 10% al 15 y el 15% al día 21. El 85% de los ratones sobrevivieron sin contratiempos hasta el día 100, fecha en que fueron sacrificados para realizar estudios histológicos.

Lote IV BCG - Inmunógeno: La parasitemia encontrada en los primeros 3 días de iniciado el reto, fue de 80 000 parásitos por mililitro de sangre, esta parasitemia se incrementó progresivamente para alcanzar su pico máximo a los 24 días con 4,594 000 parásitos por ml. de sangre, los días subsiguientes fue notándose decremento en el número de parásitos circulantes al grado de no encontrarlos en sangre periférica a partir del día 51 (Gráfica 4).

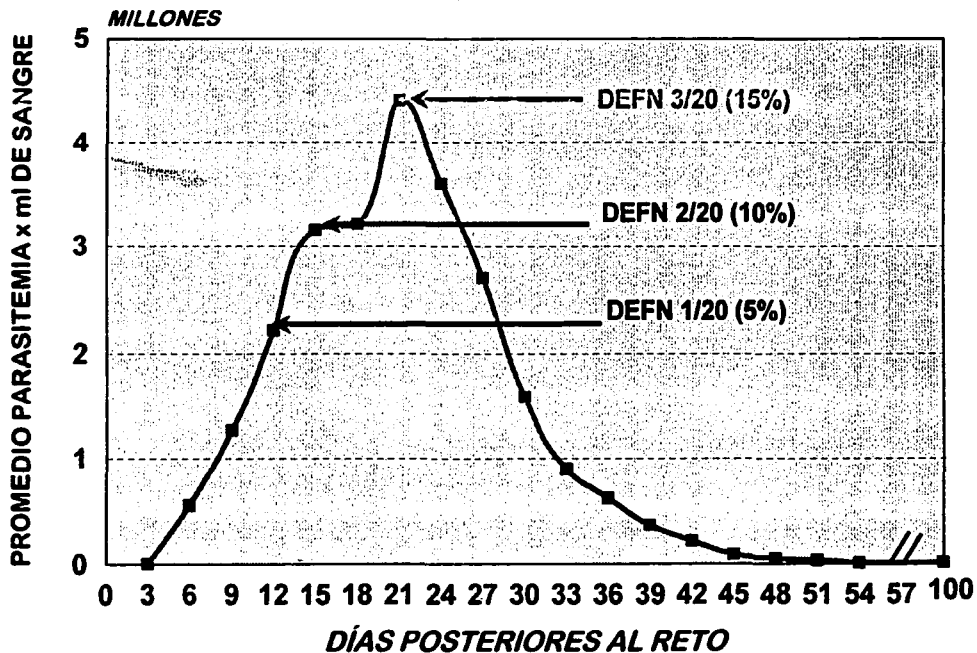
En cuanto a la mortalidad, éstos iniciaron con el 5% al día 9, para el día 51 se contaba con el 25% de defunciones, mismos que continuaron presentándose a pesar de no haber parásitos circulantes en sangre periférica, así para el día 60 se tenía el 60% de muerte y al día 72 se llegó al 100% de mortalidad en este lote.

Lote V BCG - Inmunógeno - tripomastigotes: La parasitemia encontrada a los tres días fue de 82 000 tripomastigotes sanguíneos para alcanzar su pico máximo a los 21 días con un promedio de 955 000 parásitos en sangre periférica, posterior a esta fecha hubo descenso de las cifras hasta llegar el día 39 a cero parásitos (Gráfica 5). Solo el 10% de los ratones de este lote presentó parálisis trasera (PT) (día 24), en cuanto a mortalidad, esta se inició el día 15 con el 10%, el día 39 con el 30%, el 48 con el 35% y para el día 66 se reportaba el 45% de ratones muertos, porcentaje que prevaleció

ACCIÓN DE UN INMUNÓGENO EN CONTRA DE T. CRUZI

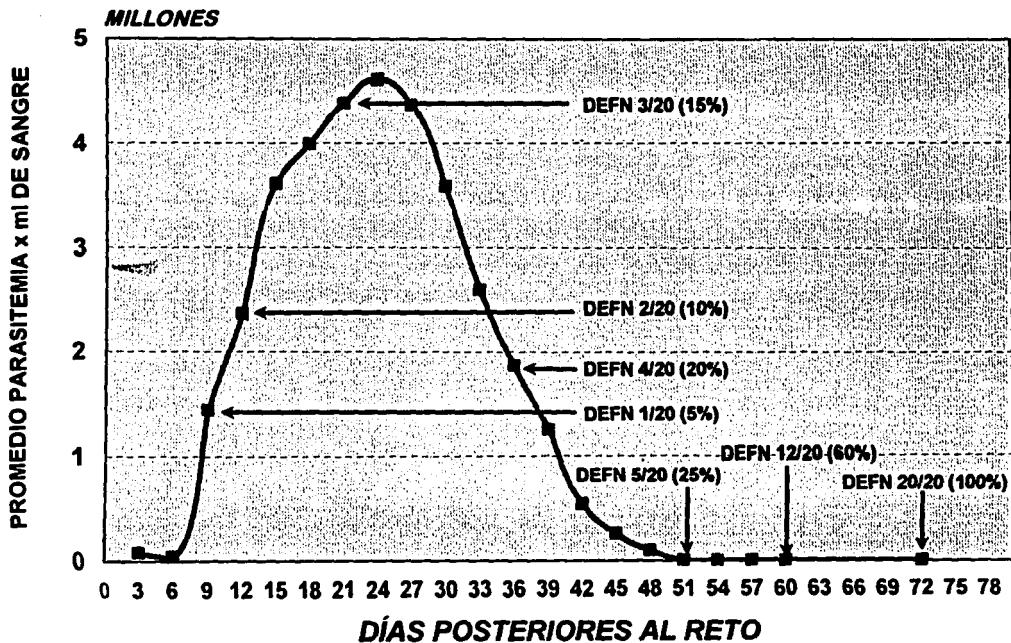
GRÁFICA 3. LOTE III

INMUNÓGENO



ACCIÓN DE UN INMUNÓGENO EN CONTRA DE T. CRUZI

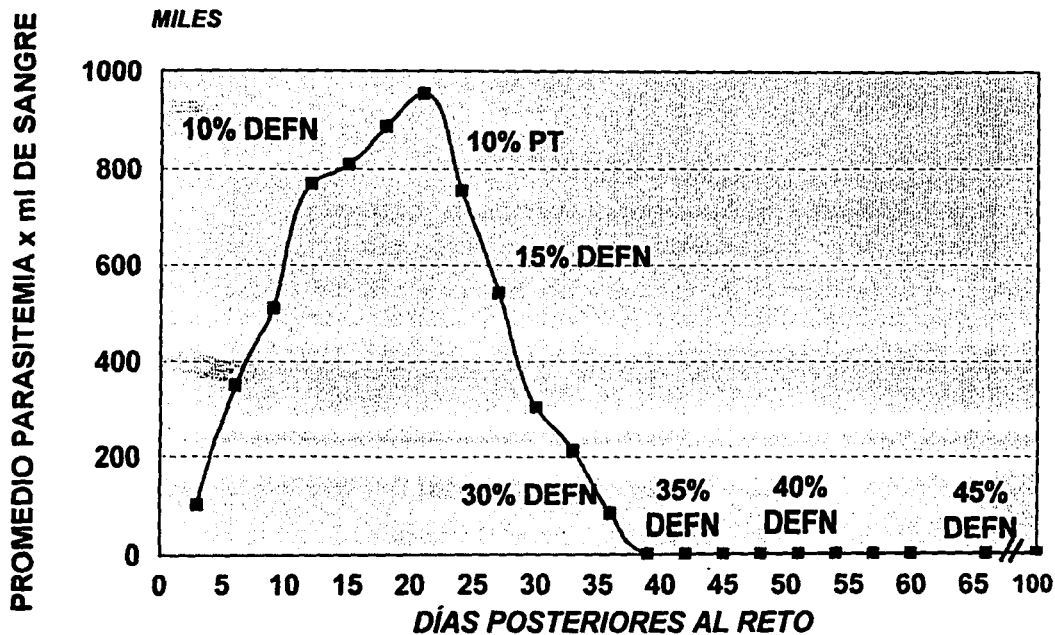
GRÁFICA 4. LOTE IV
BCG-INMUNÓGENO



ACCIÓN DE UN INMUNÓGENO EN CONTRA DE T. CRUZI

GRÁFICA 5. LOTE V

BCG-IMMUNÓGENO-TRIPOMASTIGOTES



hasta que el resto de los animales fue sacrificado.

Lote VI Mezcla de Epimastigotes vivos de cinco cepas diferentes: La parasitemia a los 3 días de iniciado el reto fue de 1'200 000 parásitos por mililitro de sangre, cifra que se incrementó considerablemente para alcanzar al día 45, 68 millones de parásitos por ml. de sangre circulante (Gráfica 6). Además de la elevada presencia de parásitos, a los 3 días posterior al reto se tenía ya el 30% de mortalidad, misma que se fue incrementando en forma paralela con la parasitemia y otras alteraciones tales como parálisis trasera, de tal forma por ejemplo, que para el día 33, la parasitemia reportaba 36 millones de parásitos por ml. de sangre, había el 80% de mortalidad y todos los animales restantes presentaban parálisis trasera. Al día 45, se tuvo el 100% de mortalidad.

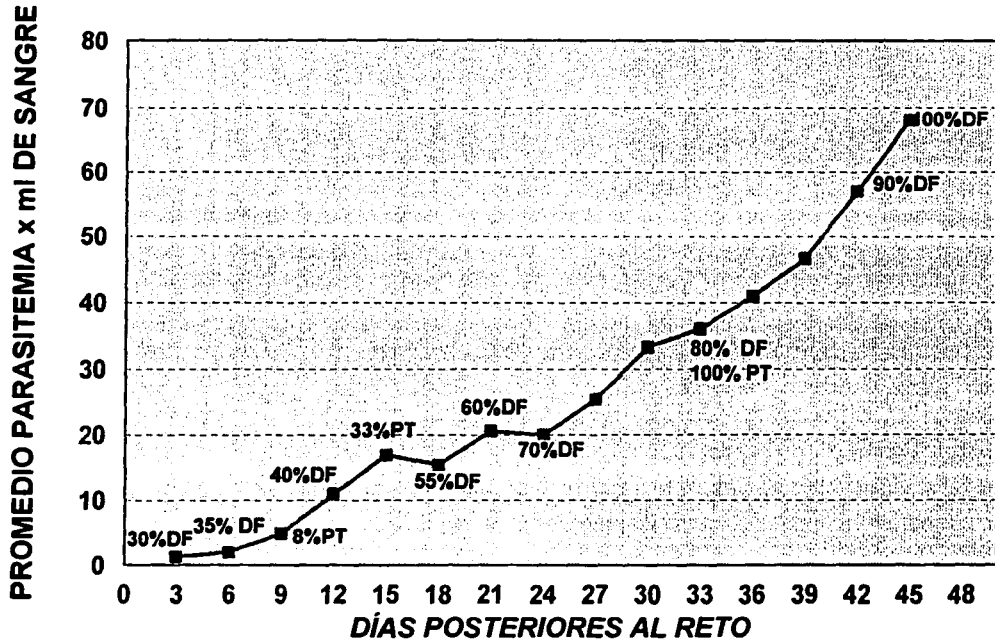
Posterior a la revisión del comportamiento de cada uno de los lotes, resulta interesante observar en conjunto el comportamiento de todos los ratones de los seis de los lotes estudiados. En la Gráfica 7, se aprecia la gran diferencia de los picos máximos de parasitemia obtenidos, siendo el lote que contenía la mezcla de epimastigotes vivos, quien obtuvo el pico máximo de parásitos por ml de sangre.

Los lotes III y IV mostraron 4,400 000 y 4,594 000 parásitos respectivamente a diferencia del lote V, donde se reportó un pico máximo de parásitos menor a 1000 000 de tripomastigotes sanguíneos, lo que parecería indicar que en estos tres lotes se presentó una mejor respuesta a diferencia de los tres lotes restantes, sin embargo al comparar las parasitemias con el promedio de vida de cada uno de los lotes estudiados (Gráfica 8) observamos que el lote testigo (lote 1) presentó el 100% de mortalidad al día 27, otros lotes donde también se presentó este porcentaje de defunciones fueron el lote II a los 33 días, lote IV a los 72 y el lote VI a los 45 días, el lote de los ratones que recibió el inmunógeno presentó solo 15% de defunciones y el resto de ellos tuvo que ser sacrificado a los 100 días de iniciado el estudio por encontrarse en perfecto estado de salud. El lote V presentó el 45% de mortalidad y el resto de los animales fueron

ACCIÓN DE UN INMUNÓGENO EN CONTRA DE T. CRUZI

GRÁFICA 6. LOTE VI

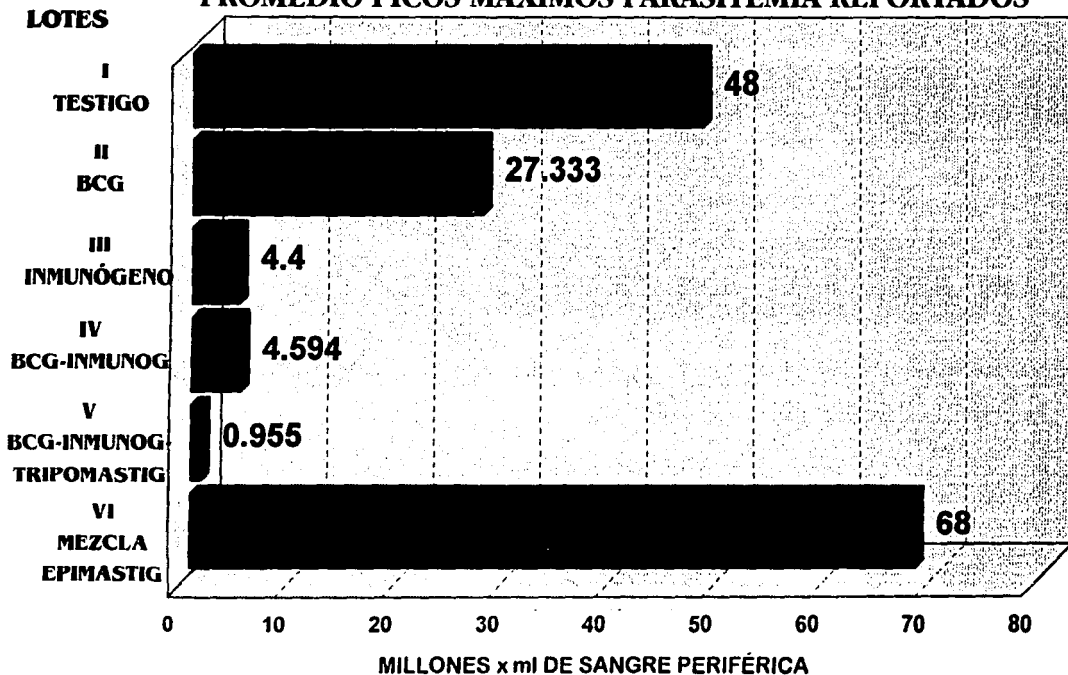
MEZCLA DE EPIMASTIGOTES VIVOS DE CINCO CEPAS DIFERENTES



ACCIÓN DE UN INMUNÓGENO EN CONTRA DE T. CRUZI

GRÁFICA 7.

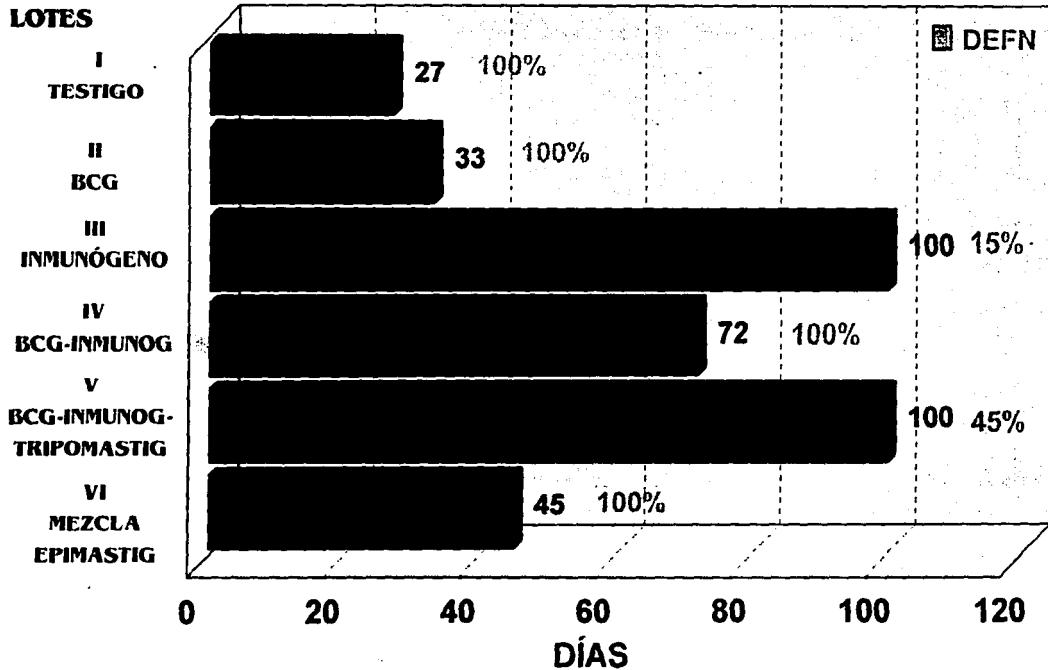
PROMEDIO PICOS MÁXIMOS PARASITEMIA REPORTADOS



ACCIÓN DE UN INMUNÓGENO EN CONTRA DE T. CRUZI

GRÁFICA 8.

PROMEDIO DE SOBREVIDA EN DÍAS POR GRUPO DE ESTUDIO.



también sacrificados al cumplir 100 días de estudio.

Con estos dos parámetros (parasitemia y sobrevida) resalta el lote III (inmunógeno) con en el que se obtuvo en los animales inmunizados pocos parásitos en sangre circulante y mayor tiempo de sobrevida.

5.2. Presencia de Amastigotes en diversos tejidos.

Como se mencionó previamente, los tejidos disecados y montados con la técnica de parafina para posteriormente teñir los cortes con hematoxilina eosina fueron: cerebro - corazón - hígado - bazo y riñón.

Se seleccionaron 10 muestras de los 100 cortes de cada órgano, lo que llevó a tener 50 cortes histológicos por cada ratón, 1000 por lote y 6000 por el total de los 6 lotes de los animales estudiados. En los cortes histológicos de bazo y riñón de los 120 animales estudiados, no se localizaron parásitos intracelulares. El tejido cardíaco fue el más afectado dado que en este sitio se localizó el mayor número de nidos de amastigotes, le siguió en menor proporción el tejido hepático; el número de parásitos en el cerebro, fue muy reducido. Del número total de los nidos de amastigotes observados en cada uno de los lotes estudiados fué muy variable (Tabla 4) (Gráfica 9), teniendo cifras muy bajas como por ejemplo: Lote III, 32 nidos de amastigotes, o muy elevadas como los reportados en el Lote I con 4445 nidos de amastigotes.

Como observamos en la tabla 4 y gráfica 9, el promedio máximo de nidos de amastigotes reportados fueron los del lote I, seguidos por los lotes VI y II, el lote III (inmunógeno) presentó un solo nido de amastigotes en los 20 animales estudiados.

5.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el presente estudio, fueron sometidos a las pruebas

ACCIÓN DE UN INMUNÓGENO EN CONTRA DE T. CRUZI

TABLA 4.

NIDOS DE AMASTIGOTES ENCONTRADOS EN DIVERSOS CORTES HISTOLÓGICOS

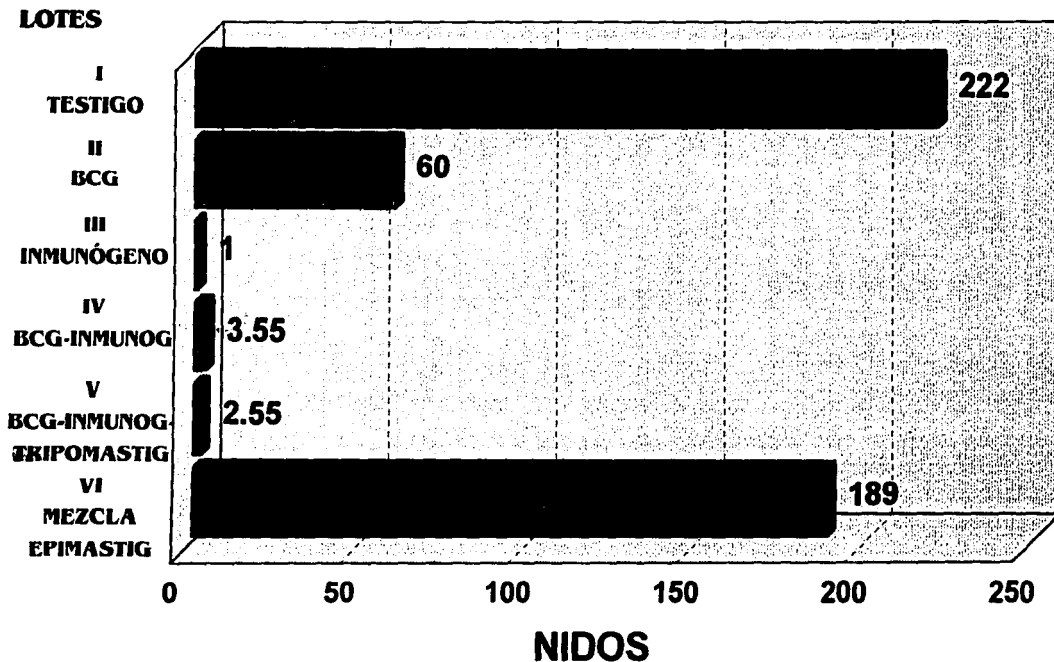
| LOTE | CARACTERÍSTICA DEL INÓCULO | NO. DE NIDOS | PROMEDIO |
|------|---|-----------------|----------|
| I | TRIPOMASTIG. SANG. VIABLES DE T. CRUZI | 4415 | 222 |
| II | BCG | 1210 | 60 |
| III | INMUNÓGENO | 32 | 1 |
| IV | BCG+INMUNOG | 71 | 3.55 |
| V | BCG+INMUNOG+TRIPOMAST | 51 | 2.55 |
| VI | MEZCLA DE 5 CEPAS EPIMATIG | 3786 | 189 |

FALLA DE ORIGEN

ACCIÓN DE UN INMUNÓGENO EN CONTRA DE T. CRUZI

GRÁFICA 9.

PROMEDIO DE NIDOS DE AMASTIGOTES REPORTADOS



estadísticas de medidas de tendencia central y dispersión tales como el promedio (\bar{x}), desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (cv) desde el punto de vista descriptivo y la T de Student así como la regresión y correlación lineal (r) y la tendencia hacia el incremento o decremento en función del tiempo (b). Como se observa en la tabla 5, fué considerado el día del inicio de la presencia de parásitos en sangre periférica y el día en que se reportó el pico máximo de parasitemia, así como los días en que sobrevivieron los ratones posterior al reto con la cepa Querétaro de tripomastigotes sanguíneos a fin de obtener el promedio (\bar{X}) de sobrevida, desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (cv).

TABLA 5
RESULTADOS ESTADISTICOS DE LA SOBREVIDA OBTENIDA

| LOTE | DÍA INICIO PARASITEMIA | PROMEDIO DE PARASITOS X ML SANGRE PERIFERICA | DÍA PICO MAXIMO PARASITEMIA | PROMEDIO DE PARASITOS X ML SANGRE PERIFERICA | \bar{X} PROMEDIO SOBREVIDA | s DESVIACION STANDAR | CV COEFICIENTE DE VARIACION |
|---------------------------------|------------------------|--|-----------------------------|--|------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| I Testigo | 6 | 780,000 | 27 | 48'000,000 | 20.16 | 9.3 | 46% |
| II BCG | 3 | 600,000 | 33 | 27'333,333 | 18.9 | 10.6 | 56% |
| III Inmunógeno | 3 | 80,000 | 21 | 4'400,000 | 88.36 | 34.2 | 38% |
| IV BCG Inmunógeno | 3 | 800,000 | 26 | 4'594,000 | 79.7 | 36.3 | 46% |
| VBCO Inmunógeno Tripomastigotes | 3 | 82,000 | 21 | 955,000 | 60.95 | 24.6 | 43% |
| V Mezcla Epimastigotes | 3 | 1'200,000 | 45 | 68'000,000 | 27.2 | 12.6 | 46% |

Comparando los resultados obtenidos del Lote I y lote III, se aprecia claramente una franca diferencia en el promedio de sobrevida de los animales a quienes se

les protegió con el inmunógeno, en cuanto a los resultados en la desviación estandar, se observa que fué de 9.3 en el lote testigo y de 34.2 en el lote del inmunógeno; si bien es cierto que se obtuvo una desviación mayor en el lote IV, en este, al observar el promedio de sobrevida obtenido en comparación con el lote III, se nota que en este último lote, la sobrevida también fué mayor.

Referente a la correlación lineal (Tabla 6) se observa que el lote I, al tener su inicio de la parasitemia al día 6 con 780,000 parásitos y su pico máximo al día 33 con 27'333,333 parásitos por ml de sangre, tuvo una tendencia franca hacia el incremento de .95 ($r=0.95$). Esta tendencia fué muy similar (como era de esperarse) en los lotes II y VI ya que correspondieron al grupo de animales que también presentaron parasitemias muy elevadas a diferencia de un resultado totalmente opuesto de -0.25 obtenido por las parasitemias tan bajas y la mayor sobrevida presentada en el lote III.

TABLA 6
COEFICIENTE DE CORRELACION (r)
POR GRUPO DE ESTUDIO.

| LOTE | Día INICIO PARASITEMIA | PROMEDIO X PARASITOS ML. SANGRE PERIFERICA | Día PICO MAXIMO PARASITEMIA | PROMEDIO X PARASITOS ML. SANGRE PERIFERICA | r |
|----------------------------------|------------------------|--|-----------------------------|--|-------|
| I Testigo | 6 | 780,000 | 27 | 48'000,000 | 0.95 |
| II BCG | 3 | 600,000 | 33 | 27'333,333 | 0.77 |
| III Inmunógeno | 3 | 50,000 | 21 | 4'400,000 | 0.28 |
| IV BCG Inmunógeno | 3 | 800,000 | 24 | 4'894,000 | 0.618 |
| V BCG Inmunógeno Tripomastigotes | 3 | 82,000 | 21 | 958,000 | 0.128 |
| Mezcla VI Epimastigotes | 3 | 1'200,000 | 46 | 68'000,000 | 0.80 |

6. DISCUSION

Muchos han sido los esfuerzos de diversos grupos de investigadores de distintas instituciones tanto nacionales como internacionales dirigidas a realizar acciones tendientes en disminuir, curar y prevenir los daños que genera *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas.

Las investigaciones efectuadas en el campo de la inmunología sobre este padecimiento son de trascendental importancia, ya que quizá en estos estudios se encuentre la solución al problema preventivo y terapéutico de esta enfermedad.

Referente a la línea de inmunógenos y vacunas, se han realizado también acciones para este fin, obteniéndose a la fecha resultados poco satisfactorios.

Fué así como en nuestro grupo de investigación al estar trabajando por más de 30 años en tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas), obtener diversas cepas de este parásito y querer participar en la lucha para el control de esta parasitosis, nació la idea de trabajar en primera instancia con un inmunógeno completo de policepas de epimastigotes tratados con formol, mismo que al ser aplicado a ratones y posteriormente hecho el reto en ellos con tripomastigotes sanguíneos cepa Querétaro, seguimos periódicamente el curso de la parasitemia al igual que en otros lotes de ratones inoculados con diversas variantes, obviamente entre estos lotes debía de existir uno que nos sirviera de testigo acerca del comportamiento de la cepa virulenta que se usó para el desaffo y comparando el comportamiento de los dos lotes, observamos que los ratones que recibieron el inmunógeno presentó buen estado general, bajas parasitemias, un sólo nido de amastigotes como promedio de los 20 ratones en tejido cardíaco y poco índice de mortalidad, lo anterior contrasta notoriamente con el mal estado general de los animales, parasitemias elevadas y gran cantidad de nidos de amastigotes encontrados en sus tejidos, así como mortalidad del 100% a los pocos días de inoculados.

La explicación real de qué sucedió, del cómo y porqué funcionó el inmunógeno en la protección de los animales de experimentación, no la tenemos, claro esta que podríamos suponer algunos fenómenos, como por ejemplo una activación policlonal de células B y T que otros grupos de investigación han reportado en la infección aguda con la participación de algún componente mitógeno del parásito, dado que esta activación involucra células B secretoras de anticuerpos IgG1, IgG2b y en especial IgG2a. Podríamos mencionar también el aumento de células T activadas tanto de aquellas en fase proliferativa, como las ya diferenciadas y capaces de ejercer funciones efectoras y colaboradoras en la activación de células B. Asimismo, la participación en la protección del incremento de la actividad NK (Natural Killer) y del interferón sérico que otro grupo de investigación también ha mencionado en la activación policlonal, así como la capacidad misma que posee el interferon para inhibir el crecimiento intracelular de *T. cruzi* y modular las funciones de células T y B. Quizá en la resistencia de la infección pudieran haber actuado algunas citoquinas que algunos investigadores mencionan, tales como el factor estimulante de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), estas citoquinas tienen una actividad menor que la del interferón y según los expertos todavía se desconoce su relevancia *in vitro*.

Respecto a la respuesta inmune humoral, esta es insuficiente para asegurar protección, pero necesaria para la resistencia a la infección por *T. cruzi*. Sin embargo, no se ha dilucidado completamente la actividad biológica de los anticuerpos involucrados en la protección.

Por todo lo antes comentado observamos que la infección por *T. cruzi* produce serias alteraciones del sistema inmune del huésped cuyas consecuencias en la enfermedad de Chagas no son aún comprendidas. La diversidad de elementos celulares y humorales implicados en el mecanismo de destrucción del parásito podría estar relacionada con las características biológicas del parásito.

En suma, independientemente de los mecanismos que pudieron haber actuado en la

protección de los animales a quienes se les puso el inmunógeno, se pudo observar que éste confirió protección a la infección, logrando en los ratones buen estado general, parasitemias bajas, escasos nidos de amastigotes y sobrevida del 85% a los 100 días de estudio, elementos que se apoyaron con pruebas estadísticas y cuyos resultados fueron significativos para considerar que el inmunógeno elaborado por nuestro grupo de investigación cumplió con nuestro objetivo inicial.

Con este trabajo, consideramos sentar las bases para proseguir esta línea, trabajando más en el estudio de este inmunógeno y con el tiempo lograr quizás una mejor protección a la infección por *T. cruzi*, y quizás dilucidar algunos o uno de los mecanismos implicados en esta acción.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

7. CONCLUSIONES

Por los resultados alcanzados hasta este momento podemos señalar que en los ratones que recibieron el inmunógeno elaborado con policepas de epimastigotes completos tratados con formol:

1. No se reportó malestar general durante los 100 días que duró el estudio.
2. Se observaron promedios bajos de parasitemia a diferencia de los picos elevados de otros lotes.
3. Sólo se encontró en el total de ellos, un solo nido de amastigotes en el tejido cardíaco.
4. Se obtuvo el 85% de sobrevivida a los 100 días del estudio, a diferencia de los otros lotes, donde la mortalidad fué mayor a los pocos días de haber iniciado el reto con una cepa virulenta.
5. Por todo lo anterior se puede concluir también que se logró el objetivo planteado para este trabajo: Preparar un inmunógeno que confiriera protección a la infección por *T. cruzi*.

8. AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo pudo ser concluido gracias a la participación activa y desinteresada de diversas personas y servicios de apoyo de la Facultad de Medicina U.N.A.M.

- Personal de la Unidad de Bioterios, representada por su Jefatura, Dr. Enrique Pinzón Estrada.
- Personal de la Hemerobiblioteca "J.J. Izquierdo", con un especial reconocimiento para Biól. Sandra G. Moncada Hernández y Lic. Egbert Sánchez Van der Kast.
- Técnicas Aurora Rivero García y Rufina Alvarez Mendoza por el proceso de las diferentes preparaciones fijas.
- Dr. Cristino Rivas García y Aux. Lab. Estelita Piña, por haber colaborado durante todo el tiempo que duraron los experimentos.
- Srita. M. Arminda Martínez González, quién mecanografió el manuscrito, a pesar de la ilegibilidad de mis notas, con competencia y paciencia.
- Sra. Aurora Salazar y Dibujante Jesús Ortega Estrada, por el apoyo incondicional que me brindaron.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Velasco, C.O., Guzmán, B.C., Cruz, R.J., López, O.O., González, D.F. 1991. La Enfermedad de Chagas. Publ. Téc. INDRE. No. 8 p. 1-56.
2. Chagas, C. 1909. Nova tripanozomíaze humana. Mem. de Instituto "Oswaldo Cruz", **1(2)** : p. 159.
3. Tay, J., Sánchez Vega, J.T., 1993. Tripanosomiasis americana. Microbiología y Parasitología Médicas. 1a. Edición, pp. 117-128.
4. Bol. Oficina Sanit. Panam 1984. Status of Chagas disease in the Americas. Aug **97(2)**: pp.159-165.
5. Schenone H. y Rojas A. 1989. Pragmatic data and observations related to the Epidemiology of Chagas disease. Bol. Chil. Parasitol. Jul-Dic **44(3-4)** pp. 66-86.
6. De Haro, A.I. 1994. Clasificación de protozoarios y helmintos. Manual Departamental Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. p. 17-22.
7. Carcavallo R.D. 1975. Aspects of the epidemiology of Chagas diseases in Venezuela and Argentina. American Trypanosomiasis Research. PAHO So. Pub. No. 318.
8. Bertoglia J; Rodríguez J; Gordillo N; Mendoza J; Contreras M.C.; Schenone H. 1984. Epidemiology of Chagas disease in Chile. Rural sectors infection of domestic mammals by *Trypanosoma cruzi* and new contributions to the knowledge of domiciliary triatomid infestation in region III, Chile (1982-1983). Bol. Chil. Parasitol (Chile) Jan-Jun **39 (1-2)**: p. 20-23.

9. Venegas L; Rojas A; Villaroel F; Contreras M.C.; Sandoval L; Schenone H. 1983. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en Chile Sectores rurales. Infestación triatomídea domiciliaria e infección por *T. cruzi* del vector y mamíferos domésticos de la VI región del Libertador General Bernardo O'Higgins.
10. Ruiz A.M.; Wisnivesky-Colle C; Gurtter R; Lazzari J. 1985. *Trypanosoma cruzi* infection in humans, dogs and goats in rural areas of the province of Cordoba. Medicina (B. Aires) (Argentina), **45(5)**: p. 539-546.
11. Nazaís J.P. 1985. Hypotheses sur l'origine de certains parasites du continent latino américain. Bull Soc Pathol Exot Filiales (France) **78(3)**: p. 401-412.
12. Cortes J.M.; Velasco-Castrejón O; Labastida M.H; Melchor A.H; Duarte N; de Torre R. 1985. La enfermedad de Chagas en Santiago Yosotiche, Oaxaca, México. Salud Pública Méx. (México) Jan-Feb **27(1)** p. 60-65.
13. Días J.C. 1985. Socio-cultural and economic aspects of the spread and control of human Chagas disease. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. (Belgium) **65** Suppl 1 p. 119-126.
14. Tay, J.; Goycolea, O. y Biagi, F.F. 1961. Observaciones sobre enfermedad de Chagas en la Mixteca Baja. Nuevo caso humano en la República Mexicana. Bol. Of. Sanit. Panamer. **51**: pp. 322-327.
15. Carrada, B. T. 1983. Tripanosomiasis americana de Chagas. Bol. Med Hosp. Infant. Méx: **49(8)**: 408-416.
16. Guzmán Bracho M. 1986 Importancia de la enfermedad de Chagas en México. Rev. Latinoam. Microbiol. **28**: pp. 275-283.

17. Salazar-Schettino, P.M.; Bucio, M.I.; Haro, I. de, Tay, J. y Alonso-G.T. 1987. Reservorios y transmisores de *Trypanosoma cruzi* en el estado de Oaxaca. Rev. Invest. Sal. Públ. (Méx) 29: pp. 26-32.
18. OMS/OPS: 1974 Bol. of Sanit. Panam. 77: pp.141-158.
19. Kirchhoff L.V. 1993. Chagas disease. American trypanosomiasis. Infect. Dis. Clin. North Am. Sept. 7(3): pp.487-502.
20. Reyes P. 1984. Enfermedad de Chagas en México. Arch. Inst. Cardiol. (México) Jan-Feb, 54 (1) p. 1-2.
21. Salazar-Schettino, P.M., Tay, J., Ruíz Hernández, A.L., de Haro, I., Bucio, M.I. Jiménez, J., García Yañez, Y., Gutiérrez, Q.M. 1984. Seropositividad a *T. cruzi* en 4 grupos de población del estado de Oaxaca. Salud Pública Mex(México) Nov-Dic, 26(6) pp. 589-595.
22. Andersson, N., Morales, A., Nava, E., Martínez, E., Rodríguez, I., Young, P., Howard, M.K., Mides, M.A. 1990. *Trypanosoma cruzi* infection in the mexican state of Guerrero: a seroepidemiological (Elisa) survey of 20 communities. J Trop Med Hyg (England) Oct, 93(5) pp. 341-346.
23. Tay, J., Schenone, H., Sánchez-Vega, J.T., Robert, L. 1992. Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Bol. Chil. Parasitol. (Chile) Jul-Dec, 47(3-4) pp. 43-53.
24. Zárate, A.R. 1978. Cies Series de Doc. H.1, Chiapas, México.

25. Aguirre, PE 1947. 1947. Presencia de *Trypanosoma cruzi* en mamíferos y triatomídeos de Monterrey, Nvo. León, México. Arch. Med. Méx. 5: pp. 359-363.
26. Beltrán, E. 1949. Hallazgo de *Schezotrypanum cruzi* en una rata (*Rattus norvegicus*) de la Cd. de México, Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 10(1-4): pp. 15-18.
27. Tay, J., Biagi, F.F. y de Buen, A.M. 1967. Estado actual de conocimientos sobre triatomas y enfermedad de Chagas en Michoacán México. Rev. Fac. Med. (Méx) 9: pp. 109-121.
28. De Alhuja, S.A. 1985. Miocarditis por *Trypanosoma cruzi* en un perro. Veterinaria (Méx) 15: pp. 41-44.
29. Salazar-Schettino, P.M., Bucio, M.I., Haro, I. de, Tay, J. y Alonso-G.T. 1987. a. Reservorios y transmisores de *Trypanosoma cruzi* en el estado de Oaxaca. Rev. Invest. Sal. Públ. (Méx) 29: pp. 26-32.
30. Yaeger, RG. 1988. The prevalence of *T. cruzi* infection in armadillos collect at a site near New Orleans, Louisiana. Am. J. Trop. Med. Hyg. (United States) Mar 38(2) pp. 323-326.
31. Herrera, L., Urdaneta-Morales, S. 1992. *Didelphis marsupiales*: A Primary reservoir of *T. cruzi* in urban areas of Caracas, Venezuela. Ann Trop Med Parasitol (England) Dic. 86(6): pp. 607-612.
32. Hall, B.F. 1993. *Trypanosoma cruzi*: Mechanisms for entry into host cells. Semin Cell Biol (United States) Oct. 4(5): pp. 323-333.

33. Lettan L.A. 1991. Nosocomial transmission and infection control aspects of parasitic and ectoparasitic diseases. Part II Blood and tissue parasites. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. Feb. **12(2)**: pp. 111-121.
34. Contreras, M.C., de la Rivera, J., Sandoval, L., Cabrera, L., Soto, J.M., Pena, A., Schenone, H. 1985. Chagas disease in Chile. Urban sectors. X. Frequency of Chagas infection in blood donors and in mothers and newborn infants of the cities of La Serena, Ovalle and Illapel, 1983-1985. Bol. Chil. Parasitol. (Chile) Jul-Dec. **40(3-4)** pp. 72-76.
35. Bove, J. R. 1990. Transfusion - transmitted diseases other than AIDS and hepatitis Yale J. Biol. Med. (United States) Sept-Oct. **63(5)** pp. 347-351.
36. Landivar, W.H., Nakasa, T., Tachibana, H., Az, K.C., Tateno, S. 1992. Seropositivity to *T. cruzi* in blood donors in Santa Cruz, Bolivia. J Infect Dis Dec. **166(6)**: pp. 1464-1465.
37. Wanderley, DM., González, T.T., Pereira, M.S., Nascimento, R.D., Moraes-Sonza, H. 1993. Controle da hematerapia e da doença de Chagas transfusional; 1988 e 1990. Rev. Sande. Publica. (Brazil) Dec. **27(6)** : pp 430-435.
38. Wendel, S., Gonzaga, A.L. 1993. Chagas disease and blood transfusion: A New World problem?. Vox Sang (Switzerland) **64(1)**: pp.1-12.
39. Ramos-Echevarria, A.A., Monteon-Padilla, V.M., Reyes-López, P.A. 1993. Detección de anticuerpos contra *T. cruzi* en donadores de sangre. Salud Pública (México) Jan-Feb. **35(1)**: pp. 56-64.

40. Tegtmeyer, G.E. 1994. Infections diseases transmitted by transfusion: a miscellanea. *Vox Saug (Switzerland)* **67** Suppl 3 pp. 179-181.
41. Villablanca, E., Osorio, L., Salinas, P., Contreras, M.C., Duran, M.T., Milla, P., Schenone, H. 1984. Enfermedad de Chagas en Chile. Sectores urbanos. VII. Frecuencia de la infección chagásica en donantes de sangre y en madres y recién nacidos de las ciudades de San Felipe y los Andes. V Región, 1983-1984. *Bol. Chil. Parasitol. (Chile)* Jul-Dec. **39(3-4)**: pp. 72-74.
42. Moya, P., Moretti, E., Paolasso, R., Basso, B., Blanco, S., Sanmartino, C., Sorch de Cura, A. 1989. Neonatal Chagas disease: laboratory diagnosis during the first year of life. *Medicina (B. Aires) (Argentina)* **49(6)**: pp. 595-599.
43. Azogue, E., Darras, C. 1991. Estudio prospectivo de la enfermedad de Chagas en recién nacidos con infección placentaria por *T. cruzi* (Santa Cruz - Bolivia). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop. (Brazil)* Apr-Jun. **24(2)**: pp. 105-109.
44. Contreras, M.C., Saavedra, T., Eseaff, M.V., Rojas, A., Schenone, H. 1991. Endemia chagásica familiar detectada a consecuencia de un caso de infección congénita. *Bol. Chil. Parasitol. (Chile)* Jul-Dec. **46(3-4)**: pp. 77-79.
45. Azogue, E. 1993. Women and congenital Chagas disease in Santa Cruz, Bolivia: epidemiological and sociocultural aspects. *Soc Sci Med (England)* Aug **37(4)** pp. 503-511.
46. Arcovi, M., Orfus, G., Griemberg, G. 1993. Incidencia de la Infección chagásica en embarazadas y en recién nacidos en área no endémica. *Medicina (B. Aires) (Argentina)* **53(3)** pp. 217-222.

47. Bittencourt, A.L. 1992. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo (Brazil)* Sept-Oct. **34(5)** pp. 403-408.
48. Zailenber, M., Segonio, A. 1993. Congenital Chagas disease in the city of Salta, Argentina. *Ist Med Trop Sao Paulo (Brazil)* Jan-Feb. **35(1)** pp. 35-43.
49. Calvo Méndez, M.L., Nogueira Torres, B., Alejandro Aguilar, R. 1992. The oral route; an acces port for *Trypanosoma cruzi* Rev. Latinoam. Microbiol. (México) Jan-Mar. **34(1)** pp. 39-42.
50. Amatto Neto, V., Matsubora, L., Campos, R., Moreira, A.A., Pinto, P.L., Faccioli, R., Zugaib, M. 1992. *T. cruzi* in the milk of women with chronic Chagas disease *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo (Brazil)* Jan-Feb. **47(1)** pp. 10-11.
51. Jorg, M.E. 1992. The transmission of *T. cruzi* via human milk. *Rev Soc Bras Med Trop (Brazil)* Jan-Mar. **25(1)** p. 83.
52. Pinto, D.J. 1984. Clínica y Terapéutica da doença de Chagas. pp. 1-106.
53. Thambo, S., Passalacqua, W., Van Canwelaert, R., Lazcano, F. 1989. Chagas disease in patients with renal transplantation. *Rev. Med. Chil. (Chile)* Jan. **117(1)** pp. 18-22.
54. De Arteaga, J., Massari, P.M., Galli, B., Garzon Maceda, F. 1992. Renal transplantation and Chagas disease. *Transplant Proc. Oct.* **24(5)** pp.1900-1901.
55. Cantarovich, F., Vazquez, M., García, M.D., Abbud Filho, M., Herrera, C., Villegas Hernández, A. 1992. Special infections in organ transplantation in South America. *Transplant. Proc. Oct.* **24(5)** pp.1902-1908.

56. Luders, C., Caetano, M.A. Lanhez, L.E., Fonseca, J.A., Sabbaga, E. 1992. Renal transplantation in patients with Chagas disease: a long-term follow-up. *Transplant Proc.* Oct. **24(5)** pp.1878-1879.
57. Bocchi, E.A., Bellotti, G., Uip, D., Kalil, J., de Lourdes Miguelin, M., Fiorelli, A., Stolf, N., Jatene, A., Pilleggi, F. 1993. Long-term follow-up after heart transplantation in Chagas disease. *Transplant. Proc.* Feb. **25(1 pt 2)** pp.1 329-1330.
58. Vazquez, M.C., Riarte, A., Pattin, M., Lauricella, M. 1993. Chagas disease can be transmitted through kidney transplantation. *Transplant Proc.* Dec. **25(6)** pp. 3259-3260.
59. Figueiredo, J.F., Fiorillo, A.M., Ferraz, A.S. 1993. Longitudinal study of the indirect immunofluorescence and complement fixation test for diagnosis of Chagas disease in Immunosuppressed patients submitted to renal transplantation. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop. (Brazil)* Oct-Dec. **26(4)** pp.211-214.
60. Andrade, Z.A. 1991. Pathogenesis of Chagas disease. *Res. Immunol.* Feb. **142(2)** pp. 126-129.
61. Hontebeyrie-Joskowicz, M. Immunoregulatory mechanisms and Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Brazil)* **87** Suppl 5, pp. 101-103.
62. Celentano, A.M, Gonzalez Cappa, S.M. 1993. *In vivo* macrophage function in experimental infection with *T. cruzi* subpopulations. *Acta Trop. (Brasil)* Nov. **55(3)** pp. 171-180.
63. Kuhn, R E. 1994. Macrophages in experimental Chagas disease. *Immunol. Ser.* **60** pp. 495-502.

64. Velqe, P., Kisnierz, J.P., Ouaisi, A., Marty, B., Pham, B.N., Capron, A. 1991. *T. cruzi*: Infection of T. lymphocytes and their destruction by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol Sep.* **21(9)** pp. 2145-2152.
65. Romaña, C. 1935. Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral (hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). *Public. MEPRA 22:* pp. 16-28.
66. Spina-Franca, A., Livramento, J.A., Machado, L.R., Yasuda, N. 1988. *Trypanosoma cruzi* antibodies in the cerebrospinal fluid: a search using complement fixation and immunofluorescence reactions. *Arq. neuropsiquiatr. (Brazil) Dec.* **46(4)** pp. 374-378.
67. Ferreira, M.S., Nishioka S de, A., Rocha, A., Silva, A.M., Ferreira, R.G., Olivier, W. 1991. Acute fatal *T. cruzi* meningoencephalitis in a human immunodeficiency virus-positive hemophilic patient. *Am. J. Trop. Med. Hyg. Dec.* **45(6)** pp. 723-727.
68. Rosemberg, S., Chaves, C.J., Higuchi, M.L., Lopes, M.B., Castro, L.M., Machado, L.R. 1992. Fatal meningoencephalitis caused by reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with AIDS. *Neurology. Mar.* **42(3 pt 1)** pp. 640-642.
69. Rocha, A., Ferreira, M.S., Nishioka, S.A., Silva, A.M., Burgarelli, M.K., Silva, M., Moura, L.P., Ugrinovich, R., Raffin, C.N. 1993. *T. cruzi* meningoencephalitis and myocarditis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo (Brazil) Mar-Apr.* **35(2)** pp. 205-208.
70. Biagi, F. y Arce, G. 1965. Los dos primeros casos de miocardiopatía chagásica comprobados en México. *Arch. Inst. Cardiol. Méx.* **35.** pp. 611-623.

71. Reyes, P., Mendoza, M., Marcushamer, M. 1983. Miocardiopatía congestiva y tripanosomiasis americana. Rev. Invest. Sal. Públ. (Méx) 2: p. 139.
72. Rodas, A., Toro, S., Ramos, A., Monteon, V.M., Reyes, P.A. 1992. The incidence of *T. cruzi* antibodies in patients with dilated myocardopathy at the Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Arch. Inst. Cardiol. (México) Nov-Dec. **62(6)** pp 541-545.
73. Schenone, H., Contreras, M.C., Sainmas, P., Sandoval, L., Pérez Olea, J., Rojas, A., Solís, F., Villarreal, F. 1993. Comparison of the frequency of electrocardiographic changes in grupo of apparently healthy persons with a positive serology for Chagas disease, for toxoplasmosis or for both parasitoses. Bol. Chil. Parasitol. (Chile) Jul-Dec. **48(3-4)** pp. 33-39.
74. Carrasco, H.A., Parada, H., Guerrero, L., Duque, M., Duran, D., Molina, C. 1994. Prognostic implications of clinical, electrocardiographic and hemodynamic findings in chronic Chagas disease. Int. J. Cardiol. Jan. **43(1)** pp. 27-38.
75. Hontebeyvie-Joskowicz, M., Minoprio, P. 1991. Chagas disease: *Trypanosoma cruzi* vs the host immune system. Res. Immunol. Feb. **142(2)** pp. 125-126.
76. Control of Chagas disease. 1991. Report of a Who Expert Committee. World Health Organ. Tech. Rep. Ser. **811** p. 1-95.
77. Ferreira, H. de O. 1990. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benzonidazol. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. (Brazil) Oct-Dec. **23(4)** pp. 209-211.

78. Mester, B., Claramunt, R.M., Elguero, J., Atienza, J., Gómez Barrio, A., Escario, J.A. 1991. Research for new antichagasic drugs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* Aug. **39(8)** pp.1990-1993.
79. Van Voorhis, W.C. 1990. Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. *Drugs*. Aug. **40(2)** pp. 176-202.
80. Rottenberg, M.E., Cardoni, R.L., Sinagra, A., Riarte, A., Rodríguez Nautas, I., Lauricella, M., Segura, E.L. 1991. *Trypanosoma cruzi*: T-cell-dependent mechanisms of resistance during chronic infection. *Exp. Parasitol.* Aug. **73(2)** pp.127-136.
81. Velasco Castrejón, O., Valdespino, J.L., Tapia-Canyer, R., Salvatierra, B., Guzmán Bracho, C. 1992. Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. *Sal. Púb. Méx.* Mar-Abr. **34(2)** pp. 186-195.
82. Salazar S, P.M., Castrejón, J., Rodríguez, H., y Tay, J. 1979. Tercer caso comprobado de miocarditis chagásica crónica en México. *La Prensa Med. Méx.* **44(5-6)**. pp. 115-120.
83. Díaz, J.C. 1987. Chagas Disease. *Parasitology Today* **3**: pp.336-341.
84. Zicker, F., Netto, J.C., Zicker, E.M. 1990. *T. cruzi* infection and electrocardiographic findings among active manual workers. A population-based study in control Brazil. *Inst. J. Epidemiol.* March **19(1)** p.182-186.
85. Caeiro Iosa, D. 1994. Chronic Chagas disease: possible mechanism of sinus bradycardia. *Can. J. Cardiol.* Sep. **10(7)** p. 765-768.

86. Dávila, D.F., Donis, J.H., Torres, A., Gottberg, C.F., Bellabarba, G., Holzaker, G., Barrios, R., Ramoni, P. 1994. Apical left ventricular aneurysms and cardiac parasympathetic innervation in Chagas heart disease. *Med Hypotheses (England)* Jan. **42(1)** p. 53-56.
87. Castro, C., de Rezende, J.M., Camargo, M., Prata, A., Macedo, V. 1987. Prevalence of Chagas esophagopathy in the municipality of Mambai, Goiás-Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop. (Brazil)* Jan-Mar. **20(1)** p. 13-17.
88. Corsi, P.R., Cretella, C.M., Gagliardi, D., Viana A de T., Fava, J. 1992. Incidencia de megacolon sintomático em portadores de megaesofago chagásico. *Rev. Assoc. Med. Bras. (Brazil)* Jan-Mar. **38(1)** pp. 9-12.
89. Calderón, C. 1992. Estudios digestivo y cardiológico simultáneos en pacientes chagásicos asintomáticos. *Rev. Med. Chil. (Chile)* Jan. **120(1)** pp. 43-47.
90. Calderón C. 1992. Acalasia esofágica de origen chagásico: a propósito de un caso diagnosticado en etapa pre-sintomática. *Rev. Med. Chil. (Chile)* Dec. **120(12)** pp.1397-1399.
91. Guarnier, V. 1993. El esófago en la enfermedad de Chagas. *Rev. Gastroenterol. Mex.* Jan-Mar. **58(1)** pp. 11-12.
92. Stuprik, S., Chiocca, J.C., Solis, G.B., García, A. 1993. Are chagasic and idiopathic achalasia different? *Dig. Dis. Sci. Jul.* **38(7)** pp. 1358.

93. Meneses, A.C., Lopes, M.A., Rocha, A., Fatureto, M.C., Lopes, G.P., Lopes, G.R., Chapadeiro, E. 1989. Megacolon and Cancer. Cancer of the large intestine in chagasic patients with megacolon. *Arq. Gastroenterol. (Brazil)* Jan-Jun **26(1-2)** pp. 13-16.
94. Kobayasi, S., Mendes, E.F., Rodriguez, M.A., Franco, M.F. 1992. Toxic dilatation of the colon in Chagas disease. *Br. J. Surg. (England)* Nov. **79(11)** pp. 1202-1203.
95. Cutait, D.E., Cutait, R. 1991. Surgery of chagasic megacolon. *World J. Surg.* Mar-Apr. **15(2)** pp.188-197.
96. Pinotti, H.W., Habr-Gama, A., Ceconello, I., Felix, U.N., Zilberstein, B. 1993. The surgical treatment of megaesophagus and megacolon. *Dig. Dis. (Switzerland)* Jul-Oct. **11(4-5)** pp. 206-215.
97. Barbosa, A.J., Queiroz, D.M., Nogueira, A.M., Roquette Reis, M.J., Mendes, E.N., Rocha, G.A., Romanello, L.M., Troncon, L.E. 1993. Chronic gastritis and *Helicobacter pylori* in digestive form of Chagas disease. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo (Brazil)* Mar-Apr. **35(2)** pp. 117-121.
98. Pinotti, H.W., Felix, U.N., Zilberstein, B., Ceconello, I. 1991. Surgical complications of Chagas disease: megaesophagus, achalasia of the pylorus and cholelithiasis. *World J. Surg. (United States)* Mar-Apr. **15(2)** pp. 198-204.
99. Thambo, S., Passalacqua, W., Van Canwelaert, R., Lazcano, F. 1989. Enfermedad de Chagas en transplantados renales. *Rev. Med. Chil. (Chile)* Jan. **117(1)** pp. 18-22.
100. Andrade, S.G., Magalhaes, J.B., Pontes, A.L. 1989. Therapy of the chronic phase of the experimental infection by *T. cruzi* with benzonidazole and infurtimeox. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop. (Brazil)* Jul-Sep. **22(3)** pp. 113-118.

101. Tanowitz, H.B., Morris, S.A., Weiss, L.M., Bilezikian, J.P., Factor, S.M., Wittner, M. 1989. Effect of verapamil on the development of chronic experimental Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Dec. **41(6)** pp. 643-649.
102. Gallerano, R.H., Marr, J.J., Sosa, R.R. 1990. Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Aug. **43(2)** pp. 159-166.
103. Campos, R., Amato Neto, V., Moreira, A.A., de Souza, H.B., Okumura, M., Pinto, P.L., Braz, L.M., Silva, M.F., Matsubara, L. 1992. Avaliacao da atividade terapeutica do fluconazol na infeccao aguda experimental, pelo *T. cruzi*. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo (Brazil)* Jul-Aug **47(4)** pp. 174-175.
104. Blandon, R., Johnson, C.M., Sousa, O., Leandro, I. 1993. The clinical experience in Panama with metronidazole in treating Chagas disease in the acute and chronic phases. *Rev. Med. Panama* May **18(2)** pp. 94-100.
105. Brener, Z., Cancado, J.R., Galvoo, C.M., da Luz, Z.M., Filardi L de S. 1993. An experimental and clinical assay with Ketoconazole in the treatment of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Brazil)* Jan-Mar. **88(1)** pp. 149-153.
106. Brener, Z. 1980. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.* **18**: pp. 247-292.
107. Trischmann, T.M., Tanowitz, H., Wittner, M. 1978. *Trypanosoma cruzi*: Role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* **45**: pp. 160-168.
108. Mitchell, G.F. 1987. Injection vs infection: The cellular immunology of parasitism. *Parasitol. Today* **3**: pp. 106-109.

109. D' Imperio, L.M.R., Joskowicz, M., Coutinho, A., Kipnis, T. 1985. Very large and isotypical polyclonal plaque forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Immunology*. **15**: pp. 201-203.
110. Minoprio, P.M., Eisen, H., Forni, L., D' Imperio, L., Joskowicz, M., Coutinho, A. 1986. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T and B cell responses. *Scand J. Immunol.* **24**: pp. 661-668.
111. Smith, K.A. 1984. Interleukin 2. *Ann. Rev. Immunol.* **2**: 319-333.
112. Rottenberg, M.E., Lindquist, C., Koman, A., Segura, E.L. 1989. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection modulates both interleukin 2 production. *Scand. J. Immunol.* **30**: pp. 65-73.
113. Sonnenfeld, G., Kierszenbaum, F. 1981. Increased serum levels of an interferon like activity during the acute period of experimental infection with different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**: pp. 1189-1191.
114. Teixeira, A.R.L., Teixeira, G., Macedo, V., Prata, A. 1978. Acquired cell mediated immunodepression in acute chagas disease. *J. Clin. Invest.* **62**: 1132-1141.
115. Choromansky, L., Kuhn, R. 1985. Interleukin 2 enhances specific and non specific immune responses in experimental Chagas disease. *Infect. Immunol.* **50**: pp. 334-357.
116. Blota, M.H.S., Curotto, M.A., Abrahamsohn, I. 1986. Specific suppression of delayed hipersensitivity to *Trypanosoma cruzi* in mice. *Parasite Immunol.* **8**: pp. 651-661.
117. Ramos, C., Schadtler-Simon, I., Ortiz-Ortiz, L. 1979. Supressor cells present in the spleens of *Trypanosoma cruzi* infected mice. *J. Immunol.* **122**: pp. 1243-1247.

118. Tarleton, R. 1988. *Trypanosoma cruzi* induced suppression of IL-2 production. I.- Evidence for the presence of IL-2 producing cells. *J. Immunol.* **140**: pp. 2763-2768.
119. Corsini, A.C., Costa, M.G., Oliveira, O.L.P., Camargo, I.J. 1980. A fraction (FAD) from *T. cruzi* epimastigotes depress the immune response in mice. *Immunology* **40**: pp. 505-511.
120. Serrano, L.E., O'Daly, J.A. 1987. Protein fraction from *T. cruzi* infected spleen cell supernatans with immunosuppressive activity *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* **17**: pp. 851-861.
121. Harel-Bellan, A., Joskowiez, M., Fradelizi, D. 1985. T-lymphocyte function during experimental Chagas disease: production of and response to interleukin 2. *Eur. J. Immunol.* **1**: pp. 438-442.
122. Kierszenbaum, F., Cuna W.R., Beltz, L., Sztejn, 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 components. *J. Immunol.* **143**: 275-279.
123. Lalonde, R.G., Ali-Khan, Z. 1985. *T. cruzi* regulation of mitogenic responses in genetically resistant and susceptible inbred strains. *Exp. Parasitol.* **59**: pp. 33-43.
124. Guereiro, C., Machado, A. 1913. Da reacão de Bordet e Gengou na molestia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil Med.* **27**: pp. 225-226.
125. Hofflin, J.M., Sodler, R.H., Araujo, F.G., Page, W.E. 1987. Laboratory acquired Chagas disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: pp. 437-440.
126. Cunningham, D.S., Grol, M., Kuhn, R.E. 1980. Suppression of antibody responses in humans infected with *T. cruzi* infect. *Immunol.* **30**: pp. 496-499.

127. Tanomitz, H., Minato, N., Lalonde, R. 1981. *T. cruzi* correlation of resistance and susceptibility in infected mice with the *in vitro* primary antibody response to sheep red blood cells. *Exp. Parasitol.* **52**: pp. 233-242.
128. Reed, S.G., Inverso, J.A. 1984. Suppressed antibody responses to sheep erythrocytes in mice chronic *T. cruzi* infections are restored with interleukin 2. *J. Immunol.* **133**: pp. 333-337.
129. Tarleton, R.L., Kuhn, R.E. 1984. Restoration of *in vitro* immune responses of spleen cells from mice infected with *T. cruzi* by supernatants containing interleukin 2. *J. Immunol.* **133**: pp. 1570-1575.
130. Rottenberg, M.E., Cardoni, R.L., de Titto, E.H. 1988. *Trypanosoma cruzi*: Immune response in mice immunized with parasite antigens. *Exp. Parasitol.* **65**: pp. 101-108.
131. Scott, M.T., Bahe, G., Moddaber, F. 1984. Adjuvant requirement for protective immunization of mice using a *T. cruzi* 90 K cell surface glycoprotein. *Int. Arch. All. Appl. Immunol.* **74**: pp. 373-377.
132. de Titto, E.H., Segura, E.L., Braun, M. 1983. Cellular immunity in Chagas disease patients. Lymphoproliferative response to subcellular fractions of *T. cruzi*. *Immunol. Let.* **6**: pp. 161-167.
133. Mosca, W., Plaja, J. 1981. Delayed hypersensitivity to heart antigens in Chagas disease as measured by *in vitro* lymphocyte stimulation. *J. Clin. Microbiol.* **14**: pp. 1-5.
134. Tschudi, E.L., Anziano, D.F., Dalmasso, A.P. 1972. Lymphocyte transformation in Chagas disease. *Infect. Immun.* **6**: pp. 905-908.

135. Leitchuck, R., Patrucco, A., Manni, J.A. 1974, Studies of cellular immunity in Chagas disease: effect of glutaraldehyde treated specific antigen on inhibition of leukocyte migration. *J. Immunol.* **112**: 1578-1581.
136. Patrucco, A., Cerisola, J.A., Michel, M., Chiale, P., Alvarez, M., Segura, E.L. 1978. Flagellar antigens and the lymphocyte migration inhibition test in Chagas disease patients. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72d**: pp. 425-426.
137. Nogueira, N., Chaplan, S., Reesnik, M. 1982. *T. cruzi*: induction of microbicidal activity in human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* **128**: pp. 2142-2146.
138. Montufar, O.M., Musatti, C.C., Mendes, E. 1977. Cellular immunity in chronic Chagas disease. *J. Clin. Microbiol.* **5**: pp. 401-404.
139. Nogueira, N., Cohn, Z. 1977. *Trypanosoma cruzi* uptake and intracellular fate in normal and activated macrophages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**: pp. 194-203.
140. Nogueira, N., Ellis, C.J., Chaplan, S., Cohn, Z. 1981. *Trypanosoma cruzi*: *In vivo* and *in vitro* correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* **51**: pp. 325-332.
141. Kelly, J.M. 1986. The role of interferons in parasitic protozoan infections. *Parasitol Today.* **2**: pp. 173-174.
142. Wirth, J., Kierszenbaum, F., Sonnenfeld, G. 1985. Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association and killing of *T. cruzi*. *Infect. Immunol.* **49**: pp. 61-66.

143. Plata, F., García Ponds, F., Wietzerbin, J. 1987. Immune resistance to *T. cruzi* synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma *in vivo*. *Ann Inst. Pasteur Immunol.* **138**: pp. 397-415.
144. Osuna, A., Ortega, G., Gamarro, F., Ruiz-Perez, L. 1986. Effects of interferon on the infectivity of *T. cruzi* in cultured Hela-cells. *Int. J. Parasitol.* **15**: pp. 167-170.
145. Reyes, L., Chinchilla, M. 1987. Growth inhibition of *T. cruzi* in cultured murine myocardial cells mediated by a specifically induced lymphokine. *Infect. Immunol.* **55**: pp. 1513-1516.
146. Reed, S.G. 1988. *In vivo* administration of recombinant gamma interferon induces macrophage activation and prevents acute disease, immune suppression and death in experimental *T. cruzi* infections. *J. Immunol.* **140**: pp. 4342-4347.
147. Minoprio, P., Itohara, S., Hensser, C., Tonegama, S. 1989. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: The predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCR1 T cells. *Immunol. Rev.* **112**: pp. 183-207.
148. de Titto, E.H., Catterall, J.R., Remington, J.S. 1986. Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *T. cruzi*. *J. Immunol.* **137**: pp. 1342-1345.
149. Corsini, A.C., Braz, R., Ciampi, D.B. 1982. Resistance to *T. cruzi* infection in relation to the timing of IgG humoral response. *Z. Parasitenk.* **68**: pp. 15-25.
150. Rodriguez, A.M., Santoro, F., Afchain, D., Bazin, H., Capron, A. 1981. *T. cruzi* infection in B cell deficient rats. *Infect. Immun.* **31**: pp. 524-529.

151. Trischmann, T. M. 1984. Role of cellular immunity in protection against *T. cruzi* in mice. *Parasite Immunol.* **6**: 561-570.
152. Kierszenbaum, F. 1980. Protection of congenitally athymic mice against *T. cruzi* by passive antibody transfer. *J. Parasitol.* **66**: pp. 673-675.
153. Kagan, I.G., Norman, L. 1962. Immunological studies on *T. cruzi* IV. Serial transfer of organisms from immune to nonimmune mice. *J. Parasitol.* **48**: 584-588.
154. González Cappa, S.M., Katzin, A.M. 1979. *Trypanosoma cruzi*. Actividad de inmunoseros de ratón sobre el estadio tripomastigote. *Medicina (Buenos Aires)* **39**: 187-192.
155. Krettl, A.V., Brener, Z. 1982. Resistance against *T. cruzi* associated to anti-living tripomastigote antibodies. *J. Immunol.* **128**: 2009-2012.
156. Olabuenaga, S., Rimaldi, M.T., Cardoni, R.L., Riera, N., Sánchez, R.A., Chiale, P. 1983. Actividad citotóxica de leucocitos de pacientes chagásicos crónicos contra *T. cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)* **43**: pp. 168-174.
157. Krettl, A.U., Cancodo, R., Brener, Z. 1982. Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in chagas disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**: pp. 334-340.
158. Dalmaso, A.F., Jravinen, J.E. 1980. Experimental Chagas disease in complement deficient mice and guinea pigs. *Infect. Immun.* **28**: pp. 434-440.

159. Kipnis, T.L., Kretzli, A.U. 1985. Transformation of trypomastigote forms of *T. cruzi* into activators of alternative complement pathway by immune IgG fragments. *Scand. J. Immunol.* **22**: pp. 217-226.
160. Umekita, L.F., Takehara, H.A. 1988. Role of the antibody Fc in the immune clearance of *T. cruzi*. *Immunol. Lett.* **17**: pp. 85-89.
161. Cardoni, R.L., Rimaldi, M.T. 1984. Antibody dependent cytotoxicity of human and mouse mononuclear cells against *T. cruzi* epimastigotes. *Cell Immunol.* **88**: 518-524.
162. Kierszenbaum, F., Hayes, M.M. 1980. Mechanisms of resistance against experimental *T. cruzi* infection. Requirements for cellular destruction of circulating forms of *T. cruzi* in human and murine *in vitro* systems. *Immunology* **40**: pp. 61-66.
163. Cardoni, R.L., Rimaldi, M.T., Esteva, M. 1986. Humoral antibody response in mice infected with *T. cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)* **46**: pp. 435-439.
164. Segura, E.L., Esteva, M., Quintana, C., Montoro, L.S. 1981. Infección con *T. cruzi* en ratones congénitamente atímicos. *Medicina (Buenos Aires)* **41**: pp. 328-332.
165. Burgess, D., Hanson, W.L. 1980. *Trypanosoma cruzi*: The T-cell dependence of the primary immune response and the effects of the depletion of T-cells and Ig-bearing cells on immunological memory. *Cell. Immunol.* **512**: pp. 176-186.
166. Mc Cabe, R.E., Remington, J.S., Araujo, F.G. 1985. *In vivo* and *in vitro* effects of cyclosporin A on *T. cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: pp. 861-865.

167. Cabeza Mekert, P.M., Chambó, J.G., Lagunes, R.P. 1988. Modification of the Pattern of infection and evolution of cardiopathy in experimental Chagas disease after treatment with immuno-suppressive and trypanocidal drugs. *Medicina (Buenos Aires)* **48**: pp. 7-11.
168. Kohl, S., Pickering, L.K. 1982. Reactivation of Chagas disease during therapy of acute lymphocytic leukaemia. *Cancer*. **50**: pp. 827-829.
169. Barousse, A.P., Costa, J.A., Eposto, H. 1980. Enfermedad de Chagas e inmunosupresión. *Medicina (Buenos Aires)* **40**(supl. 1) pp. 17-26.
170. Araujo, F.G. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Expression of antigens on the membrane surface of parasitized cells. *J. Immunol.* **135**: pp. 4149-4154.
171. Ribeiro Dos Santos, R., Hudson, L. 1980. *Trypanosoma cruzi*: Immunological consequences of parasite modifications of host cells. *Clin. Exp. Immunol.* **40**: pp. 36-41.
172. James, S.L., Kipnis, T., Sher, A. 1982. Enhanced resistance to *T. cruzi* in mice treated with an interferon inducer. *Infect. Immun.* **35**: pp. 588-593.
173. Rottenberg, M.E., de Titto, E., Cardoni, R., Segura, E. 1991. Respuesta inmune en la infección con *T. cruzi*. *Rev. Argentina de Microbiología.* **23**: pp. 101-121.
174. Acosta, A.M., Sadigurski, M. 1983. Anti-striated muscle antibody activity produced by *T. cruzi*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **172**: pp. 364-371.

175. Wood, J.N., Hudson, L., Jessell, T.M. 1982. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurons and *T. cruzi* parasites. *Nature* 296: pp. 34-38.
176. Molina, H.A., Milei, J. 1984. Chronic Chagas myocardiopathy. Demonstration of *in vivo* bound immunoglobulins in heart by immuno-peroxidase technique. *Cardiology*. 71: pp. 297-306.
177. Cossio, P.M., Casanova, M.B., Bellido, C., Arce, L., Storino, R. 1985. Autoimmune response against myocardial tissue in Chagas disease. *Medicina (Buenos Aires)* 45: pp. 643-648.
178. Gattas, C.R., Lima, M.T., Noriega, A.F. 1988. Do self heart-reactive cells expand in *T. cruzi* immune hosts? *Infect. Immun.* 56: pp. 1402-1405.
179. de Bracco, M.E., Sterin-Borda, L., Finiasz, M. 1986. Modification of the contractile activity of isolated atria by T4 lymphocytes from patients with Chagas disease: effect of soluble factors. *Int. J. Immunopharmac* 8: pp. 645-649.
180. Ruiz, A.M., Esteva, M., Cabeza Meckert, P., Lagunes, R.P., Segura, E.L. 1985. Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcellular fractions of *T. cruzi*. *Acta Tropica* 42: pp. 299-309.
181. de Titto, E.H., Moreno, M., Braun, M., Segura, E.L. 1987. Chagas disease: Humoral response to subcellular fractions of *T. cruzi* in symptomatic and asymptomatic patients. *Trop. Med. Parasitol.* 38: pp. 163-166.

182. de Titto, E.H., Braun, M., Lazzari, J.O., Segura, E.L. 1985. Cell mediated reactivity against human and *T. cruzi* antigens according to clinical status in Chagas disease patients. *Immunol. Let.* **9**: 249-254.
183. de Titto, E.H., Dasso, M., Esteva, M., Segura, E.L. 1989. Antígenos de *T. cruzi* reconocidos por anticuerpos IgG en la forma crónica de la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)* **49**: p. 468.
184. Murray, M., Trail, J.C., D'leleren, G.D. 1990. Trypanotolerance in cattle and prospects for the control of trypanosomiasis by selective breeding. *Rev. Sci. Tech. (France)* Jun **9(2)**: pp. 369-386.
185. Hajduk, S., Adler, B., Bertrand, K., Fearon, K., Hager, K., Hancock, K. 1992. Molecular biology of African trypanosomes: development of new strategies to combat an old disease. *Am. J. Med. Sci. Apr* **303(4)**: pp. 258-270.
186. Astorga, B., Weitz, J.C. 1990. Chagas disease an evaluation of serodiagnosis at blood banks in the endemic areas of Chile. *Rev. Med. Chil. (Chile)* Oct **118(10)**: pp. 116-118.
187. Carvallo, M.R., Krieyer, M.A., Almeida, E., Oelemann, W., Shikanai-Yassuda, M.A. 1993. Chagas disease diagnosis: evaluation of several test in blood bank screening. *Transfusion* Oct **33(10)**: pp. 830-834.
188. Knecher, L.M., Rojkin, L.F., Capriotti, G.A., Lorenzo, L.E. 1994. Chagas disease screening in blood bank employin enzyme immunoassay. *Int. J. Parasitol.* Apr **24(2)**: pp. 207-211.

189. Culbertson, J.T. 1938. Acquired Immunity in rats against *T. cruzi*. *Journal of Parasitology* **24**: pp. 83-90.
190. Ortiz-O, L., González, M.A., Lamoyi, E. 1975. A vaccination procedure against *Trypanosoma cruzi*. Infection in mice by nonspecific Immunization. *J. Immunol.* **114**: pp. 1424-1425.
191. Gonzalez, J., Araguth, M.F., Yoshida, N. 1991. Resistance to acute *T. cruzi* infection resulting from immunization of mice with a 90-kilodalton antigen from metacyclic trypomastigotes. *Infect. Immun. Mar* **59(3)**: pp. 863-867.
192. Lagrange, P.H. 1985. Future of vaccination: vaccines of the future. *Ann. Inst. Pasteur. Immunol.* **136D(3)** pp. 313-334.
193. Basombrio, MA., Arredes, H., Uncos Da. 1987. Field Trial of vaccination against American Trypanosomiasis (Chagas disease) in domestic guinea pig. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.* **37(1)**: pp. 57-62.
194. Steward, M.W., Howard, C.R. 1987. Synthetic Peptides: a next generation of vaccines? *Immunol Today* pp. 851-858.
195. Ovassi, A., Cornette, J., Taibi, A., Velae, P., Capron, A. 1988. Major surface Immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **83 Suppl 1(2-3)**: p. 502.
196. Biagi, F., Guzman, G., Navarrete, F., Tay, J. 1958. Enfermedad de Chagas en Tutuapan, Edo. de México. *Prensa Med. Mex.* **23**: pp. 463-465.

197. Bolaños de Mesa, H. 1962. Estado Actual de Tripanosomiasis Americana en Guatemala. Sal. Pub. de Mex. 4: pp. 211-213.
198. Evans, R. 1985. Control de las enfermedades infecciosas y descenso de la mortalidad en Venezuela. OPS Washington D.C.
199. Velasco Castrejón, O., Guzmán Bracho, C. 1986. Importance of Chagas disease in Mexico. Rev. Latinoam. Microbiol. (México) Jul-Sept 28(3) pp.275-283.
200. Nicolle, C. 1908. Culture du parasite du bouton d'Orient. Comp. Rend. Acad. Sci. Paris 146: pp. 842-843.
201. Novy, F.G y Mac Neal, W.J. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. J. Infect. Dis. 1: pp. 1-30.