



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: PRODUCCION DE
ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA EL AISLADO NINOA DE "Trypanosoma cruzi"
realizado por ALFREDO ALEJANDRO MARTINEZ PEÑALOZA
con número de cuenta 7950960-2 , pasante de la carrera de BIOLOGIA
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Cd. Universitaria, D.F. a 30 de noviembre de 1995.

Director de Tesis
Propietario Dra. BERTHA ESPINOZA GUTIERREZ

Propietario Dr. RAFAEL SAAVEDRA DURAN

Propietario M en C. AZUCENA HERROZ ZAMORANO

Suplente Dr. RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ

Suplente Dra. ALEJANDRA MARTINEZ PEÑALOZA

[Handwritten signatures and stamps]
 Director: *[Signature]*
 Propietario: *[Signature]*
 Propietario: *[Signature]*
 Suplente: *[Signature]*
 Suplente: *[Signature]*
 Consejo Departamental de Biología - 1996

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

Consejo Departamental de Biología

1996

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en su totalidad en el laboratorio de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, a quien agradezco la oportunidad que me dió para realizar este proyecto.

*...deveras disculpame pero es que siempre fui un mal ejemplo,
por lo que te pido que no me tengas nadita de fé. (Alf)*

a Mauricio y Alejandra, mis únicos fans.

a mis padres, por aguantarme.
a mis hermanas por tolerarme
a mis tíos por aceptarme

a Miriam por todo el cariño que me has dado, gracias.

Agradezco a las secretarías de la sección escolar de la facultad todo su apoyo y las porras de ánimo.

A los laboratoristas de biología por 15 años de convivencia a fuerzas.

Para mis compañeras de laboratorio Vicky, Norma, Normita, Vero, Chava, Alejandro, el tocayo.

A las del laboratorio "enemigo": Martha, Isabel, Carlita. en especial agradezco a Claudia Garay su amistad y sus protocolos.

A Mónica y Jorge "Larralde", a Chayo y Germán "Mancilla", a Marco "Saavedra", a Toño y Carlos "Ortiz-Ortiz", a Santiago "Hernández".

Agradezco en especial a Malena, David y Daniel por su ayuda en los trabajos de computación.

A los Carranclanes: Nestor, Olga, Cesar, Greco, Enrique, Laurita, Marce, Lupita, Rosenda, Vero, Mayra, Marco, Humberto.

Al Dr. Ricardo Rosales y al Dr. Alejandro García-Carrancá

Al Dr. Edmundo Lamoyi y al Dr. Raúl Mancilla

Agradezco de manera especial al Dr. Rafael Saavedra por sus recomendaciones.

INDICE

I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCION	4
II.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> , Características Generales, Clasificación y Posición Taxonómica.	
II.2. Ciclo de Vida.	6
II.3. Vectores.	8
II.4. Importancia de la Enfermedad de Chagas en México.	10
II.5. Enfermedad de Chagas. Principales Aspectos de Carácter Inmunológico.	11
II.6. Anticuerpos Monoclonales.	15
II.7. Antígenos de <i>T. cruzi</i> .	18
III. OBJETIVOS	31
IV. MATERIALES Y METODOS	32
IV.1. Producción de Anticuerpos Monoclonales.	
IV.1.a. Preparación de extractos antigénicos.	
IV.1.b. Protocolo de inmunización.	33
IV.1.c. Medios de cultivo.	34
IV.1.d. Protocolo de fusión.	35
IV.1.e. ELISA.	37
IV.1.f. Selección de hibridomas positivos y expansión	38
IV.1.g. ELISA para la determinación de isotipos.	38
IV.1.h. Clonación por dilución limitante.	39
IV.1.i. Producción de ascitis.	40
IV.1.j. Congelación de clonas.	41
IV.1.k. Purificación de anticuerpos.	41

IV.2. Caracterización del Antígeno Reconocido por los Anticuerpos Monoclonales.	42
IV.2.a. Western blot.	
IV.2.b. Tratamiento del antígeno con peryodato de sodio.	43
IV.2.c. Tratamiento del antígeno con proteasas.	44
V. RESULTADOS	45
V.1. Fusiones.	
V.2. Determinación del Peso Molecular del Antígeno Reconocido por los mAbs.	49
V.3. Purificación de Anticuerpos.	51
V.4. Identificación del Antígeno Reconocido por el Anticuerpo Monoclonal en Diferentes Aislados de <i>T. cruzi</i> .	53
V.5. Presencia del Antígeno de 40-45 kDa en otros Parásitos.	53
V.6. Detección del Antígeno de 40-45 kDa en Sobrenadante de Cultivo de <i>T. cruzi</i> .	56
V.7. Determinación del Antígeno de 40-45 kDa en Extracto de Tripomastigotes.	57
V.8. Determinación de la Naturaleza Química del Epítipo Reconocido por el Anticuerpo Monoclonal.	
V.8.a. Tratamiento del antígeno con peryodato de sodio.	57
V.8.b. Tratamiento del antígeno con proteasas.	60
VI. DISCUSION	62
VII. CONCLUSIONES	64
VIII. PERSPECTIVAS	66
IX. BIBLIOGRAFIA	68

I. RESUMEN

Con el fin de contribuir a la caracterización de los aislados mexicanos de *T. cruzi*, se buscaron antígenos de este parásito por medio de la técnica de anticuerpos monoclonales. De este modo, se obtuvo un anticuerpo monoclonal a partir de extracto total de epimastigotes del aislado Ninoa de *T. cruzi*. Este anticuerpo monoclonal es de la clase IgG1 y reconoce un antígeno de peso molecular aproximado de 40-45 kDa en extractos de epimastigotes de los aislados Ninoa y Querétaro. El anticuerpo monoclonal obtenido, no reconoce antígeno alguno en extractos de tripomastigotes del aislado Ninoa, ni en otros parásitos. Se pudo detectar el antígeno de 40-45 kDa en sobrenadante de un cultivo de epimastigotes del aislado Ninoa lo que indica que posiblemente esté siendo secretado al medio, además de que el determinante antigénico reconocido por el anticuerpo monoclonal es sensible al tratamiento con proteasas y no responde al tratamiento con peryodato de sodio por lo que probablemente el determinante antigénico sea una proteína.

II. INTRODUCCION

II.1. *Trypanosoma cruzi*, Características Generales, Clasificación y Posición Taxonómica.

Trypanosoma cruzi, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es conocido en la literatura como un protozoario hemoflagelado (Opperdoes, 1987), también llamado protozoario cinetoplástico, protozoario tripanosomátido o simplemente tripanosoma (Simpson, 1987). Pertenece a la familia Trypanosomatidae donde se agrupan, entre otros, los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* (Englund, Hajduk y Marini, 1982). Tan solo en estos dos últimos géneros se encuentran especies causantes de un buen número de enfermedades humanas importantes, entre las que se destacan la enfermedad del sueño en Africa tropical, la enfermedad de Chagas en América y las diferentes formas de Leishmaniasis en casi todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Molyneux y Ashford, 1983). En esta familia existen además una gran variedad de géneros que infectan no solo a los mamíferos sino también a aves, peces, anfibios, insectos (*Crithidia spp*) e incluso plantas (*Phytomonas*), sin contar a los de vida libre (*Proleptomonas*) (McGhee y Cosgrove, 1980). Los tripanosomas en general son digénicos debido a que durante su ciclo de vida presentan dos hospederos, casi siempre algún insecto y un mamífero, además de que puede haber formas intracelulares y extracelulares (Baker, 1982). *T. cruzi*, tiene una reproducción asexual, sin

embargo en algunos otros miembros del mismo género, como *T. brucei*, se ha observado reproducción sexual (Cross, 1990). Sobre la clasificación de los tripanosomas existe hasta la fecha una discusión no terminada. Por ejemplo, en cuanto a si el nombre del reino al que pertenecen los tripanosomas debe llamarse reino Protista o reino Protoctista. Este punto en cuestión, tiene como base la interpretación de que, si en este reino se agrupan eucariontes unicelulares, entonces es correcto el término Protista. Sin embargo, Margulis y Schwartz (1981) hacen la aclaración de que algunos organismos, agrupados en este reino, durante cierta etapa de su ciclo de vida muestran estructuras pluricelulares (por ejemplo: ciliados, euglenoides, crisófitos y diatomeas) por lo cual se les puede relacionar mejor bajo el término Protoctista. Fuera de las discusiones acerca de que si los tripanosomas forman parte de un reino verdadero o solo de un phylum (Protozoa) que forma parte de un reino más vasto, o la de como se debe llamar la clase a la que pertenecen (Zoomastigophorasida, Cinetoplastida o Zoomastigophorea), donde no parece haber mayor discusión es en los niveles taxonómicos inferiores, así tenemos que los tripanosomas se agrupan en:

familia: Trypanosomatidae,

género: *Trypanosoma*,

especie: *T. cruzi*.

En vista de lo anterior, se mencionan tres clasificaciones:

CLASIFICACION Y POSICION TAXONOMICA DE *Trypanosoma cruzi*

	McGhee y Cosgrove (1980)	Levine y col. (1980)	Margulis y Schwatz (1981)
Reino	Protista	Protista	Protoctista
subReino		Protozoa	
Phylum	Protozoa	Sarcomastigophora	Zoomastigina
subPhylum	Sarcomastigophora	Mastigophora	
superClase	Mastigophorasica		
Clase	Zoomastigophorasida	Zoomastigophorea	Kinetoplastida
Orden	Kinetoplastorida	Kinetoplastida	
subOrden		Trypanosomatina	
Familia	Trypanosomatidae	Trypanosomatidae	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>	<i>Trypanosoma</i>	<i>Trypanosoma</i>
Especie	<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i>

II.2. Ciclo de Vida.

Estadios: Los tripanosomas tienen una serie de estadios a lo largo de su ciclo de vida, los cuales se van a diferenciar principalmente por su estructura, aunque también hay la expresión diferencial de antígenos. El primero de estos estadios es el de tripomastigotes y tienen como características el cinetoplasto subterminal y posterior al núcleo. El flagelo, que sale desde el cinetoplasto, está adherido a todo lo largo del cuerpo por medio de una membrana ondulante, quedando libre en el extremo anterior. Los epimastigotes, por el contrario, tiene un aspecto fusiforme, con el cinetoplasto anterior al núcleo y el flagelo por tanto también anterior formando una membrana ondulante más pequeña. Otro estadio

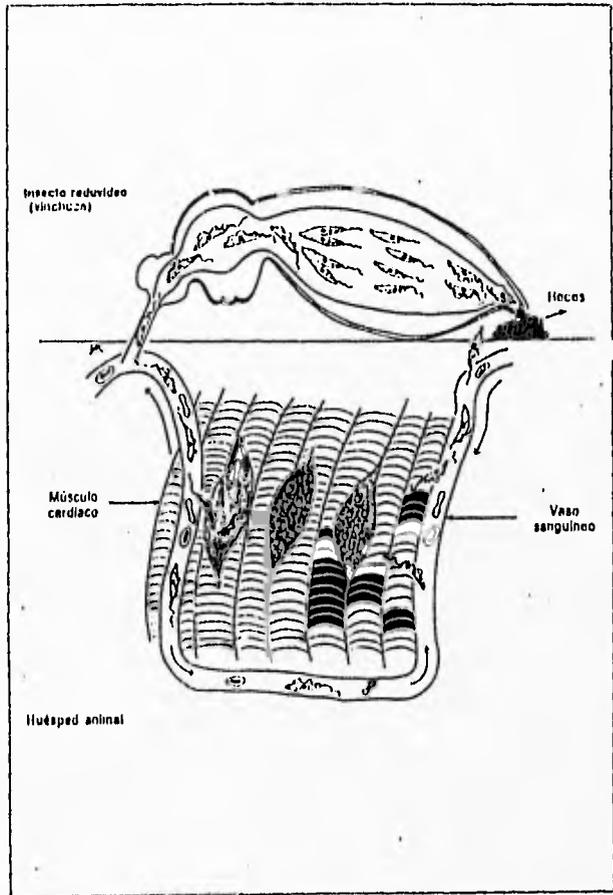
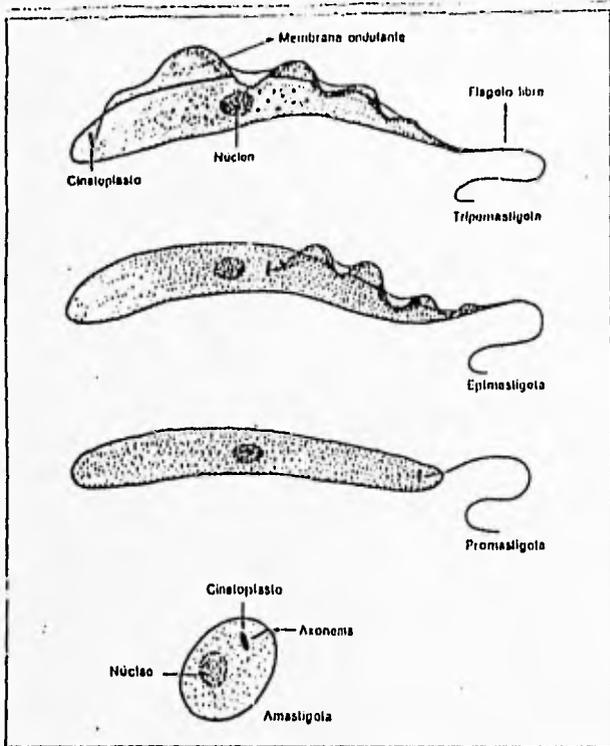
del tripanosoma, es una forma intermedia llamada promastigote, donde el cinetoplasto es anterior al núcleo, el flagelo no forma una membrana ondulante ya que abarca solo una porción del citoplasma para quedar libre en un extremo. Cuando los tripomastigotes invaden las células del huésped mamífero, se transforman en formas esféricas llamadas amastigotes (sin flagelo), las cuales se replican por división binaria y forman los llamados nidos de amastigotes.

Ciclo de Vida: Podemos considerar que este comienza cuando el tripanosoma se encuentra en el tracto digestivo del insecto, donde tiene la forma de epimastigote y a medida que avanza por el tracto digestivo del insecto se va transformando en una forma intermedia llamada promastigote. Ya en la parte final del tracto digestivo y a nivel del recto, tenemos la transformación a tripomastigotes metacíclicos. Estos últimos, representan la etapa infectiva del tripanosoma, y serán liberados en las heces del insecto cuando este pica al hospedero mamífero (Tay, 1980; Martínez y Gutiérrez, 1985). Los insectos hematófagos, tienen hábitos nocturnos y pican preferentemente las membranas mucosas de boca, nariz y ojos, al mismo tiempo que defecan, siendo esta la vía de entrada de los tripanosomas, los cuales también pueden entrar al cuerpo a través de cortes o heridas en la piel, por contacto directo de heces frescas que hayan contaminado utensilios diversos, por transmisión transplacentaria (Brabin, 1993), por transfusión sanguínea y por accidentes de laboratorio (Goldsmith *et al.*, 1978), de igual modo, se ha establecido la posible transmisión a través de vectores

mueertos (Asin y Catala, 1991). En el sitio de entrada de *T. cruzi* se produce una reacción inflamatoria debido a que han sido parasitados los tejidos y/o macrófagos. Las células parasitadas se lisan cuatro o cinco días después, liberando a los tripomastigotes que ahora tienen acceso a la circulación sanguínea y se diseminan a través del cuerpo. Cuando *T. cruzi* se encuentra dentro del hospedero mamífero, se dice que es un protozooario intracelular obligado ya que no puede replicarse extracelularmente. La mayoría de las células pueden ser parasitadas, sin embargo parece ser que existen cepas que muestran tropismo por músculo estriado, músculo liso y elementos neuroectodérmicos (Reyes et al., 1983; Velasco-Castrejón y Guzmán-Bracho, 1986). Una vez dentro de las células, los tripomastigotes se transforman en amastigotes y después de cuatro o cinco días, los amastigotes se empiezan a elongar para transformarse en tripomastigotes, los cuales son liberados de las células. Estos tripomastigotes pueden infectar otras células y/o ser ingeridos por el vector y así continuar el ciclo de vida (Brener, 1973). Esquema 1.

II.3. Vectores.

El insecto vector de *T. cruzi* es una chinche de la familia triatomidae, de la cual, los géneros *Triatoma*, *Rhodnius*, *Dipetalogaster*, *Paratriatoma*, *Panstrongylus*, *Belminus* y *Eratyrus*, se consideran como los transmisores más importantes, debido a que se han encontrado distribuidos en todos los estados de la



Ciclo de Vida de *T. cruzi*. Esquemas que muestran los diferentes estadios de *T. cruzi*, así como las diferentes fases de desarrollo en el vector y en el hospedero humano (Tomado de Zaman, 1979).

república, así como por la convivencia que tienen con el hombre. Es muy probable que debido a la falta de estudios epidemiológicos, existan más especies portadoras del parásito, así como una mayor distribución de los géneros reportados (Zavala-Velázquez, Rodríguez-López y Baqueiro-Díaz, 1975; Salazar *et al.*, 1983; Salazar *et al.*, 1988; Andersson *et al.*, 1990).

II.4. Importancia de la enfermedad de Chagas en México.

La distribución de la enfermedad de chagas en México se extiende a todo lo largo del país, lo que coincide con la distribución de los vectores. Hasta 1988 se consideraba que el 34% de la población rural en México podría estar infectada, lo que representaría unos 3 ó 4 millones de personas afectadas por esta enfermedad (Marsden, 1988). Según los reportes del número de casos en México, esta infección no tiene la misma magnitud que la que tiene en países como Brasil, Argentina o Venezuela, donde el porcentaje de la población afectada así como los padecimientos asociados, como son las visceromegalias y la mortandad, son mucho más elevados y severos que los que se han reportado en México (Reyes *et al.*, 1983; Andersson *et al.*, 1990). Es por tanto que se considera a México como integrante del grupo II, en lo que se refiere a la importancia que tiene, en países endémicos, la enfermedad de Chagas, siendo Argentina, Brasil y Venezuela, entre otros, los integrantes del grupo I, donde la enfermedad tiene una magnitud fundamental (OPS, 1990).

Cabe resaltar los esfuerzos que se están haciendo por caracterizar a los aislados mexicanos tanto a nivel molecular, expresión de isoenzimas y secuenciación de ADN (Ortega, 1980; Zavala-Castro, Velasco-Castrejón y Hernández, 1992) como de comportamiento, reproducción, infectividad y virulencia (López, 1994), donde se ha encontrado que, entre los aislados mexicanos, existe homogeneidad genética pero variabilidad biológica. Por lo anterior, es claro que en nuestro país la enfermedad pudiera tener características singulares según el aislado predominante en cada región, de tal modo que en regiones donde el aislado predominante sea virulento, la enfermedad de Chagas se manifestaría con mayor gravedad que en regiones donde los aislados no muestran tal virulencia. Este tipo de estudios, más los epidemiológicos, nos dirán si esta enfermedad debe ser considerada como problema de salud pública, o es solo una enfermedad marginal en México.

II.5. Enfermedad de Chagas. Principales Aspectos de Carácter Inmunológico.

La enfermedad de Chagas que se desarrolla en el humano presenta dos fases: la fase aguda y la fase crónica (Koberle, 1968). Estas dos fases se desarrollan también en ratones infectados con *T. cruzi*, lo que nos permite contar con un modelo adecuado para el estudio de esta infección (Albright y Albright, 1991). La fase aguda en humanos, por lo general no es fatal y tiene un período que abarca entre 2 y 4 meses (Petry y Eisen, 1989). Esta fase tiene

como parte primordial un fenómeno llamado inmunosupresión (Ramos, Schädler-Siwon y Ortiz-Ortiz, 1979), fenómeno que favorece la invasión así como la permanencia del parásito en el hospedero, de este modo es probable encontrar parásitos circulantes en el organismo infectado. Otro fenómeno que parece ocurrir en esta fase es el de la producción de anticuerpos de reacción cruzada, cuestión que lleva al desarrollo de la autoinmunidad (Hudson y Britten, 1985).

Los orígenes de la inmunosupresión en la fase aguda, son todavía muy confusos debido a la cantidad de datos encontrados sobre todo con respecto a los anticuerpos producidos contra el parásito e incluso contra otros antígenos (Tarleton y Kuhn, 1985; Szein y Kierszenbaum, 1993), sin embargo se conocen muchas de las manifestaciones que tienen que ver tanto con las células como con los productos de éstas que estarían implicadas en la inmunosupresión de la fase aguda. A pesar de que en esta fase se detectan parásitos circulantes en cantidades considerables, de que existen procesos inflamatorios, así como invasión de parásitos a algunas células, como por ejemplo los macrófagos, en esta etapa algunos investigadores reportan que no se genera una respuesta inmune efectiva ni contra el parásito ni contra otros antígenos como p.ej. polisacáridos y otras proteínas (Cerrone y Kuhn, 1991). En este sentido, células B extraídas de humanos o de ratones infectados con *T. cruzi* en fase aguda no responden a estímulos mitogénicos ni tampoco producen inmunoglobulinas (Cunningham et al., 1981; Kierszenbaum, Moretti y Szein, 1991). Sin embargo, por

otro lado, se ha encontrado que existe una proliferación masiva de células B, que por lo tanto es policlonal e inespecífica (Reed, Roters y Goidl, 1983). No se ha podido establecer el origen de esta activación policlonal inespecífica de las células B, pero se piensa que no es dependiente de algún efecto mitogénico, sino más bien es dependiente de células T, ya que se ha visto en otros modelos de infección por parásitos, como en el caso de la leishmaniasis, que al suprimir a los linfocitos T cooperadores (Th, por sus siglas en inglés) por medio de anticuerpos monoclonales (mAb) contra un marcador de éstas células Th llamado L3T4 (CD4), se logra eliminar también la activación de las células B (Locksley et al., 1993). Sobre la producción de anticuerpos en pacientes y ratones con Chagas, hay además un cierto predominio de los isotipos producidos, ya que se detectan principalmente anticuerpos de la clase IgG2 e IgG1 (D'Imperio, 1986). Con respecto a otras células y elementos del sistema inmune en esta etapa de la infección, se ha encontrado que, por ejemplo, linfocitos T extraídos de ratones o pacientes chagásicos no responden a los estímulos mitogénicos y/o a los antigénicos (Beltz, Sztein y Kierszenbaum, 1988; Milon y Louis, 1993). Así mismo, la expresión de una serie de receptores celulares también está suprimida, como es el caso de los complejos formados por receptores de células T-CD3, la expresión de moléculas CD4 y CD8, la expresión de receptores a IL-2 por linfocitos T y por células B. Así mismo, está suprimida la expresión de receptores de transferrina, como también lo está la producción misma de IL-2 (Harel-Bellan et al., 1983; Choromanski y Kuhn, 1985; Beltz,

Kierszenbaum y Sztein, 1989; Kierszenbaum et al., 1989; Sztein, Cuna y Kierszenbaum, 1990; Soong y Taleton, 1992). Por otro lado, se ha encontrado que existe un incremento de células formadoras de placa, tanto en bazo como en nódulos linfáticos (Reed, Roters y Goidl, 1983). Superada la fase aguda de la infección, los individuos infectados pueden permanecer asintomáticos durante años y en algunos casos manifestar diferentes tipos de visceromegalias (Velazco-Castrejón et al., 1991).

La etapa crónica de la infección con *T. cruzi* se caracteriza principalmente por un fenómeno llamado autoinmunidad, que es la producción de anticuerpos de reacción cruzada (Reed et al., 1990). Si bien este fenómeno también se puede encontrar en la fase aguda de la infección, es en la fase crónica donde se manifiesta más dramáticamente. Se han encontrado antígenos de *T. cruzi* que provocan reacción cruzada principalmente en sistema nervioso, tanto periférico como central, así como también en músculo esquelético y cardíaco, además de los que se encuentran en hígado y otros órganos (Koberle, 1968). Se ha podido demostrar por transferencia de células de bazo de ratones infectados a ratones sanos, que es posible provocar la patología crónica en estos últimos sin necesidad de infectarlos con parásitos. Esta patología autoinmune estaría siendo provocada, principalmente, por células Th (Minoprio et al., 1989).

De igual manera, se han encontrado auto-anticuerpos en pacientes con Chagas y en animales infectados experimentalmente con *T. cruzi*. Si bien hay reportes de que este mismo tipo de

anticuerpos de reacción cruzada se encuentran en otras enfermedades infecciosas, es posible que en Chagas esté más acentuada su participación, aunque no sean la causa primaria de la patología, ya que hay que recordar que la reacción cruzada no lleva directamente a la autoinmunidad. Aún no se conocen las causas últimas de lo que podría estar provocando esta autoinmunidad. Se considera que tiene relación con la producción policlonal inespecífica que comienza en la etapa aguda y se continúa en la fase crónica de la enfermedad, y que pudiera ser provocada por las citocinas producidas por macrófagos alterados por la infección de *T. cruzi* (Silva et al., 1992). Sin embargo, no se explica la gran cantidad de anticuerpos dirigidos contra tejidos del huésped, pero se piensa que pudieran ser provocados por un cierto mimetismo de los antígenos del parásito con los del hospedero (Schmunis, 1987).

II.6. Anticuerpos Monoclonales.

Desde que Köhler y Milstein en 1975 describieron la técnica de producción de mAbs, ésta se ha desarrollado de tal modo que ahora la producción de mAbs se ha convertido en una de las principales técnicas utilizadas para el aislamiento y análisis de material biológico diverso. Köhler y Milstein conjugaron algunos elementos fundamentales, por un lado, se sabía que una célula B solo producía anticuerpos específicos contra un solo determinante antigénico, esto es, las células B eran capaces de dividirse en forma monoclonal, ya que las descendientes de una de éstas van a producir

anticuerpos contra exactamente el mismo determinante antigénico (Burnet, 1957). Sin embargo, en el universo de la respuesta inmune, tratéese de humanos o ratones, no es nada sencillo aislar la célula B que produzca los anticuerpos contra el antígeno deseado. Aún si se pudiera lograr, tampoco es sencillo cultivar linfocitos B por tiempos muy largos, por lo que el cultivo se perdería a la larga. Esto representaba un gran problema, ya que no era posible utilizar en toda su potencialidad la especificidad de los anticuerpos para el estudio de diversos problemas biológicos.

Por otro lado, se sabía de la existencia de células B tumorales, que al aislarlas podían formar una clona en cultivo (Bazin et al., 1973), que si bien se podían dividir de manera inmortal, los anticuerpos que producían no tenían la especificidad requerida. Estas células transformadas llamadas mielomas son células secretoras de anticuerpos, su transformación se asocia con una translocación cromosómica entre el cromosoma quince, el cual contiene al oncogén c-myc, y el locus de la cadena pesada en el cromosoma doce. En otros casos la translocación se da entre el locus K del cromosoma seis en lugar del doce (Potter, 1972). Los mielomas más utilizados, como en el presente trabajo, son los llamados SP2/0 que provienen de otras líneas celulares originadas principalmente en ratones BALB/c y se pueden utilizar en la producción de hibridomas porque tienen la ventaja de que, además de ser compatibles con los ratones BALB/c, no producen ni secretan anticuerpos (Köhler y Milstein, 1975). Existían reportes del estudio de células policariontas (Rao y Johnson, 1970), las cuales

son células con más de un núcleo y que se podían obtener por diferentes métodos de fusión (Kennet, 1978). Y lo que era más importante, estas células eran viables (Poste, 1972). Los anticuerpos monoclonales, son producto de células B tumorales, de donde se obtiene la proliferación casi inmortal, y de las células B normales, de donde se obtiene la especificidad de los anticuerpos contra un solo determinante antigénico. A estas células fusionadas se les llama hibridomas.

Sin embargo la base mas importante en la producción de mAbs, fué el encontrar un medio de selección que permitiera discriminar a los hibridomas de las demás células, ya que cuando se hace la fusión quedan viables además de los hibridomas los mielomas, las células del ratón inmunizado mueren. La solución consistió en un medio de selección que funciona de la siguiente manera: los mielomas tienen una mutación en una de las enzimas de la ruta alterna de la biosíntesis de purinas, el gen de la hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). Si se les bloquea la ruta de la síntesis de nucleótidos de novo, que es la ruta normal con aminopterina (se pueden utilizar otros compuestos como el methotrexato o la azoserina), se les obliga a utilizar la ruta alterna, por lo tanto los mielomas mueren porque no tienen la enzima HGPRT. Los hibridomas tienen la ventaja de que la maquinaria genética de las células de ratón se integra a la de los mielomas compensando su deficiencia en la enzima HGPRT, de esta manera, aunque la ruta de novo este bloqueada por la aminopterina, la ruta alterna se vuelve funcional y los hibridomas pueden crecer. Cuando

se quita la aminopterina del medio, los hibridomas retoman la ruta normal. La hipoxantina y la timidina, se agregan porque la aminopterina bloquea la síntesis de novo de purinas y pirimidinas (Littlefield, 1964).

Una de las aplicaciones mas útiles de los mAbs, aparte de permitir la identificación y caracterización de antígenos, es la de poder aislar y purificar diversas proteínas, ya que el hecho de que los anticuerpos reconozcan y se unan específicamente a estas permite obtener, a partir de una mezcla compleja, determinada proteína.

II.7. Antígenos de *T. cruzi*.

El estudio de los antígenos (Ags) de estos parásitos es importante por las siguientes razones: 1) Para tener un panorama general de la composición antigénica del tripanosoma. Al respecto, el problema es que a pesar de que existe un gran número de moléculas antigénicas presentes en el parásito, estas se encuentran, en la mayoría de los casos, en una proporción relativamente baja. Otro problema aunado a éste es que por lo general, los antígenos predominantes están relacionados y codificados por diversas familias de genes multicopia, lo que trae como consecuencia la expresión de una serie de antígenos de características muy parecidas. 2) Para poder mejorar los métodos serológicos utilizados en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Esto es importante porque, por lo común, se utilizan

mezclas complejas de moléculas como base para la detección de anticuerpos, lo que generalmente provoca la obtención de resultados falsos positivos o falsos negativos. 3) Para entender de mejor manera las alteraciones de la respuesta inmunológica del hospedero, es necesario conocer tanto los antígenos solubles como los membranales del parásito que están actuando en la parte aguda de la infección, y sobre todo, conocer los que están involucrados en la patogénesis de la enfermedad crónica y que tienen que ver con las reacciones cruzadas. 4) Para la búsqueda de antígenos que puedan ser utilizados para inmunoprofilaxis; esto es, por ejemplo, ver si es posible bloquear ciertos antígenos por medio de algunos medicamentos. 5) Para entender los mecanismos que subyacen en la expresión genética de antígenos de superficie y otros. 6) Entender el papel que juegan los antígenos en la biología del parásito donde se incluirían entre otros, la transformación, infección, división y adaptación insecto-hospedero.

Existen varios problemas en el estudio de los antígenos de *T. cruzi*, como por ejemplo, no en todos los estadios del ciclo de vida se expresan los mismos antígenos, así mismo hay diferencias entre los antígenos que expresan las diferentes cepas (Frasch et al., 1991). Además, dependiendo de la técnica usada para la detección de los antígenos, se encontrarán unos, por cierta técnica, y otros por otra técnica, por ejemplo, un Ag. de 90 kDa encontrado en tripomastigotes y amastigotes, no se detecta en epimastigotes cuando se utiliza marcaje con ^{125}I (Lanar y Manning, 1984). Sin embargo otros autores reportan un Ag de peso similar en

epimastigotes cuando utilizan marcaje con ^{131}I (Zingales et al., 1982).

En esta parte de los antecedentes, se va a hacer una revisión de los Ags más importantes, y en vista que la mayoría pueden lo mismo servir, por ejemplo, para diagnóstico (por estar presentes en la mayoría de los aislados) además de estar presentes en todos los estadios del ciclo de vida del parásito y ser importantes en la infección, se van a agrupar tentativamente en:

1) Ags con importancia inmunológica:

1a) Los que presentan reacción cruzada con Ags del huésped.

1b) Los que son importantes en la infección.

1c) Los que se consideran importantes para diagnóstico.

2) Ags importantes en el ciclo de vida del parásito, así como específicos de estado.

1) Ags con importancia inmunológica.

1a) Antígenos de reacción cruzada.

Entre los Ags que provocan reacción cruzada se encuentra un determinante antigénico que se expresa en membranas de ciertas subpoblaciones de neuronas centrales y periféricas de mamífero y que es reconocido por un mAb de la clase IgM que también reconoce determinantes antigénicos de peso molecular (PM) de 50 a 100 kDa en extractos de epimastigotes y amastigotes (Wood et al., 1982). La importancia que tiene es debida a que en la enfermedad de Chagas se da una cierta degeneración neuronal, tanto periférica como central; se considera que esta neuropatía no es producida por la invasión

directa del parásito a estas células, sino que más bien es de carácter inmunológico (Brener, 1979).

Con respecto a las lesiones musculares que se dan en la patología de Chagas, se han encontrado Abs que muestran reacción cruzada con un Ag polipeptídico de 25 kDa de tripanosoma y contra tejido muscular. Cuando se prueba suero de pacientes chagásicos y suero de pacientes con distrofia muscular de Duchenne, se encuentra que una gran proporción de estos pacientes muestran títulos elevados de anticuerpos con actividad anti-sarcolema, al ser comparados con los individuos normales. Esto podría explicar la degeneración muscular que se manifiesta en la enfermedad de Chagas (Santos-Buch *et al.*, 1985).

Un importante antígeno de membrana es el que se ha denominado glicoproteína (gp) 50-55. Se ha encontrado hasta ahora sólo en *T. cruzi* (Hernández-Munáin *et al.*, 1991) y su importancia reside en dos aspectos: podría estar jugando un papel en el estadio intracelular del parásito como fuente de señales para mantener la infección y, por otro lado, se ha encontrado que mAbs contra este Ag reaccionan también con un antígeno de 28 kDa que se expresa en la gran mayoría de los linfocitos T y B activados de ratón. Además, estos mAbs que están dirigidos contra el Ag gp50-55, son capaces de suprimir la proliferación celular de linfocitos T y B, tanto de humano como de ratón, independientemente del estímulo. En base a estos resultados, se puede decir que los anticuerpos dirigidos

contra este antígeno estarían jugando el papel tanto de auto-anticuerpos, como de inmunosupresores (Hernández-Munáin *et al.*, 1992).

Una proteína del tripanosoma, relacionada con el complemento es una hemolisina secretada por el tripanosoma llamada TC-TOX, la cual se considera que ayuda al parásito a escapar de los fagosomas (vacuolas ácidas de las células infectadas) por medio de la formación de poros en la membrana. Además, esta proteína parasitaria de entre 60 y 75 kDa induce anticuerpos que reaccionan también con el componente C9 (alquilado y no alquilado) del complemento. Cuando se utilizan anticuerpos dirigidos contra C9, en un ensayo de inmunoblot, se puede apreciar la reacción cruzada de estos anticuerpos con sobrenadante de un cultivo de parásitos y C9 humano purificado. Esta reacción cruzada puede deberse a que existe una relativa homología (entre el 17 y 21%) en las secuencias peptídicas de las moléculas relacionadas con el ataque a membranas como son C7, C8, C9, la perforina de los granulocitos y la melitina del veneno de abeja, por lo que la hemolisina del tripanosoma puede tener también secuencias homólogas con C9 (Andrews *et al.*, 1990).

Una observación muy interesante es la de que en muchas enfermedades autoinmunes se han encontrado anticuerpos que se unen a epítopes cargados negativamente que se localizan en algunos componentes celulares, tales como en las enfermedades reumáticas humanas (Brendel *et al.*, 1991). Para el caso de la infección

crónica por tripanosoma en ratones, se han encontrado auto-anticuerpos que reaccionan con antígenos del parásito y también con una gran variedad de antígenos con epítopes cargados negativamente, ricos en aminoácidos ácidos, por ejemplo la tubulina. Estos auto-anticuerpos se encuentran de manera natural en ratones sanos donde se unen pobremente, mientras que los auto-anticuerpos provenientes de ratones infectados crónicamente muestran una afinidad mucho mayor por el antígeno (Kahn, Kahn y Eisen, 1992).

1b) Ags importantes en la infección.

Así como hay Ags que promueven supresión de la actividad de linfocitos, también se han encontrado los que la activan. Tal es el caso de la gp60, la cual predispone y activa linfocitos en ratón, también se ha visto que, cuando se bloquea a la gp60 con mAbs se promueve la destrucción de los parásitos por medio de macrófagos. Esta gp60, se encuentra solamente en la membrana de los tripomastigotes, y se piensa que por activar específicamente a los linfocitos podría tener efectos benéficos en la respuesta inmune del hospedero. Esta activación específica de linfocitos no tendría que ver con la activación policlonal típica de la patología de Chagas (Villalta et al., 1992).

El Ag-3F6, que es una glicoproteína de 82 kDa específica de estado, se ha localizado por medio de mAbs en la superficie de tripomastigotes metacíclicos de diferentes cepas. Se cree que promueve la entrada del parásito a la célula hospedera, ya que al

ser bloqueado con mAbs se inhibe la entrada de parásitos a la célula. Así mismo, el Ag-10D8, que es una gp de entre 35/50 kDa, también estaría participando en la invasión celular. Estos Ags no se localizan en tripomastigotes sanguíneos ni en tripomastigotes de cultivo, sólo en tripomastigotes metacíclicos (Ramírez et al., 1993).

El Ag soluble de fase aguda (SAPA) es una trans-sialidasa, es decir, una enzima que es capaz de transferir ácido siálico (azúcares ácidos) entre glicoconjugados del hospedero y el parásito. Interviene en la interacción del parásito con las células del huésped al momento de la invasión. Su peso molecular varía entre 120 y 240 kDa (Schenkman y Eichinger, 1993). Este Ag pertenece a una superfamilia de antígenos de superficie de *T. cruzi* que tienen en común un peso molecular aproximado de 85 kDa, donde se encuentran otros Ags como el SA85-1 (Kahn et al., 1991), que se unen a la membrana del tripomastigote por medio de anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Campetella et al., 1992).

Se han encontrado también dos Ags, uno de 60 y otro de 85 kDa, los cuales se unen a los receptores de penetrina y fibronectina respectivamente. Son importantes porque se considera que ambas proteínas son coadyuvantes en la unión y penetración del tripanosoma a macrófagos por medio de la unión a receptores de fibronectina (Fernández et al., 1993). El Ag de 85 kDa, es específico de tripomastigotes infectivos, y cuando es bloqueado con

mAbs, se inhibe la infección de las células del huésped (Pereira, 1988). Otro miembro de la familia de Ags de 85 kDa, es el llamado Tc-85 (Katzin y Coli, 1983). Este Ag es una gp localizada en la membrana de tripomastigotes y está implicado en la penetración del parásito a las células del huésped. Se ha podido establecer su diferencia con las otras gp85 por medio de análisis de su composición estructural (Couto et al., 1987).

Otro Ag que tiene relación con la gp85 es uno de 160-200 kDa y que se encuentra principalmente en la membrana de los tripomastigotes infectivos. Se ha encontrado que tiene actividad como neuroaminidasa, y lo más significativo es que ejerce un control negativo sobre la infección, esto es, si se bloquea con mAbs o con HDL (lipoproteína de alta densidad) se amplifica la infección (Prioli, Mejia y Pereira, 1990). Se piensa que el tripanosoma ejerce funciones tanto positivas como negativas durante la infección, ya que los tripanosomas que expresan la actividad de neuroaminidasa tienen bajos niveles de la gp85, y los que expresan baja actividad de neuroaminidasa tienen niveles altos de gp85 (Pereira y Hoff, 1986).

Un antígeno de entre 87 y 93 kDa, al cual se le ha llamado T-DAF (Factor que acelera el decaimiento de la C3 convertasa en tripomastigotes), es una gp presente en la superficie del tripomastigote; al parecer, su principal función es la de inhibir la activación del complemento. Al inhibir este Ag con mAbs se logra

inducir la lisis del parásito. Este T-DAF, podría estar relacionado con otros dos Ags, la gp160 y la gp58-68 las cuales bloquean el ensamblaje de la convertasa C3 de la ruta alternativa del complemento (Tambourgi et al., 1993).

Por otro lado, cuando se utilizan mAbs, como el llamado 10D8, en contra de un epítotope de carbohidratos de entre 35 y 50 kDa situado en la membrana de tripomastigotes metacíclicos, se logra inhibir entre un 50 y 67% la infección *in vitro* de células Vero. Se considera que estos glicoconjugados estarían jugando un papel importante en la asociación de los tripomastigotes metacíclicos con las células del hospedero al iniciarse la infección. (Yoshida et al., 1989). Otro Ag que podría estar involucrado en la asociación y penetración de tripomastigotes infectivos, es el de 90 kDa. Este, es un polipéptido de superficie específico de tripomastigotes metacíclicos, el cual fue identificado por medio del mAb 1G7, y es capaz de reducir la infectividad en ratones, así como de reducir la adhesión y penetración de tripomastigotes metacíclicos en células Vero (Teixeira y Yoshida, 1986).

El Ag Tc45, el cual es un polipéptido de 45 kDa, parece estar presente en el citoplasma del tripanosoma. Este Ag, que se encuentra tanto en epimastigotes como en tripomastigotes, es reconocido por anticuerpos de ratones de la cepa A.SW inmunizados con extractos o cuando son infectados con *T. cruzi*. Sin embargo, otra cepa de ratones, la A.CA, no es capaz de reconocer este

antígeno, lo que nos está hablando del control que ejercen los genes en la respuesta inmune, ya que estas dos cepas son congénicas para el complejo mayor de histocompatibilidad H-2. Los ratones A.SW sobreviven a la etapa aguda de la infección, mientras que los de la cepa A.CA, mueren a los 12 días de la infección (Ramos *et al.*, 1991).

1c) Antígenos importantes para el diagnóstico.

Un antígeno que podría servir en el serodiagnóstico en la enfermedad de Chagas, es el llamado A13. Este Ag tiene un peso aproximado de 230 kDa y se han encontrado anticuerpos IgA e IgM contra este Ag en el suero de pacientes chagásicos, tanto en la fase crónica como en la aguda, así como también en pacientes con Chagas congénito, pero no se han encontrado en el suero de pacientes con leishmaniasis u otras enfermedades parasitarias. Este Ag se ha localizado en la membrana de amastigotes y tripomastigotes de algunas cepas de tripanosoma, sin haberse encontrado en epimastigotes. Sin embargo, el que el antígeno sea localizado en todas las etapas de la enfermedad de Chagas, además de que no tenga reacción cruzada con el suero de pacientes con otras enfermedades parasitarias, junto con el hecho de que se localiza en las formas que parasitan al hombre, lo hace un buen candidato para el serodiagnóstico (Paranhos *et al.*, 1990).

También se ha encontrado un Ag de superficie específico de amastigotes de entre 70 y 84 kDa, que es importante por dos

razones. Primero porque la mayoría de los antígenos utilizados en diagnóstico se encuentran a partir de extractos de epimastigotes, los cuales no son muy representativos de la fase infectiva del parásito. En segundo lugar, porque es un antígeno que tiene reacción con anticuerpos de suero de pacientes con leishmaniasis, lo que nos muestra lo complicado que es encontrar Ags que sean específicos para *T. cruzi*. Este antígeno fue reconocido por el 100% de los sueros de pacientes en la etapa aguda y crónica de la enfermedad de Chagas, pero no por pacientes sanos (Matsumoto et al., 1993).

2) Antígenos importantes en el ciclo de vida y específicos de estado.

T. cruzi es un parásito que pasa de un insecto vector, donde la temperatura es de aproximadamente 25°C, a un mamífero hospedero, donde la temperatura es de 37°C. Esto implica que el tripanosoma debe de contar con mecanismos que atenúen este cambio de temperatura. Se han encontrado en el tripanosoma Ags que funcionan como proteínas de choque térmico (hsp). Entre estas tenemos a la hsp70, la cual está formada en realidad por una serie de isoformas relacionadas. Algunas de éstas se expresan constitutivamente a 28 °C pero a medida que aumenta la temperatura también se incrementa la expresión de estas proteínas y se suprime la expresión de otras (Requena et al., 1992).

Otra proteína de interés es la gp72, que es un antígeno de

superficie que se expresa en epimastigotes y en tripomastigotes metacíclicos. Se ha podido caracterizar el gen que codifica para esta gp72, y de esta manera estudiar la función que tiene en el ciclo de vida del parásito. Al mutar el gen que codifica para la gp72 (Cooper, Ribeiro de Jesús y Cross, 1993) por medio de mutagénesis dirigida y por tanto evitar su expresión, se afecta la morfología del parásito en algunos estadios del ciclo de vida, provocando que el flagelo esté separado de la membrana en epimastigotes y reduciendo de manera muy significativa la sobrevivencia de los epimastigotes en el vector. Sin embargo, esta mutación no interfiere ni en la capacidad de infección, ni en la resistencia al complemento o la expresión de sialidasas de tripomastigotes aun cuando el fenotipo anormal persiste en este estadio. Tampoco es impedimento para la propagación del parásito dentro de las células del hospedero (Ribeiro de Jesús et al., 1993). Otro punto importante de este trabajo es, como a partir de la purificación de un antígeno, se puede obtener el gen, que al ser modificado, nos permite estudiar con mayor detalle la función del antígeno.

La gp57-51, forma parte de una familia de proteinasas, específicamente de las proteinasas de cisteína, entre las que se encuentra la cruzipaina, con la que se encuentra estrechamente relacionada. Cuando se bloquea *in vitro* a la gp57-51, los tripanosomas no pueden desarrollarse intracelularmente, por lo que se piensa que esta proteinasa controla funciones clave del

metabolismo de los tripanosomas (Lima et al., 1992).

Por otro lado, se ha reportado la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un antígeno de 90 kDa que se encuentra presente en la superficie de tripomastigotes sanguíneos y que parece ser específico de este estadio. Sin embargo, se ha encontrado sólo en algunas cepas de *T. cruzi*. En algunas otras cepas del tripanosoma, este mAb reconoce proteínas de 105 kDa y 130 kDa. Cuando se aisló el gen de esta proteína antigénica se encontró que existían aproximadamente 20 copias del gen que codifica el Ag 90 kDa. Las diferencias de peso molecular que se encuentran en las distintas cepas de tripanosoma se cree que son debidas a modificaciones pos-transcripcionales o a la expresión diferencial de las copias de este gen. Este es un ejemplo de las dificultades que se tienen en la búsqueda de antígenos de *T. cruzi*. Se puede encontrar en determinada cepa un antígeno con determinado peso molecular, pero en otras cepas este mismo antígeno tendrá otro peso molecular. Por esta razón algunos grupos han empezado a estudiar los genes que codifican para los antígenos con el objeto de determinar su verdadera naturaleza, ya que fenómenos postranscripcionales (empalme, glicosilaciones y otros) enmascaran la expresión del antígeno (Frasch et al., 1991).

III. OBJETIVOS

Con el fin de disponer de una herramienta que permita el estudio de la infección de *T. cruzi* en México, se requiere producir anticuerpos monoclonales contra este parásito, para lo cual se ha escogido al aislado Ninoa de *T. cruzi* debido a sus características infectivas. Por tanto se van a:

- A) Caracterizar los anticuerpos monoclonales producidos.
- B) Caracterizar el antígeno identificado por los anticuerpos monoclonales.

IV. MATERIALES Y METODOS

IV.1. Producción de Anticuerpos Monoclonales.

IV.1.a. Preparación de extractos antigénicos.

Se preparó extracto total (Bollag y Edelstein, 1991) a partir de epimastigotes de *T. cruzi* del aislado Ninoa, provenientes del cepario del laboratorio. Los parásitos se cultivaron en medio LIT (liver infusion tryptose) complementado con 25.0 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ de hemina (SIGMA), 10% de suero fetal bovino (GIBCO) inactivado para complemento a 56 °C por 30 min. Los parásitos se cosecharon en la fase exponencial, se concentraron por centrifugación a 387xg (30 min, 4 °C). Después, se realizó un lavado con 5 ml de PBS frío, y se centrifugó nuevamente en las condiciones ya mencionadas. A continuación, por cada gramo de peso húmedo se agregaron 5 ml de Tris-HCl 0.01 M pH 8.2, y una mezcla de inhibidores de proteasas que contenía EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, Leupeptin 100 μM y Pepstatin 1 μM . Los parásitos se lisaron a continuación por sonicación (sonicador High Intensity Ultrasonic Procesor, ULTRASONIC) durante 3 ciclos de tres minutos a 50 Am, se observó al microscopio una muestra para ver si los parásitos estaban lisados. Finalmente, se centrifugó el extracto a 13,000xg por 30 min para eliminar restos celulares y el sobrenadante se dividió en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml y se guardó a -20 °C. Al extracto se le hizo cuantificación de proteínas según el método de Bradford (Bradford, 1976).

Se utilizaron además extractos de epimastigotes de los siguientes aislados de *T. cruzi*: aislado Jalisco C4, Yucatán H1,

Querétaro, Yucatán Z21 y Silvio, los cuales fueron procesados por sonicación en la forma ya descrita. Se utilizó también extracto de epimastigotes *Ninoa*, obtenido por congelación (en nitrógeno líquido) y descongelación (en agua a 37 °C).

Se hizo extracto por medio de sonicación como se describió anteriormente de tripomastigotes del aislado *Ninoa* (Donados por Verónica Ramos, IIB-UNAM). En la misma forma se preparó extracto de *Leishmania sp.*

También se trabajó con extractos de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* (aislado HM1-IMSS) donado por el Dr. Librado Ortiz del IIB-UNAM, extracto total de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* (aislado Wiktor) donado por el Dr. Pascal Herion del IIB-UNAM, extracto total de cisticercos de *Taenia crassiceps* donado por la Dra. Edda Sciuto del IIB-UNAM.

Se utilizó también sobrenadante de medio LIT de cultivo de epimastigotes del aislado *Ninoa*, el cual se preparó de la siguiente forma: se incubaron aproximadamente 10,000 epimastigotes del aislado *Ninoa* en 5 ml de medio LIT sin suero durante una hora a 4 °C, se centrifugó a 387xg, se desechó el botón que contenía a los parásitos y el sobrenadante se concentró hasta 1.0 ml (5x), para utilizarse inmediatamente.

IV.1.b. Protocolo de inmunización.

Tomado y modificado de Harlow y Lane, (Harlow y Lane, 1988). A tres ratones hembra de la cepa BALB/c obtenidos del bioterio del IIB-UNAM de seis a ocho semanas de edad, se les hizo un sangrado control para determinar mediante un ensayo de ELISA (ver técnica más adelante) que no tuvieran anticuerpos contra el

aislado Ninoa de *T. cruzi*. Después de esto, se inmunizó con 80µg de antígeno en 25 µl de Tris-Cl, que se mezcló con un volumen igual de adyuvante completo de Freund, mediante pasajes repetidos a través de una aguja conectada a dos jeringas. Se inyectaron 50 µl de esta emulsión a cada uno de los tres ratones (dos ratones fueron inyectados en el cojinete plantar, y uno por vía intraperitoneal). Luego de catorce días, se hizo una segunda inmunización en las mismas condiciones que la primera. La tercera inmunización se realizó catorce días después, pero se utilizó adyuvante incompleto y la misma cantidad de antígeno que en la primera inmunización. Siete días después del último refuerzo, se sangraron los tres ratones y mediante una prueba de ELISA, se determinó que los tres ratones eran positivos contra el extracto Ninoa de *T. cruzi*. A la semana de haber hecho el sangrado de prueba se realizó una inmunización de refuerzo, esta vez se utilizó la misma concentración de antígeno de la primera inmunización pero sin adyuvante y se inyectó por vía intraperitoneal. Al siguiente día, se volvió a inmunizar de la misma manera, se dejó pasar un día y al siguiente se realizó la fusión.

IV.1.c. Medios de cultivo.

Las células Sp2/0 se cultivaron en condiciones estériles en campana de flujo laminar (Forma Scientif) y se mantuvieron en una incubadora (Forma Scientific) a 37 °C, en un ambiente de 5% de CO₂ y 90% de humedad, en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) complementado con 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (GIBCO), 100µg/ml de piruvato de sodio (SIGMA), 100µg/ml de

penicilina (SIGMA), 100µg/ml de estreptomicina (SIGMA), 300µg/ml de L-glutamina (GIBCO) y 20% de suero de caballo (GIBCO) desactivado. Todos estos reactivos se esterilizaron por filtración antes de agregarse al medio. EL medio de selección consistió en 250 ml de DMEM complementado con 20% de suero fetal bovino (SFB), hipoxantina 0.1mM, timidina 0.01mM, y aminopterinina 0.4µM. Se utilizó como medio de lavado 250ml de DMEM con 300µg/ml de L-glutamina y 100µg/ml de antibióticos (DMEM-sin complementar).

IV.1.d. Protocolo de fusión.

Esta metodología se realizó con algunas modificaciones, según Kennett (1978). Se utilizaron mielomas de ratón de la línea Sp2/0, provenientes de un cultivo en medio DMEM-complementado. Para la fusión, se utilizó 3 gr de polietilenglicol-1550 (PEG-1550 SERVA) en 4.2 ml de DMEM-no complementado. Se fundió la solución en baño María a 56 °C y se filtró para esterilizar. Se colectaron las células de mieloma en un tubo de ensaye de 50 ml estéril, se contaron y ajustaron a una concentración de 20 a 25 x 10⁶ células en 10 ml. Una vez ajustadas, se lavaron dos veces con 30 ml de DMEM-no complementado, se centrifugaron a 387xg por 5 min. Se resuspendieron luego en 10 ml de DMEM-no complementado a 37 °C para hacer la fusión. Se sacrificó al ratón por descerebramiento, se fijó boca arriba a una placa de unicel cubierta de aluminio, se lavó el vientre con alcohol al 70% y se le extrajo el bazo. Se puso el bazo en una caja de petri con 7 ml de DMEM sin complementar, se lavó en ese medio e inmediatamente se transfirió a medio fresco donde se disgregaron

las células con unas pinzas estériles y se transfirió el contenido de la caja de petri a un tubo de centrifuga de 15 ml. Se lavó la caja de petri con 5 ml de DMEM sin complementar y se juntó en el tubo de centrifuga de 15 ml. Se dejó en hielo por 5 min para que se asentaran los restos de tejido. Pasado este tiempo, se virió el sobrenadante en otro tubo de 15 ml y se centrifugó a 387xg durante 5 min. Se resuspendió en 10 ml de DMEM sin complementar y se mezcló con las células de mieloma a una relación aproximada de 1 célula de bazo por 10 mielomas. Se centrifugó a 387xg durante 5 min, y se desechó todo el sobrenadante. Se resuspendió y agregó 5 ml de PEG, gota a gota en un lapso de 2 min, girando lentamente el tubo donde se encontraban las células mientras se agregaba el PEG. Cuando se terminó de agregar el PEG, se siguió girando lentamente el tubo por espacio de 1 min, y se dejó reposar 2 min. Para lavar el PEG, se adicionó DMEM-sin suplementar a 37 °C de la siguiente manera: en un lapso de 5 min se agregaron 5 ml, en los siguientes 5 min se agregaron otros 10 ml, por último en 5 min más, se agregaron otros 15 ml. Se centrifugó 5 min a 387xg, se desechó el sobrenadante y se resuspendió con 45 ml de DMEM-HAT. Finalmente, con una pipeta estéril de 10 ml se vierten las células llenando placas de 96 pozos, se dejan libres los pozos periféricos. Una vez llenas las placas (100 μ l/pozo), se pusieron en incubadora con 5% de CO₂, 90 de humedad y 37 °C. Al cuarto y séptimo días de la fusión se agregaron 50 μ l de DMEM-HAT a 37 °C a cada pozo. A los diez días se hizo el primer ELISA, para detectar los hibridomas positivos.

IV.1.e. ELISA.

En una placa para ELISA de 96 pozos (COSTAR), se pusieron 100 μ l por pozo de una solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 con 5 μ g de antígeno Ninoa. Se incubó dos horas a 37 °C, se desechó el contenido de la placa, y se agregaron 200 μ l por pozo de una solución de albúmina al 1% en PBS. Se dejó incubar 1 hr a 37 °C. Se desechó el contenido y se lavó tres veces con PBS-Tween 20 (PBS-Tw) al 0.05%, durante 10 min cada lavado. Se pusieron los sobrenadantes de los cultivos celulares. Se añadieron controles negativos y positivos, en este caso se trató de los sueros de los ratones pre-inmunes e inmunizados, diluidos 1:1000 en PBS-Tw al 0.05%. En otros pozos se pusieron en cada uno controles como albúmina al 1%, conjugado 1:500 en PBS-Tw y medio de cultivo complementado con suero de caballo al 10%, cinco pozos se dejaron vacíos y solo se les puso sustrato al final del ensayo. Después de poner las muestras de sobrenadante, se incubó 2 hrs a 37 °C. Se desechó el contenido de las placas, y se lavó como se mencionó anteriormente. Se pusieron 50 μ l por pozo de una solución de un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (ZYMED) diluido 1:500 en PBS-Tw al 0.05%. Se incubó durante 2 hrs, a 37 °C. Se lavó y se agregaron 100 μ l/pozo de sustrato (4 mg de ortofenilendiamina (SIGMA) en 5 ml de solución amortiguadora de citrato-fosfato pH 5, 5 ml de agua destilada y 4 μ l de peróxido de hidrógeno al 30%). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente, y se detuvo con 50 μ l por pozo de ácido sulfúrico 2.5 N. Se leyó la densidad óptica (D.O.) a 490 nm en un lector de ELISA (BIO-RAD) (Voller et al., 1978; Venkatesan y Wakelin, 1993).

IV.1.f. Selección de hibridomas positivos y expansión.

La técnica de ELISA se utilizó para seleccionar los hibridomas que comenzaron a crecer en placas de cultivo por medio de un seguimiento de las colonias tanto positivas como negativas. Ya que las colonias presentaron un crecimiento irregular se realizaron pruebas de ELISA cada tercer día a partir de que se detectaron las primeras colonias positivas, para ver, por un lado, cuales colonias seguían positivas y cuales dejaron de serlo. Las colonias más constantes, tanto en crecimiento como en positividad, se trasladaron a placas de 24 pozos de 3.4 ml (COSTAR), a fin de coleccionar la mayor cantidad de sobrenadante que permitiera conocer la clase y las sub-clases de anticuerpos que se estaban produciendo.

IV.1.g. ELISA para determinación de isotipos.

Se incubó el antígeno de la misma forma que ya se mencionó en la técnica ELISA e igualmente se hizo el bloqueo con albúmina. Se agregaron 100µl por pozo de sobrenadante por sextuplicado, durante 2 hrs. Se lavó como se mencionó para el ELISA. Posteriormente, se agregaron 100 µl por pozo de los siguientes anticuerpos anti-isotipos (producidos en cabra contra ratón): anti-IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3, -IgM e -IgA (SIGMA) diluidos 1:1000 en PBS y se incubaron dos horas a 37 °C. Se lavó, y se agregaron 100µl por pozo de anticuerpo anti-cabra unido a fosfatasa alcalina (Zymed), diluido 1:1000 en PBS-Tw20 al 0.05%, luego de 2hrs de incubación a 37 °C, se lavaron tres veces con PBS-Tw20 al 0.05%, diez minutos cada lavado. Como substrato se utilizaron 10 ml (100 µl por pozo) de una solución de

IV.1.f. Selección de hibridomas positivos y expansión.

La técnica de ELISA se utilizó para seleccionar los hibridomas que comenzaron a crecer en placas de cultivo por medio de un seguimiento de las colonias tanto positivas como negativas. Ya que las colonias presentaron un crecimiento irregular se realizaron pruebas de ELISA cada tercer día a partir de que se detectaron las primeras colonias positivas, para ver, por un lado, cuales colonias seguían positivas y cuales dejaron de serlo. Las colonias más constantes, tanto en crecimiento como en positividad, se trasladaron a placas de 24 pozos de 3.4 ml (COSTAR), a fin de coleccionar la mayor cantidad de sobrenadante que permitiera conocer la clase y las sub-clases de anticuerpos que se estaban produciendo.

IV.1.g. ELISA para determinación de isotipos.

Se incubó el antígeno de la misma forma que ya se mencionó en la técnica ELISA e igualmente se hizo el bloqueo con albúmina. Se agregaron 100 μ l por pozo de sobrenadante por sextuplicado, durante 2 hrs. Se lavó como se mencionó para el ELISA. Posteriormente, se agregaron 100 μ l por pozo de los siguientes anticuerpos anti-isotipos (producidos en cabra contra ratón): anti-IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3, -IgM e -IgA (SIGMA) diluidos 1:1000 en PBS y se incubaron dos horas a 37 °C. Se lavó, y se agregaron 100 μ l por pozo de anticuerpo anti-cabra unido a fosfatasa alcalina (Zymed), diluido 1:1000 en PBS-Tw20 al 0.05%, luego de 2hrs de incubación a 37 °C, se lavaron tres veces con PBS-Tw20 al 0.05%, diez minutos cada lavado. Como substrato se utilizaron 10 ml (100 μ l por pozo) de una solución de

dietanolamina pH 9.8 al 10% (100 ml de dietanolamina, 102 mg de $MgCl_2$ y 0.4 gr de NaN_3 , en un litro de agua destilada) y 10 mg de p-nitrofenil fosfato disódico (PNPP, pastillas de 5mg). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 10-15 min y se detuvo la reacción con 50 μ l/pozo de NaOH 2N. Se leyó la D.O. a 450nm en un lector de ELISA.

IV.1.h. Clonación por dilucion limitante.

La metodología fué modificada a partir de la reportada por Harlow y Lane (1988).

a) Obtención de células alimentadoras.

Ya que los hibridomas no crecen bien cuando se encuentran muy diluidos, se hace necesaria la presencia de células alimentadoras que proporcionen el sustento y los factores apropiados para el crecimiento de los hibridomas. Para preparar estas células, un día antes de la clonación se tomó un ratón BALB/c hembra. Se sacrificó por descerebramiento y se obtuvo el bazo en condiciones de esterilidad. Se obtuvieron las células en las mismas condiciones que cuando la fusión. Se distribuyeron en tres placas estériles de 96 pozos (50 μ l por pozo), dejando vacíos los pozos periféricos, en DMEM-complementado con 10% de SFB. Se utilizó un bazo por cada clona de hibridomas. Se dejaron 24 hrs en la incubadora.

b) Clonación

Los hibridomas se contaron y se hicieron varias diluciones calculando que al final quedara una sola célula por pozo. En cinco o seis días se observó al microscopio el crecimiento por

pozo, se seleccionaron aquellas en las que se observó solo una clona por pozo. A los siete o diez días se les hizo ELISA para detectar las clonas positivas e iniciar su expansión. Las clonas así seleccionadas se reclonaron por la misma técnica para tener mayor seguridad de que las células fueran monoclonales.

c) Expansión de clonas.

Conforme las clonas empezaron a crecer se les hizo ELISA cada tercer día para saber si se mantenían positivas. Las clonas se pasaron primero a botellas de cultivo de 25 cm² (COSTAR), y luego en botellas de cultivo de 75 cm² (COSTAR) para poder coleccionar la mayor cantidad de sobrenadante, así como para cosechar suficientes células que se inyectarían a ratones para la producción de ascitis y para congelarlas con la finalidad de tener una reserva de clonas.

IV.1.i. Producción de ascitis.

La producción de ascitis se efectuó siguiendo básicamente la metodología de Harlow y Lane (1988). A tres ratones hembra BALB/c de seis semanas se les inoculó 0.5 ml de Pristan por vía intraperitoneal. Se dejaron reposar 14 días y se les inocularon intraperitonealmente $5-10 \times 10^6$ células de las clonas en PBS-C1. A los tres o cuatro días se cosecha el líquido de ascitis en tubos estériles de 50ml por punción de los ratones con una aguja estéril del No.18. Se centrifuga el líquido de ascitis colectado a 387xg y se congela el sobrenadante en alicuotas.

IV.1.j. Congelación de clonas.

Las células en cultivo se pasaron a un tubo de centrifuga estéril, enfriado previamente en hielo, se tomó una alicuota para contarlas. Se centrifugaron a 387g durante 5 min en frío. Se resuspendieron golpeando el tubo levemente y se añadió 1.5 ml de una solución al 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y 90% de suero fetal bovino por cada 6×10^6 células. Esta solución debe estar previamente en hielo. Las células en este medio se pasaron a viales especiales para congelación que también deben estar previamente en hielo. Se pusieron los viales en una caja de unisel y se dejaron toda la noche a -70 °C. Al día siguiente se pasaron al nitrógeno líquido (Harlow y Lane, 1988).

IV.1.k. Purificación de anticuerpos.

Con la finalidad de purificar los anticuerpos se utilizó una columna de Sepharosa-Proteína A (PHARMACIA) de la siguiente manera (modificado de Cuatrecasas, Wilchek y Anfinsen., 1968; Wilchek, Miron y Kohn., 1984): 50 ml de sobrenadante (SN) de las clonas se centrifugó a 387xg durante 5 min y se filtró en papel Wattaman 0.45 μ m. Se le ajustó el pH a 8 con Tris 2 M pH 8.2. Se lavó la columna con Tris-salino (10 mM de Tris y 150 mM de NaCl) hasta pH 8. Se pasó el sobrenadante a través de la columna (50 ml de SN/3 ml de columna) a un flujo de 0.4 ml/min. Se lavó primero la columna con 1 ml de Tris-salino, luego se lavó continuamente con la misma solución hasta que desapareció el color en la columna. Se eluyeron los anticuerpos con una solución de glicina 100 mM pH 3. Se colectaron en tubos que contenían 300 μ l de Tris 2 M, para neutralizar. Se leyeron las fracciones a 280

nm. Se lavó la columna con Tris-salino hasta pH 8 a fin de volverla a utilizar. Se dializó en PBS la fracción en la que se encontró la lectura mayor y se realizó electroforesis y western blot para confirmar que lo que se obtuvo fué anticuerpo y que este reconocía el mismo antígeno que el del sobrenadante de las clonas.

IV.2. Caracterización del Antígeno Reconocido por los Anticuerpos Monoclonales.

IV.2.a Western Blot.

A fin de conocer el peso molecular aproximado del antígeno que es reconocido por el mAb, se hizo inmunoblot según técnicas de Towbin y Gordon (1979) y Burnette (1981), para lo cual se hizo electroforesis en minigel, según técnica de Laemmli (1970), en gel de poliacrilamida al 10%. Preparación de las muestras: Se pusieron en el primer carril del gel marcadores de peso molecular preteñidos (BIO-RAD), 5 μ l por carril. Para el antígeno, en el carril preparativo, se calculó el volumen equivalente a 100 μ g y se le agregó la misma cantidad de solución de muestra (sample buffer). Una vez transferidas las proteínas a papel de nitrocelulosa se bloqueó con albúmina al 1% y se incubaron con los sobrenadantes de las clonas seleccionadas por 2 hrs a temperatura ambiente con agitación. Como control positivo se utilizó suero de ratón hiperinmune contra el aislado Ninoa de *T. cruzi* diluido 1:2000 en PBS-Alb 1% y como control negativo un sobrenadante de hibridoma no relacionado. Luego de la incubación, se lavó tres veces con PBS-Tw 20 al 0.1%, diez minutos cada

lavado. Se puso luego el conjugado, que es un anti-anticuerpo unido a peroxidasa (ZYMED) diluido 1:2000 en PBS. Se incubó 2 hrs a temperatura ambiente con agitación. Se lavó como se describió y se agregó el substrato, para lo cual se pesó 0.5 mg/ml de diaminobenzidina (SIGMA) más 0.02% de peróxido de hidrógeno, por ml de PBS. Se dejó reaccionar y se paró la reacción lavando las tiras de papel con agua destilada.

IV.2.b. Tratamiento del antígeno con peryodato de sodio.

Para determinar si el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal podría consistir de carbohidratos, se llevó a cabo un ensayo que consistió en tratar al antígeno con peryodato de sodio en placas de ELISA. Se incubó el Ag ($5\mu\text{g}/100\mu\text{l}$, por pozo) del aislado Ninoa en placas de ELISA de 96 pozos. Se lavaron las placas con una solución de acetato de sodio 50 mM pH 4.5 (en ácido acético 50 mM), y se agregaron 50 μl por pozo de las siguientes concentraciones de peryodato de sodio diluidas en acetato de sodio 50 mM pH 4.5: 20 mM, 10 mM, 5 mM, 2.5 mM y 0 mM. Se incubaron una hora a 25 °C, en obscuridad. Se lavaron una vez con solución de acetato de sodio 50 mM pH 4.5, y se añadieron 100 μl por pozo de una solución de glicina al 1% en PBS; se incubó por 30 min a temperatura ambiente y se lavó tres veces con PBS. Se continuó la técnica como se reportó para ELISA. Además, se realizó western blot tratando el Ag con las mismas concentraciones de peryodato de sodio que en el ELISA (Woodward, Young y Bloodgood., 1985).

IV.2.c. Tratamiento del antígeno con proteasas.

Con el fin de conocer si el epítipo reconocido por los anticuerpos monoclonales era un determinante proteico se procedió a tratarlo con diferentes proteasas: tripsina (BOEHRINGER) (100 μ g de Ag + 3.6 unidades de tripsina en 100 μ l de Tris), Pepsina (SIGMA) (100 μ g de Ag + 4 unidades de pepsina en 100 μ l de Tris), Proteinasa K (SIGMA) (100 μ g de Ag + 0.1 unidades de proteinasa K en Tris). Las muestras se incubaron 1 hora a 25 °C, para luego analizarlas por western blot.

V. RESULTADOS

V.1. Fusiones.

Se realizaron un total de cuatro fusiones, obteniéndose solamente crecimiento de hibridomas en las fusiones tres y cuatro. En la tercera fusión se obtuvieron 68 pozos positivos, de los cuales, después de hacerles un seguimiento por medio de 5 pruebas de ELISA, sólo continuaron con buen crecimiento y con una buena producción de anticuerpos los hibridomas 2B6, 2F10 y 4C5. Con respecto a la cuarta fusión, se obtuvieron 52 hibridomas, después de darles seguimiento por medio de 3 pruebas de ELISA, se eligieron los hibridomas 1C2, 1D3, 4F11 y 4B4 para seguirlos creciendo (Tabla I).

A los hibridomas de la fusión tres, se les pasó a placa de 24 pozos para expandir su crecimiento. Una vez que las colonias empezaron a expandirse, se colectó sobrenadante para determinar el isotipo de la Ig, dando como resultado que las tres clonas de hibridomas producían el isotipo IgG1. Se procedió luego a clonar los tres diferentes hibridomas. Según resultado del seguimiento por ELISA se obtuvieron positivas CIG6 (proveniente de 2B6) y CIIIC5 (proveniente de 2F10); del hibridoma 4C5 no se obtuvieron clonas positivas. La clona CIIIC5 se congeló y únicamente se reclonó la obtenida para 2B6. De la reclonación de 2B6, se obtuvieron 38 clonas positivas de las cuales se escogieron diez por su mejor rendimiento, a las cuales se les volvió a hacer ELISA para isotipos dando como resultado que todas producían el isotipo IgG1 (Tabla II). Con respecto a la cuarta fusión, se

clonaron los hibridomas 1C2, 1D3, 4F11 y 4B4. De éstas, solo crecieron las clonas provenientes del hibridoma 4F11, las cuales se reclonaron y se escogieron ocho subclonas, debido a su buen crecimiento, para expandirlas y hacerles ELISA para isotipos donde se determinó que todas producían el isotipo IgM. (Tabla III).

TABLA I. HIBRIDOMAS OBTENIDOS EN LAS FUSIONES CON CELULAS DE BAZO DE RATONES INMUNIZADOS CON *T. cruzi*.

		Resultados de diferentes pruebas de ELISA (O.D.)				
		1	2	3	4	5
Fusión 3	2B6	0.29	0.27	0.41	0.72	0.75
	2F10	0.41	0.30	0.97	0.82	0.34
	4C5	0.21	0.23	0.28	0.91	0.83
	Control +	1.05	1.10	1.02	1.52	1.4
	Control -	0.11	0.14	0.10	0.23	0.12
Fusión 4	1C2	1.44	0.40	1.16		
	1D3	0.81	0.77	0.95		
	4F11	1.95	1.33	1.48		
	4B4	1.37	1.18	0.45		
	Control +	2.13	1.82	1.51		
	Control -	0.31	0.12	0.15		

Tabla I. Resultados de cinco diferentes pruebas de ELISA de los hibridomas producidos en las fusiones 3 y 4. El control negativo es suero de ratón antes de ser inmunizado, y el control positivo es suero de ratón inmunizado con extracto total del aislado Ninoa de *T. cruzi*. Las placas se leyeron a 490 nm.

TABLA II. SUBCLONAS E ISOTIPO PROVENIENTES DEL HIBRIDOMA 2B6

CLONAS	ISOTIPO	ELISA
1) IB5	IgG1	0.411
2) ID5	IgG1	0.423
3) IC10	IgG1	0.420
4) IIIC7	IgG1	0.400
5) IIIC8	IgG1	0.409
6) IVC3	IgG1	0.411
7) IVD5	IgG1	0.434
8) VB6	IgG1	0.439
9) VC3	IgG1	0.408
10) VID2	IgG1	0.402
Control +	ND	0.706
Control -	ND	0.089

TABLA III. CLONAS E ISOTIPO PROVENIENTES DEL HIBRIDOMA 4F11

CLONAS	ISOTIPOS	ELISA
1) 5B10	IgM	1.162
2) 5D2	IgM	2.275
3) 5D4	IgM	2.142
4) 5E2	IgM	1.874
5) 5F3	IgM	2.048
6) 5G5	IgM	1.333
7) 5F11	IgM	1.933
8) 6B2	IgM	1.949
Control +	ND	0.657
Control -	ND	0.146

V.2. Determinación del Peso Molecular del Antígeno Reconocido por los Anticuerpos Monoclonales.

Con el fin de determinar el peso molecular aproximado del antígeno que reconocían los mAbs producidos por las clonas provenientes del hibridoma 2B6, se procedió a hacer western blot utilizando antígeno total del aislado Ninoa de *T. cruzi*. En este experimento se observó que todas ellas reconocían una banda de aproximadamente 40-45 KDa (Fig.1).

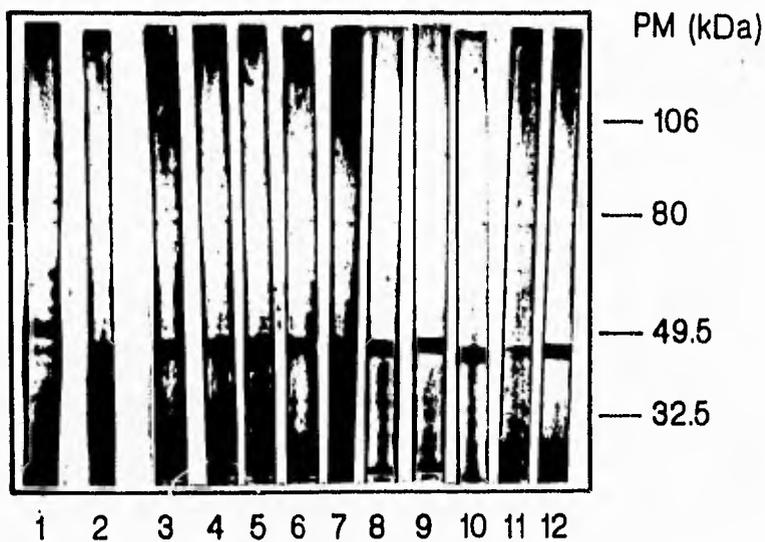
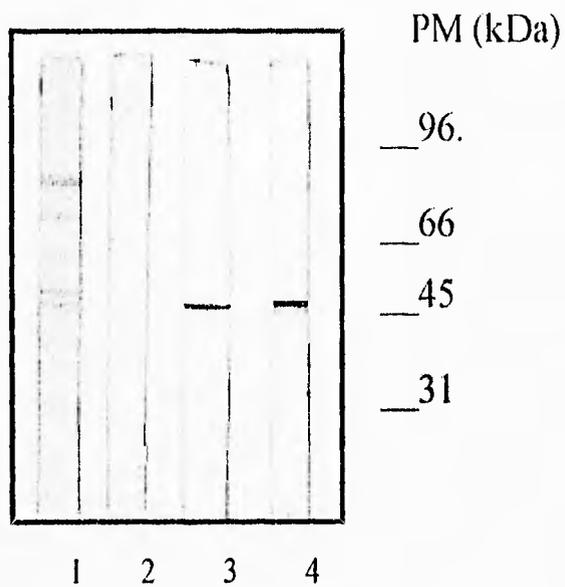


Fig.1. Determinación del peso molecular del antígeno reconocido por los anticuerpos monoclonales producidos por las subclonas provenientes de la clona 2B6. Carriles: 1) Antígeno total de Ninoa, 2) Suero de ratón no inmunizado, 3) Sobrenadante de las subclonas: IIIC7, 4) IIIC8, 5) VC3, 6) VB6, 7) IB5, 8) ID5, 9) IC10, 10) IVC3, 11) IVD5 y 12) VID2. El blot fué revelado con diaminobenzidina. Los pesos moleculares se indican a la derecha.



ANEXO No. 1: Western blot donde se muestran dos de las subclonas de 2B6 probadas con otro suero de ratón no inmunizado.

Carriles: 1) Antígeno total de Ninoa, 2) Suero de ratón no inmunizado, 3) Sobrenadante de la subclona IB5 y 4) Sobrenadante de la subclona IC10.

Debido a que todas estas clonas eran producto de al menos tres reclonaciones, que todas las clonas producían el mismo isotipo IgG1 y que todas reconocían el mismo antígeno de 40-45 kDa, pensamos que probablemente las 10 subclonas provenientes de la clona 2B6 son semejantes, por lo que procedimos a trabajar con ellas indistintamente.

Según resultados obtenidos en western blot, los mAbs de las clonas provenientes del hibridoma 4F11 reconocen antígenos del extracto Ninoa de entre 20 kDa y 80.5 kDa (Fig.2). Estas clonas se expandieron y luego se congelaron.

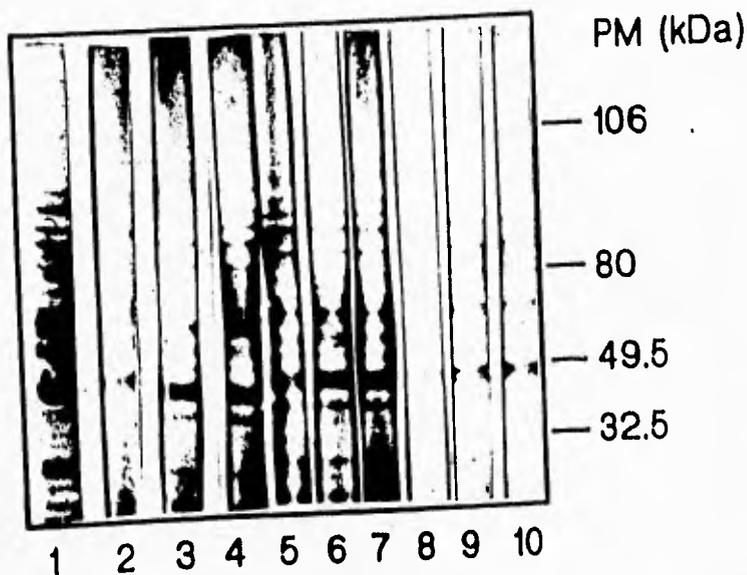


Fig.2. Western blot para determinar el peso molecular del antígeno reconocido por los mAbs de las subclonas provenientes de la clona 4F11. Carriles: 1) Antígeno total de Ninoa, 2) Suero de ratón no inmunizado, 3) Sobrenadante de la clona 5E2, 4) 6B2, 5) 5B10, 6) 5F11, 7) 5F3, 8) 5D2, 9) 5D4 y 10) 5G5. El blot fué revelado con diaminobenzidina.

V.3. Purificación de Anticuerpos.

A partir de sobrenadante se purificó anticuerpo monoclonal de la clona 2B6 por medio de una columna de Sepharosa-Proteína A. Las proteínas eluidas de la columna se corrieron en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras para comprobar su pureza. Se encontraron dos bandas, una de aproximadamente 50 kDa y la otra de aproximadamente 25 kDa, lo que corresponde al peso reportado de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas clase IgG (Fig.3).

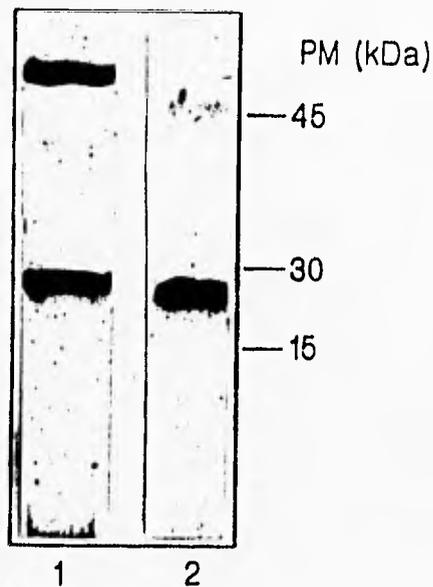


Fig.3. Gel de poliacrilamida del anticuerpo monoclonal producido por las subclonas de 2B6 purificado por cromatografía de afinidad en columna de Sepharosa-proteína-A. Carriles: 1) Control positivo, anticuerpo monoclonal IgG no relacionado. 2) Anticuerpo monoclonal purificado de las subclonas de 2B6.

Con el fin de verificar si el mAb purificado era capaz de reconocer todavía al Ag, se probó su reactividad con el antígeno por medio de western blot. Se observó que el mAb purificado reconoció una banda del mismo peso molecular que el obtenido con sobrenadante de las clonas antes de ser purificado. Por lo tanto podemos decir que el anticuerpo no perdió su especificidad luego de ser purificado (Fig.4).

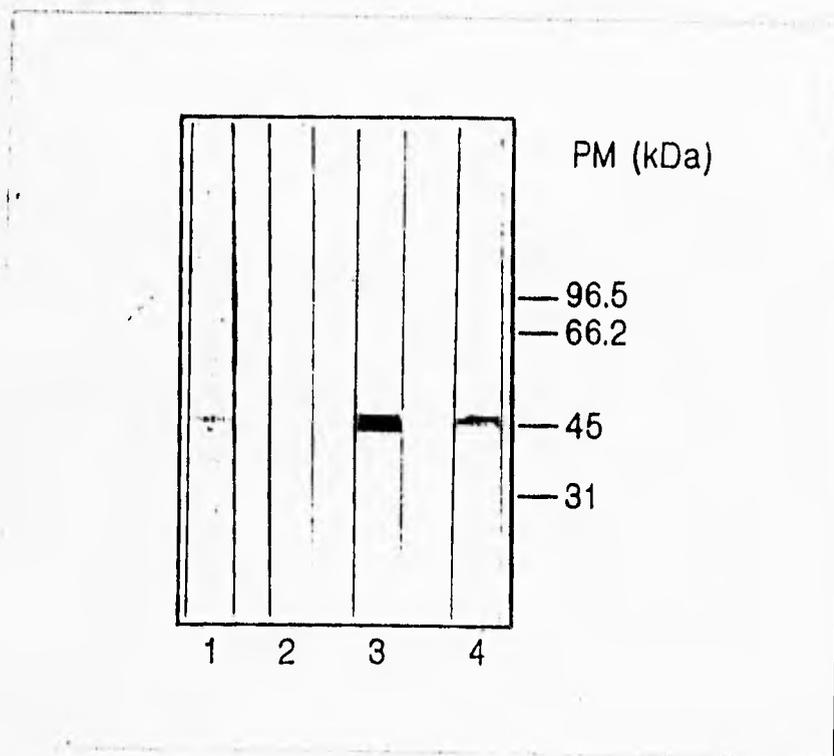


Fig.4. Western blot de anticuerpo monoclonal purificado. Carriles: 1) Suero de ratón inmunizado con Ninoa, 2) Suero de ratón no inmunizado, 3) Sobrenadante de las subclonas de 2B6 antes de purificar, 4) Anticuerpo monoclonal purificado.

V.4. Identificación del Antígeno Reconocido por el Anticuerpo Monoclonal en Diferentes Aislados de *T. cruzi*.

Para determinar si el anticuerpo reconocía el mismo antígeno en otros aislados de *T. cruzi* diferentes al aislado Ninoa que se usó para su producción, se hizo western blot con extracto de epimastigotes de los siguientes aislados: Jalisco C4, Querétaro, Yucatán H1, Yucatán Z21, Silvio y Ninoa (Extracto elaborado por congelación-descongelación). Todos los extractos se usaron a la misma concentración. Como se observa en la figura 5, el anticuerpo monoclonal reconoció al antígeno de 40-45 kDa en los aislados Querétaro y Ninoa. El extracto de Ninoa, elaborado por congelación-descongelación, también mostró la misma banda, por lo que el antígeno es reconocido a pesar del método que se utilizó para la preparación del extracto de tripanosoma.

V.5. Presencia del Antígeno de 40-45 kDa en otros Parásitos.

Con el fin de determinar si el anticuerpo monoclonal proveniente de las subclonas de 2B6 reconocía antígenos de otros parásitos, se procedió a realizar western blot con extractos totales, con la misma concentración de proteínas, de los siguientes parásitos: *Leishmania sp.*, *Toxoplasma gondii* (cepa Wiktor), *Taenia crassiceps* y *Entamoeba histolytica* (aislado HM1-IMSS). Como se muestra en la figura 6 en ninguno de estos extractos se detectó al antígeno de 40-45 kDa.

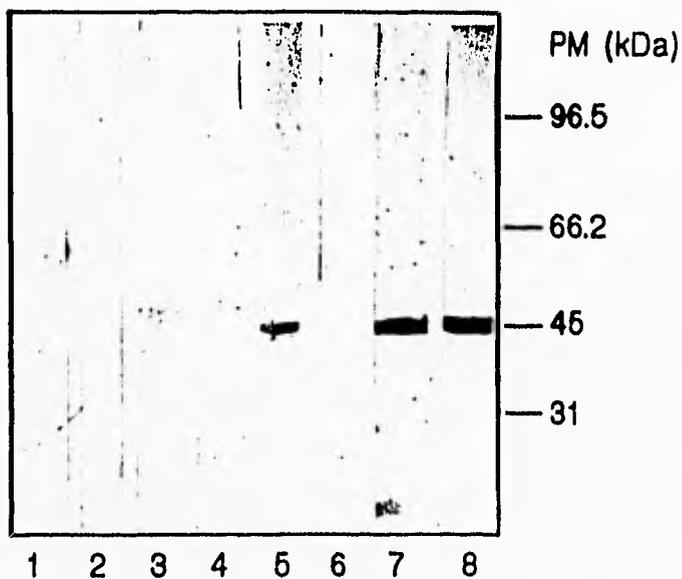


Fig.5. Western blot con el anticuerpo monoclonal de las subclonas de 2B6 utilizando diferentes aislados de *T. cruzi*. Carriles: 1) Suero de ratón sin inmunizar, 2) Yucatán Z21, 3) Silvio, 4) Jalisco C4, 5) Ninoa (sonicación), 6) Yucatán H1, 7) Ninoa (congelación-descongelación) y 8) Querétaro.

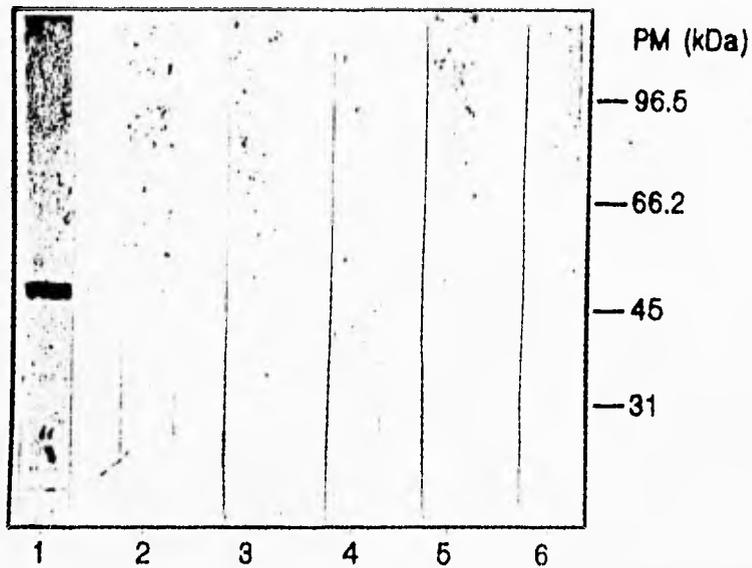


Fig.6. Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal producido por las subclonas de 2B6 contra diferentes extractos parasitarios. Carriles: 1) *T. cruzi*, aislado Ninoa. 2) *Toxoplasma gondii*, aislado Wiktor. 3) *Leishmania* sp. 4) *Entamoeba histolytica*, aislado HM1-IMSS. 5) *Taenia crassiceps* y 6) Suero de ratón sin inmunizar. Blot revelado con Diaminobenzidina según material y métodos.

V.6. Detección del Antígeno 40-45 kDa en Sobrenadante de Cultivo de *T. cruzi*.

Con el fin de determinar si el antígeno reconocido en el extracto por el anticuerpo monoclonal de las subclonas de 2B6 también se encuentra en el sobrenadante de cultivo de epimastigotes del aislado Ninoa, se realizó western blot utilizando como Ag sobrenadante concentrado de cultivo de *T. cruzi* tomado una hora después de incubar los parásitos en medio LIT sin suero a 4 °C. El anticuerpo reconoció un antígeno de 40-45 kDa en el sobrenadante (Fig.7).

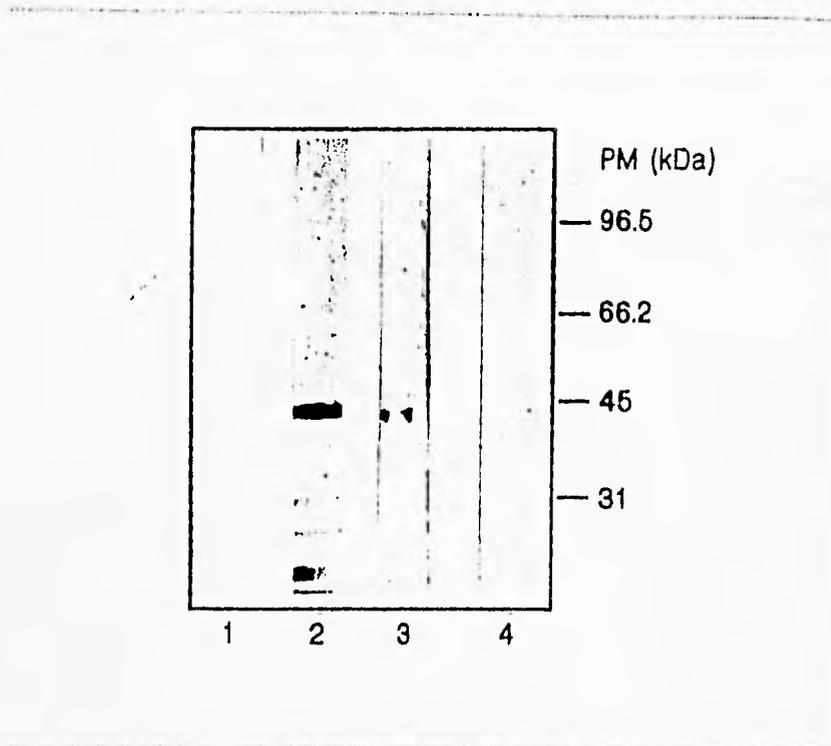


Fig.7. Western blot de anticuerpo monoclonal de las subclonas de 2B6 probado contra sobrenadante de cultivo de aislado Ninoa de *T. cruzi*. Carriles: 1) Suero de ratón sin inmunizar, 2) Extracto total Ninoa, 3) Sobrenadante de cultivo de Ninoa y 4) Medio de cultivo sin parásitos. Blot revelado con Diaminobenzidina.

V.7. Detección del Antígeno de 40-45 kDa en Extracto de Tripomastigotes.

Con el fin de determinar si el antígeno de 40-45 kDa estaba presente en extractos de tripomastigotes del aislado Ninoa, se realizó western blot con los anticuerpos provenientes de las subclonas de 2B6 obteniéndose un resultado negativo (Fig.8).

V.8. Determinación de la Naturaleza Química del Epítipo Reconocido por el Anticuerpo Monoclonal.

V.8.a. Tratamiento del antígeno con peryodato de sodio.

Con la finalidad de saber si el epítipo reconocido por nuestro mAb era una glicoproteína se procedió a hacer ELISA y western blot del extracto tratado con diferentes concentraciones de peryodato de sodio (Fig. 9). Los resultados de estos experimentos mostraron que aparentemente el determinante antigénico no es un carbohidrato y que posiblemente el antígeno reconocido sea de naturaleza proteica.

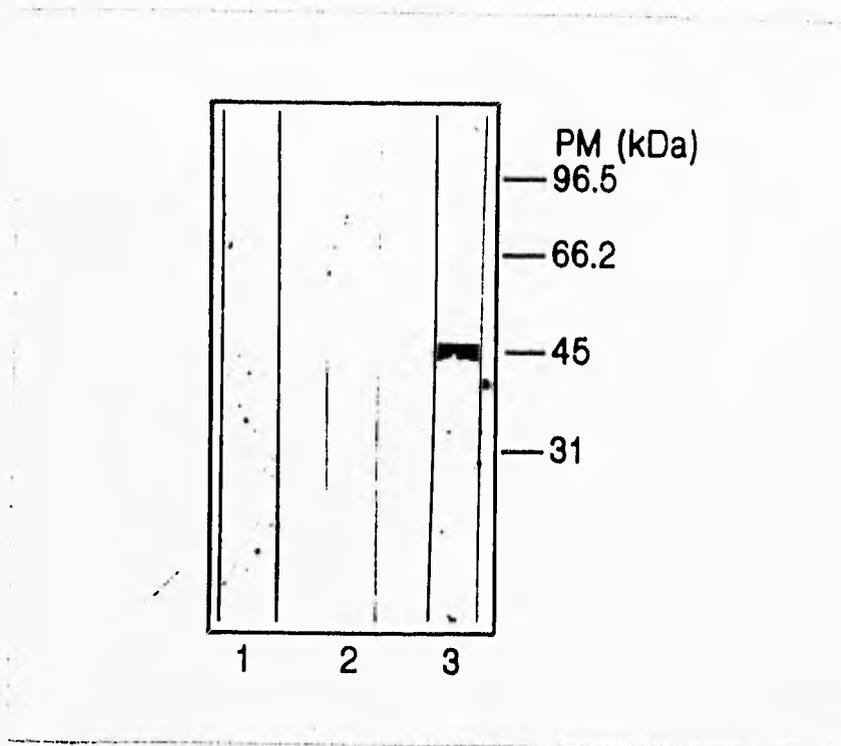


Fig.8. Western-blot con anticuerpo monoclonal probado contra extracto total de tripomastigotes de Ninoa de *T. cruzi*. Carriles: 1) Suero de ratón sin inmunizar, 2) Extracto de tripomastigotes y 3) Extracto de epimastigotes.

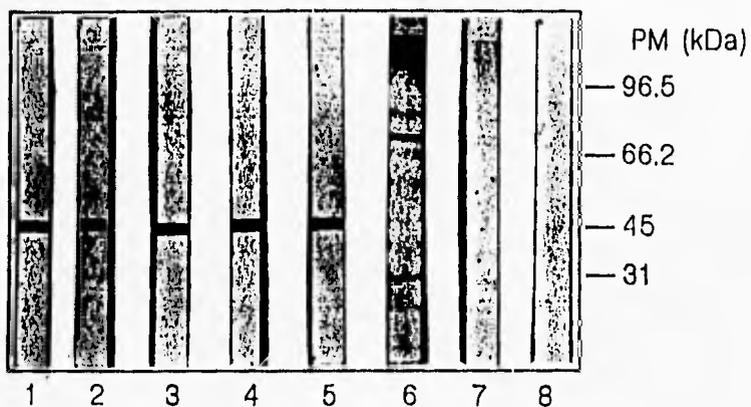


Fig.9. Western blot de antígeno de 40-45 kDa tratado con peryodato de sodio. Carriles: 1) Antígeno tratado con 20mM, 2) 10mM, 3) 6mM, 4) 2.5mM, 5) Antígeno sin tratar, 6) Extracto total sin tratar contra suero de ratón inmunizado, 7) Extracto total tratado con 10mM de peryodato de sodio contra suero de ratón inmunizado y 8) Extracto total contra un anticuerpo monoclonal no relacionado.

V.8.b. Tratamiento del antígeno con proteasas.

Con el fin de determinar el efecto de proteasas sobre el epítipo de 40-45 kDa, identificado por el anticuerpo monoclonal, el extracto total se trató con Tripsina, Pepsina, Proteinasa K. Según el resultado del western blot y como se puede apreciar en la fig. 10, la proteinasa K digirió completamente al determinante antigénico y no hubo reconocimiento. En cambio, el tratamiento con tripsina, provocó una disminución de la intensidad de la banda detectada por el monoclonal, lo que podría significar que el determinante antigénico fué digerido parcialmente por la tripsina. La pepsina provocó una digestión parcial del antígeno ya que aparecieron dos bandas de diferente peso molecular en el western blot con el anticuerpo monoclonal sin que el determinante antigénico sufriera cambios aparentes (Fig.10). En su conjunto estos datos sugieren que el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal es de naturaleza proteica.

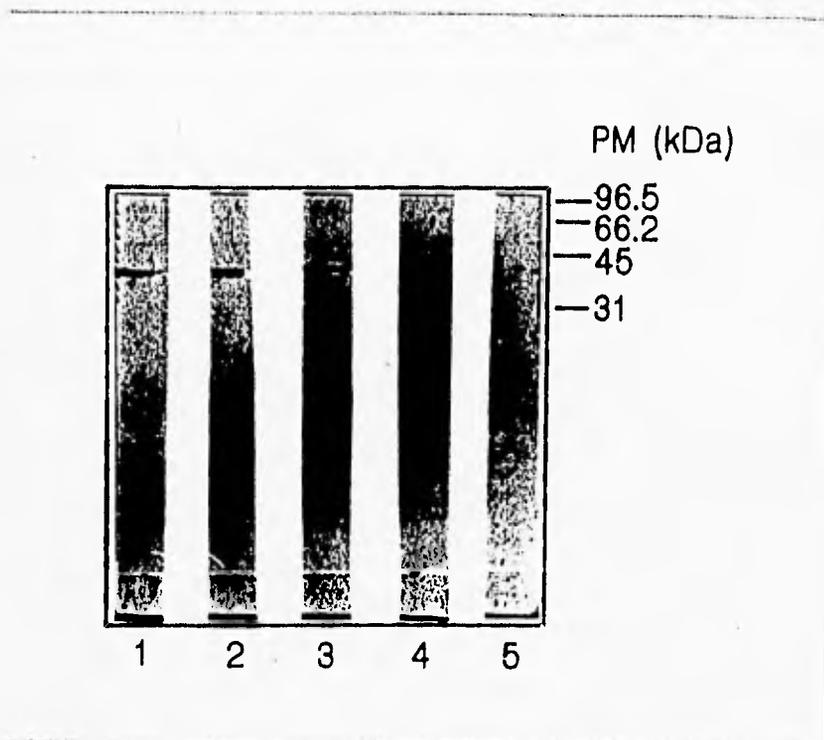


Fig.10. Efecto de proteasas sobre el antígeno de 40-45 kDa. Este blot fué hecho con un gel de poliacrilamida al 20%. Carriles: 1) Antígeno sin digerir, 2) Antígeno digerido con tripsina, 3) Antígeno digerido con pepsina, 4) Antígeno digerido con proteinasa K y 5) Suero de ratón no inmunizado.

VI. DISCUSION

Por medio de un anticuerpo monoclonal hemos podido localizar un antígeno de aproximadamente 45 kDa en extractos de epimastigotes de la cepa Ninoa y Querétaro de *T. cruzi*. Se han encontrado al menos otros dos antígenos de aproximadamente 45 kDa en *T. cruzi*; uno fué identificado con el mAb 10D8 y es un antígeno de membrana que participa en la invasión celular y sólo se ha encontrado en tripomastigotes metacíclicos (Ramírez et al., 1993). El otro es un antígeno polipeptídico llamado Tc45, importante en la infección porque parece ser secretado al medio y se localiza en el citoplasma de epimastigotes y tripomastigotes (Ramos et al., 1991).

Se ha descrito otro antígeno de *T. cruzi* llamado Factor Inmunosupresor del Tripanosoma (TIF) que tiene un peso molecular aún no determinado exactamente, pero que se encontraría entre los 30 y 100 kDa. Al parecer, se trata de una proteína que es secretada al medio por tripomastigotes y sería la causante de una forma de inmunosupresión en la infección con *T. cruzi* (Sztein y Kierszenbaum, 1993).

El anticuerpo monoclonal aquí caracterizado, tiene en común con el TIF y el Tc 45 el peso molecular aproximado de 45 kDa. Restaría por investigar más a fondo si el antígeno que reconoce nuestro anticuerpo monoclonal es exclusivamente un polipéptido y si se trata de un antígeno citoplasmático que pudiera estar siendo secretado al medio.

El antígeno de 45 kDa solo pudo ser localizado en extractos

totales de epimastigotes de los aislados Ninoa y Querétaro; en los aislados de Yucatán, Jalisco y Silvio proveniente de Brasil, no fué posible detectarlo. Esto podría coincidir, a pesar de las limitaciones, con algunos otros datos que señalan que los aislados de la región central de la República Mexicana serían más homogéneos en algunas de sus características, y por tanto se considerarían evolutivamente más cercanos entre sí que con respecto a los aislados de Yucatán y de Sud-América (Zavala-Castro *et al.*, 1992).

El hecho de que el epítipo reconocido por nuestro anticuerpo monoclonal no estuviera presente en todos los aislados de *T. cruzi* probados, podría significar que no es posible utilizarlo para inmunodiagnóstico, sin embargo esto no implica necesariamente que el antígeno no se encuentre presente en todos ellos, el antígeno podría ser parecido y el epítipo diferente. Serían necesarios más experimentos para poder concluir que nuestro anticuerpo monoclonal no puede ser utilizado en inmunodiagnóstico. Una ventaja para este fin lo representa el que este mismo antígeno no se encontró en otros parásitos.

Por otro lado, el inmunizar con extractos totales del parásito tiene ventajas y desventajas. Entre las primeras se encuentra la posibilidad de identificar antígenos que en una infección *in vivo* no sean fáciles de detectar por estar de alguna manera "ocultos" a los anticuerpos y al hacer el extracto queden al descubierto. Otra ventaja es que un extracto antigénico no produciría una inmunosupresión como sucede a partir de una infección con parásitos vivos que provoca una deficiente respuesta inmune por parte del

huesped. Entre las desventajas, se encontraría el hecho de que al ser la respuesta inmunológica diferente en una inmunización con extractos que en una infección con parásitos vivos, los antígenos que se detectan con el extracto total pueden no tener relevancia, por ejemplo, en la infección o en el ciclo de vida del parásito.

En este trabajo en particular, tenemos la desventaja, para fines del estudio de la infección, de haber trabajado con antígeno de epimastigotes los que, como se describió, no son la etapa infectiva del tripanosoma. Sin embargo, la ventaja es que los epimastigotes son más fáciles de cultivar y se puede obtener buena concentración de antígenos que, para fines de caracterizar a los aislados mexicanos, nos son muy útiles.

Sobre el anticuerpo monoclonal proveniente de la clona 4F11, que también fué producido en este trabajo, no se caracterizó completamente debido a que reconocía antígenos de peso molecular de entre 20 y 80.5 kDa, lo que puede ser debido a diferentes causas como sería que el anticuerpo reconociera antígenos que tuvieran un epítipo similar o que tengamos probablemente una reacción cruzada con varias proteínas.

VII. CONCLUSIONES.

En base a los resultados experimentales de este trabajo se concluye que:

I) Se obtuvo un anticuerpo monoclonal específico de *T. cruzi* de la clase IgG1.

II) El peso molecular del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal es de aproximadamente 45 kDa.

III) Este antígeno de 45 kDa, es al parecer secretado o excretado al medio, ya que fué posible encontrarlo en sobrenadante de un cultivo de epimastigotes del aislado Ninoa.

IV) El epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal en el antígeno de 45 kDa se encontró presente sólo en extractos de epimastigotes de *T. cruzi* de los aislados Querétaro y Ninoa, y ausente en los aislados Yucatán Z21, Yucatán H1, Jalisco C4 y Silvio.

V) El anticuerpo monoclonal no presentó reacción cruzada con otros parásitos como *Leishmania sp.*, *Entamoeba histolytica* (aislado HM1-IMSS), *Toxoplasma gondii* (aislado Wiktor) y *Taenia crassiceps*.

VI) El epítipo reconocido por este anticuerpo monoclonal en el antígeno 45 kDa, es al parecer una proteína, ya que el reconocimiento por el anticuerpo es sensible al tratamiento por proteasas y no así al de peryodato de sodio.

Como se puede ver, la producción de anticuerpos monoclonales, en este caso contra *T. cruzi*, nos abre una serie de posibilidades para el estudio de este parásito, por lo que la conclusión más importante de este trabajo es la de habernos dotado de una herramienta que nos servirá para el avance de la investigación de *T. cruzi* en México.

VIII. PERSPECTIVAS

Para que se pueda ir perfilando un esquema más adecuado de las relaciones entre los diferentes aislados mexicanos de *T. cruzi* hace falta, entre otros estudios, que se continúe con la búsqueda de más antígenos por medio de anticuerpos monoclonales. Además, no olvidemos que en su mayoría los antígenos representan proteínas codificadas por genes específicos, por lo que un objetivo en la búsqueda de antígenos debería ser el de tener un panorama genético de los aislados mexicanos de *T. cruzi*.

Este trabajo puede continuarse por varias vías, por un lado para detectar el antígeno en el tripanosoma es necesario realizar ensayos de inmunofluorescencia y de microscopía electrónica. Por otro lado es necesario purificar el antígeno de 45 kDa que es reconocido por el anticuerpo monoclonal, esto nos permitiría determinar, por un lado, si en el suero de ratones infectados con los aislados Querétaro y Ninoa existen anticuerpos contra este antígeno y por otro lado, si en el suero de pacientes con Chagas se generan anticuerpos que lo reconozcan. Estos dos puntos nos permitirían determinar si el antígeno de 45 kDa es reconocido en una infección, además de los extractos antigénicos.

Por otro lado, si tenemos el antígeno purificado se puede secuenciar el extremo amino terminal de la proteína y comparar su secuencia con la de alguna otra que ya haya sido reportada a fin de determinar posibles homologías. Además, teniendo parte de la secuencia de la proteína se puede aislar el gen que la está

codificando y con ello se puede buscar este mismo gen en otros aislados de *T. cruzi*. También es posible realizar mutagénesis dirigida en el gen para determinar la posible función del antígeno. Aunado a lo anterior, es posible con el anticuerpo monoclonal purificado estudiar si es capaz de bloquear ya sea la infección **in vitro** de células por *T. cruzi*, o si este anticuerpo puede **in vitro** de alguna manera promover la destrucción del parásito, ya sea por medio de ensayos con complemento o por fagocitosis. Para verificar si este antígeno de 45 kDa es o no el TIF o el Tc45, se podría hacer contacto con los laboratorios involucrados a fin de intercambiar, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales o los antígenos y de esta manera realizar experimentos conjuntos.

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1) Albright J. W. and J.F. Albright. 1991. Rodent Trypanosomes: Their Conflict With the Immune System of the Host. *Parasitol. Today*. 7: 137-140.
- 2) Andersson N., A. Morales, E. Nava, E. Martínez, I. Rodríguez, P. Young, M.K. Howard and M.A. Miles. 1990. *Trypanosoma cruzi* infection in the Mexican State of Guerrero. *J. Trop. Med. Hyg.* 93: 341-346.
- 3) Andrews N.W., C.K. Abrams, S.L. Slatin and G. Griffiths. 1990. A *T. cruzi*-Secreted Protein Immunologically Related to the Complement Component C9: Evidence for Membrane Pore-Forming Activity at Low pH. *Cell*. 61: 1277-1287.
- 4) Asin S.N. and S.S. Catalá. 1991. Are Dead *Triatoma infestans* a Competent Vector of *Trypanosoma cruzi*? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 86: 301-305.
- 5) Baker J.R. 1982. *The Biology of Parasitic Protozoa*. Photobooks Ed. England. pp1-59.
- 6) Bazin H., A. Beckers, C. Deckers. and M. Moriamé. 1973. Transplantable Immunoglobulin-Secreting Tumours in Rats. *J. Nat. Cancer. Inst.* 51: 1359-1361.
- 7) Beltz L.A., M.B. Sztejn and F. Kierszenbaum. 1988. Novel Mechanism for *Trypanosoma cruzi*-Induced Suppression of Human Lymphocytes. *J. Immunol.* 141: 289-294.
- 8) Beltz L.A., F. Kierszenbaum and M.B. Sztejn. 1989. Selective Suppressive Effects of *Trypanosoma cruzi* on Activated Human Lymphocytes. *Infect. Immun.* 57: 2301-2305.
- 9) Bollag D.M. and S.J. Edelstein. 1991. *Protein Methods*. Ed. Willey-Liss., U.S.A., New York. 386pp.
- 10) Brabin L. 1993. *Trypanosoma cruzi* Infection in Women. *Parasitol. Today*. 9: 198-199.
- 11) Bradford M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantization of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 12) Brendel V., J. Dohlman, B.E. Blaisdell and S. Karlin. 1991. Very Long Charge Runs in Systemic Lupus Erythematosus-Associated Autoantigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 1536-1540.
- 13) Brener Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.* 27: 347-332.

- 14) Brener Z. 1980. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.* **18**: 247-291.
- 15) Burnet F.M. 1957. *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. Vanderbilt University Press. Nashville, Tn. 85pp.
- 16) Burnette W.N. 1981. 'Western Blotting': Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. *Anal. Biochem.* **112**: 195-203.
- 17) Campetella O., D. Sánchez, J.J. Cazzulo and A.C.C. Frasch. 1992. A Superfamily of *Trypanosoma cruzi* Surface Antigens. *Parasitol. Today.* **8**: 378-381.
- 18) Cerrone M.C. and R.E. Kuhn. 1991. Macrophage Regulation of Immune Responses of Spleen Cells from Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Immunol.* **138**: 423-436.
- 19) Choromanski L. and R.E. Kuhn. 1985. Interleukin-2 Enhances Specific and Non-Specific Immune Responses in Experimental Chagas' Disease. *Infect. Immun.* **10**: 110-116.
- 20) Cooper R., A. Ribeiro de Jesús and G.A.M. Cross. 1993. Deletion of an Immunodominant *Trypanosoma cruzi* Surface Glycoprotein Disrupts Flagellum-Cell Adhesion. *J. Cell. Biol.* **122**: 149-156.
- 21) Couto A.S., A.M. Katzin, W. Colli and R.M. de Lederkremer. 1987. Sialic Acid in a Complex Oligosaccharide Chain of the Tc-85 Surface Glycoprotein from the Trypomastigote Stage of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **26**: 145-154.
- 22) Cross G. A. M. 1990. Cellular and Genetic Aspects of Antigenic Variation in Trypanosomes. *Ann. Rev. Immunol* **8**: 83-110.
- 23) Cuatrecasas P., M. Wilchek and C.B. Anfinsen. 1968. Selective Enzyme Purification by Affinity Chromatography. *Biochemistry* **61**: 636-643.
- 24) Cunningham D.S., R.E. Kuhn, R.L. Tarleton and R.S. Dunn. 1981. *Trypanosoma cruzi*: Effect on B-Cell-Responsive and -Responding Clones. *Exp. Parasitol* **51**: 257-268.
- 25) D'Imperio Lima M.R., H. Eisen, P. Minoprio, M. Joskowicz and A. Coutinho. 1986. Persistence of Polyclonal B Cell Activation with Undetectable Parasitemia in Late Stages of Experimental Chagas' Disease. *J. Immunol.* **137**: 353-356.
- 26) Englund P., S. Hajduk and C. Marini. 1982. The Molecular Biology of Trypanosomes. *Ann. Rev. Biochem.* **51**: 695-726.
- 27) Fernández M.A., M.A. Muñoz-Fernández and M. Fresno. 1993.

Involvement of $\beta 1$ integrins in the binding and entry of *Trypanosoma cruzi* into human macrophages. *Eur. J. Immunol.* **23**: 552-557.

28) Frasch A.C.C., J.J. Cazzulo, L. Åslund and U. Pettersson. 1991. Comparison of Genes Encoding *Trypanosoma cruzi* Antigens. *Parasitol. Today.* **7**: 148-151.

29) Goldsmith R.S., R. Zárate, I. Kagan, J. Cedeño-Ferreira, M. Galindo-Vasconcelos and E.A. Paz. 1978. El Potencial de la Transmisión en la Enfermedad de Chagas por Transfusión Sanguínea. *Sal. Púb. Méx.* **XX**: 439-444.

30) Harel-Bellan A., M. Joskowicz, D. Fradelizi and H. Eisen. 1983. Modification of T-Cell Proliferation and Interleukin 2 Production in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 3466-3469.

31) Harlow E. and D. Lane. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. USA. pp726.

32) Hernández-Munain C., M.A. Fernández, A. Alcina and M. Fresno. 1991. Characterization of a Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Membrane Protein from *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* **59**: 1409-1416.

33) Hernández-Munain C., J.L. De Diego, A. Alcina and M. Fresno. 1992. A *Trypanosoma cruzi* Membrane Protein Shares an Epitope with a Lymphocyte Activation Antigen and Induces Crossreactive Antibodies. *J. Exp. Med.* **175**: 1473-1482.

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

35) Kahn S., W.C. Van Voorhis and H. Eisen. 1990. The Major 85-kD Surface Antigen of the Mammalian form of *Trypanosoma cruzi* is Encoded by a Large Heterogeneous Family of Simultaneously Expressed Genes. *J. Exp. Med.* **172**: 589-597.

36) Kahn S., M. Kahn and H. Eisen. 1992. Polyreactive autoantibodies to negatively charged epitopes following *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur. J. Immunol.* **22**: 3051-3056.

37) Katzin A.M. and W. Colli. 1983. Lectin Receptors in *Trypanosoma cruzi*: an N-Acetyl-D-Glucosamine Containing Surface Glycoprotein Specific for the Trypomastigote Stage. *Biochim. Biophys. Acta.* **727**: 403-411.

38) Kennett R.H. 1978. Cell Fusion. *Methods. Enzymol.* **58**: 345-359.

- 39) Kierszenbaum F., M.B. Sztejn and L.A. Beltz. 1989. Decreased Human IL-2 Receptor Expression Due to a Protozoan Pathogen. *Immunol. Today*. 10: 129-131.
- 40) Kierszenbaum F. and M.B. Sztejn. 1990. Mechanisms Underlying Immunosuppression Induced by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today*. 6: 261-265.
- 41) Kierszenbaum F., E. Moretti and M.B. Sztejn. 1991. *Trypanosoma cruzi* Induces Suppression of DNA Synthesis and Inhibits Expression of Interleukin-2 Receptors by Stimulated Human B Lymphocytes. *Immunol*. 74: 317-322.
- 42) Koberle F. 1968. Chagas'Disease and Chagas'Syndromes: The Pathology of American Trypanosomiasis. *Adv. Parasitol*. 6: 63-116.
- 43) Köhler G. and C. Milstein. 1975. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature*. 256: 495-497.
- 44) Laemmli U.K. 1970. Cleavage of Structured Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- 45) Lanar D.E. and J.E. Manning. 1984. Major Surface Proteins and Antigens on the Different *in vivo* and *in vitro* Forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 11: 119-131.
- 46) Levine N.D., J.O. Corliss, F.E.G. Cox, G. Deroux, J. Grain, B.M. Honigberg, G.F. Leedale, A.R. Loeblich, J. Lom, D. Lynn, E.G. Merinfeld, E.C. Page, G. Poljansky, V. Sprague, J. Vavra and F.G. Wallace. 1980. A Newly Revised Classification of the Protozoa. *J. Protozool*. 27: 37-58.
- 47) Littlefield J.W. 1964. Selection of Hybrids from Matings of Fibroblasts *in vitro* and their Presumed Recombinants. *Science*. 145: 709-712.
- 48) Lima A.P., J. Scharfstein, A.C. Storer and R. Ménard. 1992. Temperature-Dependent Substrate Inhibition of the Cysteine Proteinase (GP57/51) From *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 56: 335-338.
- 49) López O.V. 1994. Caracterización Biológica "In Vitro" De 17 Cepas Mexicanas De *Trypanosoma cruzi*. *Tesis Prof. Fac. Ciencias. U.N.A.M.* pp94.
- 50) Locksley R.M., S.L. Reiner, F. Hatam, D.R. Littman and N. Killeen. 1993. Helper T Cells Without CD4: Control of Leishmaniasis in CD4-Deficient Mice. *Science*. 261: 1448-1454.
- 51) Margulis L. y M. Schwarts. 1981. *Cinco Reinos*. Omega. Madrid. pp320.

- 52) Marsden P.D. 1988. South American Trypanosomiasis and Leishmaniasis. En: *The Biology of Parasitism*. P.T.Englund and A. Sher (Ed). Alan R. Liss. New York. pp77-92.
- 53) Martínez P.J.A. y M.E. Gutiérrez. 1985. *Introducción a la Parasitología*. Trillas. México. pp72-78.
- 54) Matsumoto T.K., S. Hoshino-Shimizu, P.M. Nakamura, H.F.Jr. Andrade and E.S. Umezawa. 1993. High Resolution of *Trypanosoma cruzi* Amastigote Antigen in Serodiagnosis of Different Clinical Forms of Chagas' Disease. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1486-1492.
- 55) McGhee M. B. and W.B. Cosgrove. 1980. Biology and Physiology of the Lower Trypanosomatidae. *Microbiol. Rev.* **44**: 140-173.
- 56) Milon G. and J. Louis. 1993. CD8⁺ T Cells and Immunity to Intracellular Pathogens. *Parasitol. Today.* **6**: 196-197.
- 57) Minoprio P., S. Itohara, C. Heusser, S. Tonegawa and A. Coutinho. 1989. Immunobiology of Murine *T. cruzi* Infection: The Predominance of Parasite-Nonspecific Responses and the Activation of TCRI T Cells. *Immunol. Rev.* **112**: 182-207.
- 58) Molyneux D. H., and R.W. Ashford. 1983. *The Biology of Trypanosoma and Leishmania Parasites of Man and Domestic Animals*. Ed. Taylor & Francis. London. pp220.
- 59) OPS. 1990. *Las Condiciones de Salud en las Américas*. Vol. I. OPS. pp171-174.
- 60) Opperdoes R.F. 1987. Compartmentation of Carbohydrate Metabolism in Trypanosomes. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 127-151.
- 61) Ortega C.J. 1980. Determinación Electroforética de Patrones Isoenzimáticos de Aislados Mexicanos de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Prof. Fac. Química, U.N.A.M. pp48.
- 62) Paranhos G.S., P.C. Cotrim, R.A. Mortara, A. Rassi, R. Corral, H.L. Freilij, S. Grinstein, J. Wanderley, M.E. Camargo and J.F. Da Silveira. 1990. *Trypanosoma cruzi*: Cloning and Expression of an Antigen Recognized by Acute and Chronic Human Chagasic Sera. *Exp. Parasitol.* **71**: 284-293.
- 63) Pereira M. E. and R. Hoff. 1986. Heterogeneous distribution of neuraminidase activity in strains and clones of *Trypanosoma cruzi* an its possible association with parasite myotropism. *Mol. Biochem. Parasitol.* **20**: 183-188.
- 64) Pereira M.E. 1988. Does *Trypanosoma cruzi* Modulate Infection by Inherent Positive and Negative Control Mechanisms?. En: *The Biology of Parasitism*. P.T.Englund y A. Sher (Ed). Alan R. Liss. New York. pp 105-109.

- 65) Petry K. and H. Eisen. 1989. Chagas Disease: A Model for the Study of Autoimmune Diseases. *Parasitol. Today*. 5: 111-115.
- 66) Poste G. 1972. Mechanisms of Virus-Induced Cell Fusion. *Int. Rev. Cytol.* 33: 157-237.
- 67) Potter M. 1972. Immunoglobulin-Producing Tumors and Myeloma Proteins of Mice. *Physiol. Rev.* 52: 631-719.
- 68) Prioli R. P., J.S. Mejia and M.E. Pereira. 1990. Monoclonal Antibodies Against *Trypanosoma cruzi* Neuraminidase Reveal Enzyme Polymorphism, Recognize a Subset of Trypomastigotes, and Enhance Infection in vitro. *J. Immunol.* 144: 4384-4391.
- 69) Ramirez M.I., R.D. Ruiz, J.E. Araya, J.F. Da Silveira and N. Yoshida. 1993. Involvement of the Stage-Specific 82-Kilodalton Adhesion Molecule of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes in Host Cell Invasion. *Infect. Immun.* 61: 3636-3641.
- 70) Ramos C., I. Schädler-Siwon and L. Ortiz-Ortiz. 1979. Suppressor Cells Present in the Spleens of *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice. *J. Immunol.* 122: 1243-1247.
- 71) Ramos R., M. Juri, A. Ramos, G. Hoeker, S. Lavandero, P. Pena, A. Morello, Y. Repetto, J.C. Aguillon and A. Ferreira. 1991. An Immunogenetically Defined and Immunodominant *Trypanosoma cruzi* Antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44: 314-322.
- 72) Rao P.N. and R.T. Johnson. 1970. Mammalian Cell Fusion: Studies on the Regulation of DNA Synthesis and Mitosis. *Nature.* 225: 159-161.
- 73) Reed S.G., S. B. Roters and E.A. Goidl. 1983. Spleen Cell-Mediated Suppression of IgG Production to a Non-Parasite Antigen During Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. *J. Immunol.* 131: 1978-1982.
- 74) Reed S.G., K.H. Grabstein, D.L. Pihl and P.J. Morrissey. 1990. Recombinant Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Restores Deficient Immune Responses in Mice with Chronic *Trypanosoma cruzi* Infections. *J. Immunol.* 145: 1564-1570.
- 75) Requena J.M., A. Jiménez-Ruiz, M. Soto, R. Assiego, J.F. Santarén, M.C. López, M.E. Patarroyo and C. Alonso. 1992. Regulation of hsp70 Expression in *Trypanosoma cruzi* by Temperature and Growth Phase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53: 201-212.
- 76) Reyes P.A., C.M. Mendoza, J. Marcuschamer y C.Z. García. 1983. Miocardiopatía Congestiva y Tripanosomiasis Americana. *Sal. Púb. Méx.* 25: 139-144.

- 77) Ribeiro de Jesús, A., R. Cooper, M. Espinosa, J.E.P.L. Gómes, E.S. García, S. Paul and G.A.M. Cross. 1993. Gene Deletion Suggests a Role for *Trypanosoma cruzi* Surface Glycoprotein GP72 in the Insect and Mammalian Stages of the Life Cycle. *J. Cell. Sci.* **106**: 1023-1033.
- 78) Salazar S.P.M., A.I. De Haro, J.J. Martínez y C.E. García. 1983. Dos Nuevas Localizaciones de Transmisores de la Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Sal. Púb. Méx.* **25**: 77-82.
- 79) Salazar S.P.M., A.I. De Haro, and B.T. Uribarren. 1988. Chagas Disease in Mexico. *Parasitol. Today.* **4**: 348-351.
- 80) Santos-Buch C.A., A.M. Acosta, H.J. Zweerink, M. Sadigursky, O.F. Andersen, B.F. von Kreuter, C.I. Brodskyn, C. Sadigursky and R.J. Cody. 1985. Primary Muscle Disease: Definition of a 25-kDa Polypeptide Myopathic Specific Chagas Antigen. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **37**: 334-350.
- 81) Schmunis G. 1987. Autoimmunity in Chagas' Disease. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **82**: 287-292.
- 82) Schenkman S. and D. Eichinger. 1993. *Trypanosoma cruzi* Transsialidase and Cell Invasion. *Parasitol. Today.* **9**: 218-222.
- 83) Silva J.S., P.J. Morrissey, K.H. Grabstein, K.M. Mohler, D. Anderson and S.G. Reed. 1992. Interleukin 10 and Interferon Gamma Regulation of Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Exp. Med.* **175**: 169-174.
- 84) Simpson L. 1987. The Mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 363-382.
- 85) Soong L. and R.L. Tarleton. 1992. Selective Suppressive Effects of *Trypanosoma cruzi* Infection on IL-2, c-myc, and c-fos Gene Expression. *J. Immunol.* **149**: 2095-2102.
- 86) Szein M.B., W.R. Cuna and F. Kierszenbaum. 1990. *Trypanosoma cruzi* Inhibits the Expression of CD3, CD4, CD8, and IL-2R by Mitogen-Activated Helper and Cytotoxic Human Lymphocytes. *J. Immunol.* **144**: 3558-3562.
- 87) Szein M.B. and F. Kierszenbaum. 1993. Mechanisms of Development of Immunosuppression During *Trypanosoma* Infections. *Parasitol. Today.* **9**: 424-428.
- 88) Tambourgi D.V., T.L. Kipins, W.D. Da Silva, K.A. Joiner, A. Sher, S. Heat, B.F. Hall and G.B. Ogden. 1993. A Partial cDNA Clone of Trypomastigote Decay-Accelerating Factor (T-DAF), a Developmentally Regulated Complement Inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has Genetic and Functional Similarities to the Human Complement Inhibitor DAF. *Infect. Immun.* **61**: 3656-3663.

- 89) Tarleton R.L. and R.E. Kuhn. 1985. Measurement of Parasite-Specific Immune Responses *in vitro*: Evidence for Suppression of the Antibody Response to *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Immunol.* **15**: 845-850.
- 90) Tay J. 1980. Evolución de *T. cruzi*, Cepa Mexicana en el Huésped Vertebrado, Invertebrado e *in vitro*. *Sal. Púb. Méx.* **XXII**: 513-520.
- 91) Teixeira M.M.G. and N. Yoshida. 1986. Stage-specific Surface Antigens of Metacyclic Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* Identified by Monoclonal Antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* **18**: 271-282.
- 92) Towbin H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 4350-4354.
- 93) Velasco-Castrejón O. y C. Guzmán-Bracho. 1986. Importancia de la Enfermedad de Chagas en México. *Rev. Latinoamer. Microbiol.* **28**: 275-283.
- 94) Velasco-Castrejón O., B.C. Guzmán, R.J. Cruz, O.O. López, y G.F. Domínguez. 1991. La Enfermedad de Chagas. *INDRE.* 56pp.
- 95) Venkatesan P. and D. Wakelin. 1993. ELISAs for Parasitologists. *Parasitol. Today.* **9**: 228-232.
- 96) Villalta F., M.F. Lima, S.A. Howard, L. Zhou and A. Ruiz-Ruano. 1992. Purification of a *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote 60-Kilodalton Surface Glycoprotein That Primes and Activates Murine Lymphocytes. *Infect. Immun.* **60**: 3025-3032.
- 97) Voller A., A. Bartlett and D.E. Bidwell. 1978. The Use of the Enzyme-linked Immunosorbent Assay in the Serology of Viral and Parasitic Diseases. *Scand. J. Immunol.* **8**: (supp.7): 125-129.
- 98) Wilchek M., T. Miron and J. Kohn. 1984. Affinity Chromatography. *Methods Enzymol.* **104**: 3-55.
- 99) Wilson K. 1992. Short Protocols in Molecular Biology. *Harvard Medical School Ed.* New York. pp. 10.5-11.36.
- 100) Wood J.N., L. Hudson, T.M. Jessell and M. Yamamoto. 1982. A Monoclonal Antibody Defining Antigenic Determinants on Subpopulations of Mammalian Neurons and *Trypanosoma cruzi* Parasites. *Nature.* **296**: 34-37.
- 101) Woodward M.P., W.W.Jr. Young and R.A. Bloodgood. 1985. Detection of Monoclonal Antibodies Specific for Carbohydrate Epitopes Using Periodate Oxidation. *J. Immunol. Methods.* **78**: 143-153.

102) Yoshida N., R.A. Mortara, M.F. Araguth, J.C. Gonzalez and M. Russo. 1989. Metacyclic Neutralizing Effect of Monoclonal Antibody 10D8 Directed to the 35- and 50-Kilodalton Surface Glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 57: 1663-1667.

103) Zavala-Velázquez J., M.H. Rodríguez-López y A. Baqueiro. 1975. Enfermedad de Chagas en el Estado de Yucatán, México. *Patología.* 13: 355-363.

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

105) Zingales B., N.W. Andrews, V.Y. Kuwajima and W. Colli. 1982. Cell Surface Antigens of *Trypanosoma cruzi*: Possible Correlation with the Interiorization Process in Mammalian Cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6: 111-124.