



11261

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

13
2es.

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“UTILIZACIÓN DE UN ANTÍGENO DE *Critidia luciliae* PARA
EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS”**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biomédicas

Área Inmunología

Presenta la Q.F.B.

Liliana Guzmán Rojas

**DIRECTOR DE TESIS
TUTOR INTERNO
TUTOR EXTERNO**

**Dr. Pedro A. Reyes López
Dr. Victor Monteón Padilla
Dr. José L. Rosales Encinas**

**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
“IGNACIO CHAVEZ”**

México, D.F.

julio 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

263003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGIA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ", BAJO LA ASESORIA DEL DR. PEDRO A. REYES LOPEZ Y DEL DR. VICTOR MONTEON PADILLA, ASI COMO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL DEL "CINVESTAV", BAJO LA ASESORIA DEL DR. JOSE LUIS ROSALES ENCINAS.

INDICE

RESUMEN

I INTRODUCCION	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Ciclo Biológico	1
1.3 Fases de la enfermedad	3
1.4 Mecanismos de Transmisión	4
1.5 Patogenia	5
1.6 Inmunología	8
1.7 Diagnóstico de Laboratorio	13
1.8 Tratamiento	17
1.9 Profilaxis	19
II ANTECEDENTE	20
III JUSTIFICACION	22
IV HIPOTESIS	23
V OBJETIVOS	24
VI METODOLOGIA	25
6.1 Parásitos	25
6.2 Preparación de Medios de Cultivo	25
6.3 Extractos Antigénicos	26
6.4 Sueros Humanos	26
6.5 Sueros de Conejo	27
6.6 ELISA en Placa	27
6.7 Inmunofluorescencia Indirecta	28
6.8 Electroinmunotransferencia	28
6.9 Técnicas de Elución	28
6.10 Oxidación de Carbohidratos con Peryodato de Sodio ...	29
6.11 Digestión con Exo y Endo Glicosidasas	30
6.12 Marcaje con I ¹²⁵ de las Proteínas de Superficie	30
6.13 Inmunoprecipitación	31
6.14 Inmunodetección en Genotecas	31
6.15 Tratamiento Estadístico	32
VII RESULTADOS	
7.1 Sensibilidad y Especificidad	33
7.2 Patrón Antigénico Reconocido por los Sueros de Pacientes Chagásicos Crónicos	34

7.3	Homología de la GP30 con otras Proteínas Tanto de <i>T. cruzi</i> como de <i>C. luciliae</i> .	38
7.4	Efecto del Peryodato sobre la Unión Antígeno Anticuerpo	39
7.5	Efecto del algunas Enzimas en el Reconocimiento de las gps por Anticuerpos.....	45
7.6	Localización de la GP30 en <i>C. luciliae</i> y su Homóloga en <i>T. cruzi</i>	46
VIII	DISCUSION	52
IX	BIBLIOGRAFIA	57
X	APENDICE	71

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una de las enfermedades más importantes en el mundo. El diagnóstico en la etapa crónica e indeterminada se basa en la confirmación serológica de la exposición a *T. cruzi*, pero debido a que los métodos serológicos y los antígenos hasta hoy empleados no han mostrado la especificidad deseada, por reacción cruzada con otros tripanosomátidos, se continúa aún la búsqueda de mejores antígenos. Recientemente se han utilizado distintas proteínas purificadas y recombinantes para este fin.

Como una alternativa para obtener mejores antígenos, se utilizó un antígeno de *C. luciliae*, Tripanosomátido de insectos no patógeno al humano, cuya reacción cruzada con *T. cruzi* se comprobó desde la década de los 70's, además de tener la gran ventaja de crecer en un tiempo más corto que *T. cruzi* y su no patogenicidad para el hombre, que lo hace fácilmente manejable en el laboratorio y sin riesgo de infección. En ensayos de ELISA utilizando este antígeno mostró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 83% al probarse 91 sueros de pacientes con Chagas y 127 sueros de pacientes con otras enfermedades, de los que 21 eran pacientes con toxoplasmosis, 32 con leishmaniosis, 33 con enfermedades reumáticas sistémicas y 41 cardiopatas no chagásicos. Por análisis con Western blot se reconoció una banda inmunodominante de 30 kDa por sueros de pacientes chagásicos sobre el extracto crudo de *C. luciliae*, que alcanzó una especificidad del 97% en el reconocimiento de esta banda. Al estudiar la estructura bioquímica de esta proteína, se observó que los carbohidratos que forman parte de ella, no están involucrados en el reconocimiento de esta banda de 30kDa por los sueros de pacientes chagásicos.

La búsqueda del gen homólogo al de la gp de 30 kDa de *C. luciliae* en una biblioteca de ADNc de *T. cruzi*, con el uso de anticuerpos dirigidos contra esta banda, no fue exitosa, pero con la utilización de técnicas más sensibles podría obtenerse el gen esta proteína de 30kDa, generarla en forma recombinante y emplearla para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en pacientes cardiopatas que ingresen al Instituto de Cardiología "Ignacio Chávez".

JURADO

PRESIDENTE	Dr. Victor Monteón Padilla
SECRETARIO	Dr. Jose Luis Rosales Encinas
PRIMER VOCAL	Dr. Pedro A. Reyes López
SUPLENTE	Dra. Bertha Espinosa González
SUPLENTE	Dr. Roberto Hernández Fernández

1 INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES

La enfermedad de Chagas o Tripanosomosis Americana es considerada una de las seis enfermedades tropicales más importantes en el mundo⁹². Esta zoonosis afecta al hombre y a mamíferos que se consideran reservorios y juegan un papel muy importante en la diseminación de la enfermedad. El agente etiológico es un flagelado del orden Kinetoplástida, el *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*

Son agentes transmisores de *T. cruzi*, los triatomíneos de la familia Reduviidae. Las 118 especies de estos triatomíneos están agrupadas en 5 tribus y 14 géneros. Los géneros más importantes son *Rhodnius*, *Prastongylus* y *Triatoma*. Dentro de los géneros están incluidos 100 especies, de las cuales aproximadamente 16 son importantes epidemiológicamente en diversos países de Centro y Sudamérica así como en México^{149,181}

En 1907 Carlos Chagas en Minas Gerais Brasil, observó una gran cantidad de reduvidos que infectaban las casas de las zonas rurales, encontrando flagelados en el intestino de estos insectos. En 1908 describió el primer caso de Tripanosomosis humana, en una niña de dos años³¹ y en un periodo de dos años describe las características de la enfermedad, por lo que el padecimiento lleva su nombre.

En la actualidad se estima que de 16 a 18 millones de personas están infectados, de los cuales 3 a 5 millones pueden presentar complicaciones crónicas. Por otro lado, estudios epidemiológicos indican que la incidencia de infección es cerca de un millón de casos al año¹⁰⁸. En la mayoría de los individuos infectados, durante muchos años (fase crónica) existe una carga de parásitos baja y pueden presentar parasitemia esporádica, escasa y autolimitada. Aproximadamente solo 15 al 20% de los individuos en la fase indeterminada desarrollan enfermedad crónica¹²⁹

1.2 CICLO BIOLÓGICO

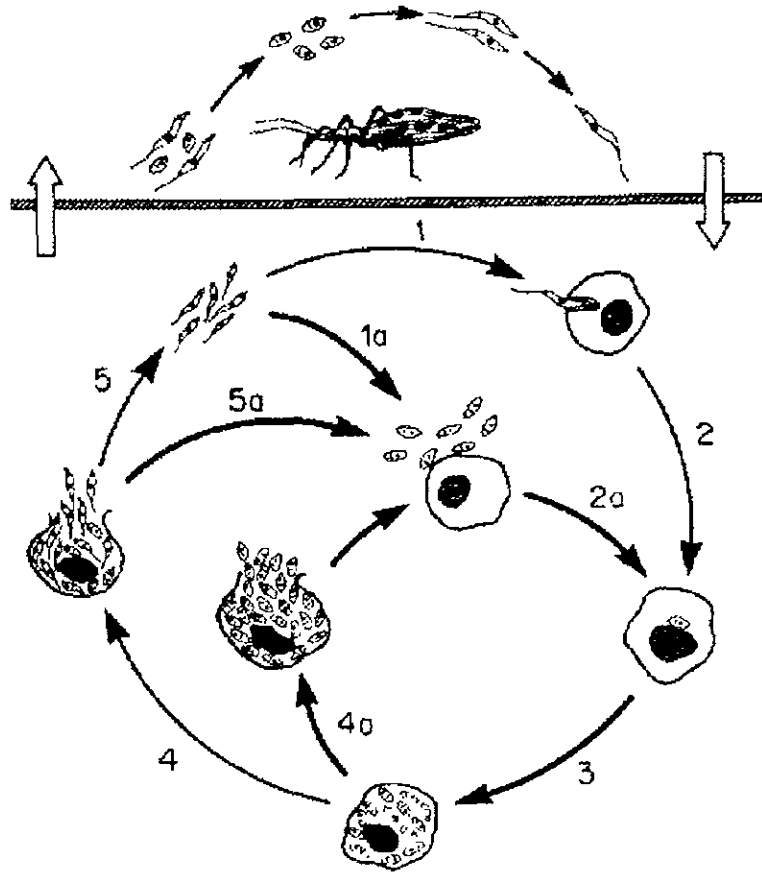
T. cruzi es un parásito que durante uno de los estadios de su vida vive en la sangre y/o en tejidos de una gran variedad de vertebrados y durante otros estadios, habita en el intestino de los triatomíneos hematófagos¹⁴⁶. La estrategia que les asegura el éxito a los parásitos protozoarios, es la capacidad que tienen de transformación o adaptación a cambiar según cambie su medio ambiente.

1.2.1 CICLO DE VIDA DE T. cruzi EN EL HUESPED INVERTEBRADO (Triatomino)

En 1979 Dias⁴⁶ hizo una descripción clara sobre el ciclo de vida de *T. cruzi* en el huésped invertebrado. El ciclo de vida comienza cuando el triatomino ingiere la sangre de humanos o animales mamíferos infectados, en la cual se encuentran los tripomastigotes sanguíneos, que es la fase infectiva para el insecto; en esta fase el parásito mide aproximadamente 20-25 micras de longitud, contiene un cinetoplasto grande situado en el polo anterior de la célula del cual sale una membrana ondulante que se convierte en flagelo y no es capaz de dividirse ya que no sintetiza ADN¹⁶. En el tubo digestivo del insecto se inician dos ciclos vitales paralelos, al transformarse el tripomastigote tanto en epimastigotes como en esferomastigotes¹⁵¹, las cuales pueden identificarse desde el estómago hasta el recto del transmisor. En el intestino los epimastigotes se dividen activamente por fisión binaria longitudinal, estos miden 25-30 micras, tienen un cinetoplasto anteronuclear y poseen una membrana ondulante que en el extremo de la célula se convierte en flagelo. Al final del ciclo, tanto el epimastigote como el esferomastigote se convierten en tripomastigotes metacíclicos que son eliminados por las heces y constituyen la fase infectiva para el mamífero.

1.2.2 CICLO DE VIDA DE T. cruzi EN EL HUESPED VERTEBRADO

Durante o poco después de alimentarse el triatomino infectado, de un huésped vertebrado sano, libera al defecar los tripomastigotes metacíclicos, que penetran al vertebrado ya sea por el lugar de picadura, por mucosas, o cualquier sitio donde se rompan las barreras naturales de la piel. el parásito mide aproximadamente de 20-25 micras de longitud, es fusiforme y tiene un cinetoplasto grande, colocado en el polo posterior de la célula, del cual sale una membrana ondulante que se convierte en flagelo. Una vez que penetran los tripomastigotes metacíclicos a las células del mamífero, se transforman en amastigotes, fase que mide 2-4 micras de diámetro, tiene un gran núcleo excéntrico y carece de flagelo libre; el amastigote se multiplica rápidamente por fisión binaria en las células del mamífero, de donde son liberados al torrente sanguíneo transformándose en tripomastigotes sanguíneos y permanecen así cierto tiempo antes de penetrar a otros tejidos, para multiplicarse nuevamente como amastigotes. El ciclo se completa cuando un triatomino libre de infección se alimenta de un mamífero infectado, ingiriendo así los tripomastigotes sanguíneos que es la fase infectiva para el insecto, los parásitos realizan una serie de diferenciaciones en el tubo digestivo del triatomino, para aparecer de nuevo como tripomastigotes metacíclicos en las heces del insecto¹⁶.



En el paso 1 los tripomastigotes metacíclicos que se liberan en las heces del insecto entran al vertebrado por el orificio de alimentación u otra herida infectando células del hospedero: paso 2 los parásitos escapan de la vacuola y se transforman en amastigotes, paso 3 se replican en el citoplasma, paso 4 se diferencian en tripomastigotes prociencias, paso 5 son liberados al romperse la célula hospedera, pasos 4a y 5a un subciclo alternativo en el vertebrado ocurre cuando los amastigotes se liberan a partir de una ruptura prematura o (paso 1a) cuando se diferencian extracelularmente en amastigotes, en este caso son ingeridos por macrófagos pero sobreviven y completan el ciclo (Tomado de Burleigh, B. y Andrews, N. ; 1995)

1.3 FASES DE LA ENFERMEDAD

1.3.1 FASE AGUDA

En la fase aguda tras un periodo de incubación asintomático, entre 4 a 10 día, se presenta malestar general, fiebre, miopatía, adeno, hepato y esplenomegalia y en ocasiones meningo-encefalitis y carditis; este cuadro complejo sólo es diagnosticado correctamente en el 1% de los casos agudos

Esta fase puede presentarse en cualquier edad, pero en zonas endémicas se detecta principalmente en personas menores de quince años. En menores de dos años puede ser fatal hasta en 10 a 15% de los casos. La duración del periodo febril entre dos a cuatro semanas guarda relación con la parasitemia.

1.3.2 FASE CRONICA INDETERMINADA

Después de 8 a 10 semanas post-infección se establece la fase indeterminada, que se caracteriza por ausencia de síntomas, en esta fase ya se puede demostrar la presencia de anticuerpos contra el parásito en suero y la parasitemia solo es demostrable por xenodiagnóstico en el 20 a 60% de los casos²⁷.

1.3.3 FASE CRONICA SINTOMATICA

El 15 a 20% de los individuos con fase indeterminada evolucionan a la fase sintomática. Las manifestaciones clínicas de esta fase se presentan después de 20 a 30 años de infección, y es la cardiomiopatía la más frecuente y conocida; en donde los síntomas dependen del grado de daño al miocardio¹⁷. También son comunes las manifestaciones digestivas, como el megaesófago y megacolon, que son el resultado de la destrucción del plexo mientérico por lo que se presentan alteraciones en la movilidad del tracto digestivo.

1.4 MECANISMOS DE TRANSMISION

Desde 1909 se sabe que el mecanismo natural de transmisión al hombre, es por medio de los triatomos infectados, pero también se han descrito otras vías de transmisión.

1.4.1 TRANSFUSION SANGUINEA

Mazza¹⁰⁰ en 1940 fue el primero en mencionar la posibilidad de transmisión por esta vía, que tiene gran importancia debido a la migración de individuos de áreas rurales endémicas a áreas no urbanas. Cerisola y col²⁵ verificaron que el riesgo de infección aumenta proporcionalmente con el número de transfusiones y que los parásitos permanecen viables hasta 18 días en las condiciones de almacenamiento en los bancos de sangre. Actualmente se reconoce como la segunda vía de transmisión en importancia^{148 174}.

1.4.2 TRANSPLACENTARIA

El primer registro de infección Chagásica congénita fue realizado por Carlos Chagas en 1911³². La transmisión por esta vía estudiando los hijos nacidos de madres con serología positiva, oscila según las diversas publicaciones entre el 1% y el 4%, encontrándose distintos datos según la zona geográfica estudiada. Aún no se conocen cuáles son los mecanismos propios del parásito o del huésped por los cuales se produce la infección en algunos y no en todos los hijos de madres Chagásicas¹⁵⁸.

1.4.3 POR LECHE MATERNA

Este mecanismo de transmisión es aún controversial, debido a que se han descrito casos de transmisión durante la lactancia, sin embargo, no se ha podido demostrar experimentalmente. La escasa frecuencia de transmisión por esta vía, hace que se considere como un mecanismo de transmisión excepcional¹⁵⁸.

1.4.4 TRANSPLANTE DE ORGANOS

Este mecanismo de transmisión actualmente es de gran importancia debido al incremento en los trasplantes, siendo una situación muy parecida a las hemotransfusiones. El riesgo se incrementa debido a la terapia inmunosupresora administrada al receptor del órgano, originando una infección aguda grave que puede ser fatal, por lo que se tiene que tener mucho cuidado en la elección de donadores de órganos¹²⁸.

1.4.5 DIGESTIVA

Son muchos los estudios que demuestran experimentalmente la infección de *T. cruzi* a través del tracto digestivo en diversas especies animales y bajo las más variadas formas de ingestión¹⁵⁸. La infección humana con *T. cruzi* por vía buco-gastroentérica fue supuesta por Mazza y actualmente ha sido ampliamente demostrada con la aparición de casos clínicos y brotes epidémicos en Brasil¹⁵⁸.

1.4.6 ACCIDENTES EN EL LABORATORIO

Se han descrito varios casos de transmisión accidental en centros de investigación al manipular cultivos de *T. cruzi*, triatomas o animales infectados, al realizar necropsias sin guantes, extraer sangre de individuos infectados y por otras causas no previstas en cualquier laboratorio de estudio de Tripanosomosis¹⁵⁸.

1.5 PATOGENIA

La evolución lenta de la patología en la Miocardiopatía Chagásica Crónica (MChCr), así como la ausencia de un modelo experimental que la reproduzca satisfactoriamente, son unos de los principales problemas para su estudio. La gran información que de ella se tiene, ha sido de los estudios necropsícos en humanos. Se han sugerido seis mecanismos que pudieran explicar la patología de la enfermedad de Chagas:

- a) Lesión directa de tipo mecánico por parasitismo de las células con *T. cruzi*
- b) Lesión producida por toxinas liberadas por el parásito o por la interacción de este y la célula huésped

- c) Alteración del sistema nervioso autónomo
- d) Lesión inducida por respuesta autoinmune del huésped
- e) Lesión microvascular
- f) Teoría combinada o mixta

a) *LESION DIRECTA:*

En la etapa aguda hay gran proliferación de parásitos dentro de las células. los daños tisulares durante esta etapa pueden deberse a un efecto citopático del parásito, lo que resulta en una miocarditis y encefalitis que se observa en la mayoría de los casos agudos. y son provocadas por la respuesta inflamatoria inespecífica producida por la desintegración del parásito y de las células infectadas.

El crecimiento de los amastigotes dentro de las células. lleva a la formación de nidos de parásitos que evolucionan a formas flageladas que son liberadas del pseudoquiste y dejan una fibra ahuecada o un saco sarcolémico vacío; este mecanismo propuesto por Vianna¹⁷³, Mazza y Jorg¹⁰⁵, no concuerda etiopatológicamente con la gran extensión de la miocitosis y fibrosis en la etapa crónica, ya que aquí hay una presencia relativamente escasa o ausente de los nidos parasitarios. Además, a nivel experimental, se ha observado que los nidos de amastigotes alteran el metabolismo y funcionalidad celular, sin causar miocitolisis

b) *LESION POR TOXINA DE T. cruzi:*

Desde 1911 Vianna¹⁷³ propone la existencia de una toxina Chagásica responsable de la miocitolisis, que acompaña la ruptura del pseudoquiste, en 1956 Koberle⁷⁹ re-toma esta teoría que hasta la fecha no ha sido demostrada satisfactoriamente

c) *ALTERACIONES DEL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO:*

En 1961 Köberle y Alcántara⁸⁰ proponen la teoría de que la enfermedad de Chagas podría ser una verdadera neuropatía, sugiriendo que la aparición de las megavisceras y cardiopatía, son el resultado de la denervación por destrucción de las neuronas y fibras nerviosas de manera difusa

Aún hay duda para afirmar que la miocardiopatía Chagásica crónica se deba al daño de las neuronas autónomas cardíacas, ya que sólo el 30% del total de pacientes chagásicos crónicos presentan lesiones del sistema nervioso autónomo^{5,157}

d) *LESION INDUCIDA POR LA RESPUESTA AUTOINMUNE DEL HUESPED:*

En 1929 Magarinos-Torres postula un mecanismo alérgico en la patología de la MChCr. naciendo en ese momento las bases de la actual inmunopatología de la enfermedad de Chagas. Desde

1940 a 1943 Mazza y Jörg proponen la teoría alérgica-lesional, suponiendo los fenómenos granulomatosos y necróticos, a un choque antígeno anticuerpo¹⁰³.

En 1974 Cossio y col³⁸ demuestran por inmunofluorescencia indirecta la presencia de anticuerpos contra Endotelio, Vasos e Intersticio (EVI), en pacientes Chagásicos crónicos y agudos. La presencia de anticuerpos antinervios periféricos fué descrita en 1979 por Khoury y col⁷², así mismo Ribeiro Dos Santos y col.¹³⁴, demostraron la existencia de anticuerpos antineuronas. Posteriormente este grupo demostró que los anticuerpos EVI no reaccionaban con tejido humano, pero si con tejido de rata, lo que sugirió la naturaleza heterofílica del anticuerpo EVI, que lo transforma en un anticuerpo incapaz de cumplir un rol patogénico directo: esta misma observación se hizo también con anticuerpos antinervios periféricos. Otra de las moléculas involucradas en la patogenia de Chagas, por tener reacción cruzada con *T. cruzi*, es la laminina: el retículo sarcoplásmico y músculo esquelético, también participan en la patogenia.

Debido a que existen controversias entre los diferentes trabajos, los hallazgos solo sugieren que existen evidencias de alteraciones inmunes, ya que no hay una prueba concreta que afirme que la MChCr así como las megavisceras tengan una real patogénia autoinmune.

e) *LESION MICROVASCULAR.*

En 1958 Mangiros-Torres identificó en autopsias de pacientes con MChCr irregularidades y constricciones de las arteriolas intramiocárdicas⁹⁵. Jörg⁷⁰ describió en pacientes con MChCr una progresiva descapilarización con desorganización en la red capilar por infiltración inflamatoria, que sería co-causa de la miocitolisis focal. Por otro lado Rossi y col¹³⁹, hallaron agregados plaquetarios y trombos oclusivos en la microcirculación de ratones con enfermedad crónica y sugirieron que estas lesiones obstructivas podrían causar necrosis y degeneración miocárdica focal. Apartir de 1985 se empiezan a realizar una serie de trabajos experimentales que postulan a las alteraciones microvasculares en la patogenia de la MChCr.

En estudios en ratones y células endoteliales humanas, Morris, Tanowitz y Witter¹¹², sugieren una secuencia de eventos fisiopatogénicos, que consisten. 1) respuestas inmunes secundarias, 2) Infección de células endoteliales y miocitos, con alteraciones en la síntesis de la matriz celular, 3) Respuesta inflamatoria que potencia las interacciones entre plaquetas, granulocitos y células endoteliales, 4) Acción de la neuraminidasa del parásito, que removería residuos del ácido sialico de la superficie de los miocitos y células endoteliales, lo que altera la homeostasis intracelular de Ca⁺⁺. A pesar de los

esfuerzos hechos por varios investigadores, no tiene resultados convincentes para ser implicados como causa dominante en la patogenia de la enfermedad en humanos.

f) TEORIA COMBINADA O MIXTA:

Ninguna de las teorías antes mencionadas se ha demostrado contundentemente, ni explican por si solas la patogenia de la MChCr, por ello podría sugerirse que varios mecanismos podrian ser responsables del daño durante la etapa crónica de la enfermedad. Desde 1965 Jörg formuló la hipótesis de la teoría combinada o mixta⁷⁰ y recientemente Tafuri afirmó que “Tambien en la enfermedad de Chagas los mecanismos patogénicos deben ser multifactoriales”¹⁶⁴.

1.6 INMUNOLOGIA

1.6.1 MECANISMOS EFECTORES DE RESISTENCIA

El macrófago es una de las células importantes que actúa durante la resistencia a la infección, tanto como presentadores de antígenos del parásito, ó como célula efectora responsable de la destrucción de estos. Los tripomastigotes sanguíneos contienen glicoproteínas con actividad antifagocítica que los hace resistentes a la fagocitosis por los macrófagos¹⁵⁸, pero gracias a la acción opsonizadora de los anticuerpos y a la activación de los macrófagos por medio de linfocinas como son TNF α , GM-CSF, IL-4 y principalmente por el INF γ , producidas por los linfocitos T estimulados por componentes del parásito, aumentan la capacidad parasiticida del macrófago, debido a la producción de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico

Las células NK (Natural killer) juegan también un papel muy importante en la resistencia a la infección aguda con *T. cruzi*, su actividad aumenta a los pocos días de la infección y va acompañada con el aumento de los niveles séricos de INF α , β y γ ⁶³

El Complemento es otro de los mecanismos efectores, que a través de la vía alterna sin necesidad de anticuerpos lisa epimastigotes, pero la forma sanguínea, al igual que los tripomastigotes metacíclicos no son sensibles a la vía alterna y requieren la presencia de anticuerpos para ser lisados por la vía clásica^{60,62}, a pesar de esto se ha demostrado que en animales normales como en los deficientes de complemento, la susceptibilidad en la fase aguda es similar¹⁵⁸, lo que sugiere que los anticuerpos también están involucrados en la protección, ya que median las reacciones de citotoxicidad celular. Los distintos estadios del parásito son susceptibles de ser destruidos por este mecanismo que será distinto de acuerdo al tipo de célula efectora y su modulación por las linfocinas producidas por los linfocitos T

Uno de los mecanismos citotóxicos más importantes en las células fagocíticas y que tiene capacidad tripanocida, es aquel que es dependiente de oxígeno (O_2) y sus productos: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido (O_2^-), anión hidroxilo (OH) y oxígeno simple (O_2). El peróxido de hidrógeno parece ser la especie reactiva más importante en la destrucción intracelular de los tripanosomas en los macrófagos activados. Este metabolito es citotóxico para amastigotes, tripomastogotes y epimastigotes. En éstos últimos se ha visto que la falta de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa los hace susceptibles al peróxido de hidrógeno. Las deficiencias de estas enzimas en tripomastigotes y amastigotes están aún por estudiarse¹⁴.

La primoinfección con *T. cruzi* cursa con una fase aguda, donde se observa una parasitemia elevada, que generalmente es controlada por la respuesta inmune. después se establece una fase crónica en la que el huésped desarrolla una inmunidad que mantiene un balance entre la relación huésped parásito lo que lleva a la cronicidad de la enfermedad

En la etapa aguda se induce una activación policlonal, donde hay producción de anticuerpos polirreactivos de baja afinidad, que colaborarían inespecíficamente con procesos de opsonización y fagocitosis²⁴. La activación policlonal es seguida de una fase de inmunosupresión, cuyo defecto central sería la falta de producción de IL-2, así como de sus receptores. Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la disminución de IL-2 aún no se conocen, se sabe que no se debe a la disminución de las células que producen esta citocina, sino que podrían atribuirse a un efecto directo de componentes del parásito así como a células supresoras. Esta disminución de IL-2 es regulada a nivel transcripcional, ya que estudios realizados en linfocitos T de ratones infectados que al ser estimulados con mitógenos se encuentra poca o nula producción de RNAm de IL-2¹¹⁶, aunado al bloqueo de factores nucleares de transcripción que se unen a sitios "enhancers" en el gen de IL-2¹⁵⁸. La administración de IL-2 *in-vivo*, revierte parcialmente la inmunosupresión, disminuyendo también la parasitemia y mortalidad⁶⁷.

A pesar de la falta de IL-2 durante la fase aguda, que es necesaria como factor de crecimiento para las células productoras de INF γ , como los linfocitos T y las NK, los niveles de INF γ se encuentran aumentados, por los que podría creerse que hubiera otros factores que pudieran reemplazar a la IL-2¹⁵⁸

Así mismo se a visto que no hay activación de las funciones Th1, ya que están inhibidas las reacciones de hipersensibilidad retardada, y aunque las células de bazo murinas durante esta fase, disminuyen su proliferación, producen altos niveles de INF γ en respuesta a mitógenos y antígenos

parasitarios, por lo que podría pensarse que la fuente de INF γ proviene de linfocitos T CD4- y CD8-
116

Los títulos de anticuerpos específicos en humanos son elevados y generalmente la primera inmunoglobulina en aparecer es de tipo IgM, alcanzando su mayor concentración a la tercera semana después de la infección, la IgG lo hace a la séptima semana, continuando elevada en la etapa crónica de la enfermedad, a excepción de los pacientes con cura parasitológica, que recibieron drogas tripanocidas durante la primo-infección²⁹. Se ha asociado que los niveles altos de IgG contra *T. cruzi* puedan ser mantenidos por IL-4, ya que los niveles de IL-2 están disminuídos en pacientes chagásicos crónicos¹⁶⁶

La inmunosupresión parece estar confinada a las primeras etapas de la infección y en la cronicidad tiende a la normalidad, ya que se ha visto que un factor inmunosupresor del parásito tiene su acción durante la fase aguda y en la crónica aparecen anticuerpos que neutralizan este componente, explicando el porqué de la inmunosupresión durante la fase temprana⁷⁷.

1.6.2 MECANISMOS DE PATOGENIA

En la fase aguda, los linfocitos T (CD4+, CD8+) y los anticuerpos intervienen en la protección, ya que si se impide la función de los linfocitos T, hay una baja de respuesta humoral en ratones, siendo más susceptibles a la infección por *T. cruzi*¹⁶⁷ Inicialmente se le atribuía tanto a los linfocitos CD4- como a los CD8+ su participación en el desarrollo de los procesos inflamatorios en el miocardio durante la infección crónica¹⁰⁶, actualmente se ha demostrado que en ratones a los que se les eliminan los linfocitos CD4+ y/o CD8+, la inflamación disminuye a los 20 días, pero conforme avanza la enfermedad, la respuesta inflamatoria en el corazón aumenta, por lo que los linfocitos CD4 + y CD8-, pudieran no estar involucrados directamente en los procesos inflamatorios pero si en la regulación de la carga del parásito a lo largo de la enfermedad¹⁶⁷

Otras células que podrían estar involucradas en el desarrollo de los procesos inflamatorios en miocardio, son los macrófagos, ya que por el aumento de INF- γ , estos se encuentran hiperactivados y producen mediadores como son especies reactivas de oxígeno, citocinas como el TNF α y metabolitos del ácido araquidónico generados por las lipo-oxigenasas y ciclo-oxigenasas. El incremento de la producción de radicales libres podría inducir daño tisular en las zonas con inflamación. Todo esto sugiere una relación entre la activación de los macrófagos y la patología de la enfermedad¹⁵⁸ Las prostranglandinas y los leucotrienos que son otros de los mediadores producidos por los macrófagos activados, también podrían estar implicados en los procesos inflamatorios¹³⁹

La función de los linfocitos T puede ser inducida o modulada por los factores producidos por los macrófagos. Durante la infección con *T. cruzi* los niveles de IL-1 no están afectados, por lo que hay estimulación de Th2, sin embargo los macrófagos de ratones infectados son supresores activos de Th1¹⁶⁵.

Durante la etapa crónica se han transferido tanto anticuerpos como células definidas de un raton resistente a la infección a uno no sensibilizado, con el fin de determinar las bases de proteccion durante esta fase, se observó que los anticuerpos y los linfocitos T son capaces de transferir resistencia a la infección¹⁶⁷

En la etapa crónica se alcanza un equilibrio huésped-parásito, que puede romperse en algunos casos, al administrar drogas inmunosupresoras. Así, la inmunidad que controla la infección crónica y protege al huésped de la reinfección, es el resultado de la interacción de varios mecanismos inmunes específicos y no específicos¹⁴⁰

Durante la división, liberación o destrucción de los parásitos intracelulares en la célula huésped, se liberan antígenos del parásito que pueden depositarse en la superficie de las células parasitadas o normales, haciendolas blanco de los mecanismos de citotoxicidad directa o citotoxicidad celular mediada por anticuerpos⁶.

1.6.3 MECANISMOS DE ESCAPE DEL PARASITO

El éxito de las infecciones por parásitos se basa en la capacidad de estos para eludir los efectos de la respuesta inmune del huésped. Cuando el parásito logra introducirse al organismo, este enfrenta mecanismos inespecíficos de defensa entre los que se encuentra el sistema del Complemento, el cual es evadido por el tripomastigote sanguíneo y el amastigote, mas no por el epimastigote. Esta evasión, depende de algunas glicoproteínas (gp) del parásito, la más importante tiene un PM de 160 kDa. Esta gp tiene la capacidad de unir C₃b e inhibe la formación de la C₃ convertasa, por lo que tiene así una secuencia y función parecida al factor DAF (Decay Accelerating Factor) que se encuentra en mamíferos⁶⁰.

Durante la entrada a las células, el parásito lo hace por medio de receptores que evitan la producción del estallido respiratorio. Una de las proteínas que logra hacer esto, es la llamada Penetrina, la cual tiene un PM de 60 kDa y se une de forma selectiva al menos a 3 componentes de la matriz extracelular del parásito, como son la colágena, el heparánulfato y la heparina⁶⁰.

Otras de las proteínas del parásito involucradas en la invasión hacia las células mamíferas, son algunos sialoconjugados como la proteína Tc-85 y la Ssp-3, de gran importancia entre las principales proteínas involucradas en invasión, además también los sialoconjugados de la célula mamífera sirven como receptores para algunas moléculas del parásito¹⁷². Al penetrar los parásitos a las células, estos logran escapar de la vacuola fagocítica por medio de la liberación de una molécula parecida al componente C9 del Complemento, llamada Perforina⁶⁰

Por último, otro de los mecanismos que ayudan al parásito a evadir las respuestas del huésped y poder sobrevivir dentro de este, es la inmunosupresión, que esta dada no por uno sino por varios mecanismos producidos por el parásito. Se han propuesto, a) Inhibición de la expresión en los linfocitos, de los receptores de Interleucina 2 (IL-2R) y Transferrina (TFR-r), así como de las moléculas CD3+, CD4+, CD8+^{11,75,76,162} b) generación de subpoblaciones de macrófagos supresores¹⁶⁵ y c) presencia de antígenos compartidos entre *T. cruzi* y linfocitos activados, que inducen la producción de anticuerpos de reacción cruzada dependientes de Complemento y por lo tanto lisis de linfocitos T y B⁶⁴

1.7 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Para realizar el diagnóstico de la enfermedad, es necesario conocer y combinar los datos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio, ya que la sintomatología y los signos clínicos no son patognomónicos. Es por ello que el laboratorio clínico juega un papel muy importante

Los métodos de diagnóstico en el laboratorio se clasifican en a) *PARASITOLÓGICOS* y b) *INMUNOLÓGICOS*.

1.7.1 PARASITOLÓGICOS

Los métodos parasitológicos son los de elección en la etapa aguda de la enfermedad y en los primeros meses de la infección transplacentaria donde la parasitemia es elevada y constante, algunos de estos métodos también son utilizados durante la fase crónica, como el xenodiagnóstico y el hemocultivo. En estos se demuestra la presencia del parásito en el torrente sanguíneo. Los métodos utilizados para este fin se basan en una detección temprana o tardía²⁶

1.7.1.1 DETECCION DE PARASITOS COMPLETOS

1.- DETECCION TEMPRANA

a) GOTA FRESCA

Es el método más simple y sencillo, se coloca una gota de sangre digital, o de sangre venosa con anticoagulante entre cubre y porta, para observar microscópicamente el movimiento característico de los tripomastigotes sanguíneos. Su sensibilidad es de 92% cuando es realizada por un experto. Muchos autores sugieren de 5-6 exámenes por día, examinando aproximadamente 20 muestras por paciente⁵⁵

b) GOTA GRUESA

Este método consiste en colocar en una gota de sangre desfibrinada sobre un portaobjetos, para teñirse con Giemsa y observar los parásitos al microscopio. Las características de coloración y morfológicas del parásito permiten su identificación. Tiene una sensibilidad parecida al método de gota fresca y este depende en gran parte de una correcta y cuidadosa observación¹²⁶

c) METODO DE STROUT

Después de obtenerse el suero de aproximadamente 5ml de sangre periférica, se centrifuga a 360 g observándose el sedimento entre porta y cubre para buscar al parásito. De los métodos de concentración es uno de los más sencillos y sensibles, tiene una sensibilidad aproximadamente de 95% para los casos agudos¹⁵⁶

d) MICROHEMATOCRITO

Es uno de los métodos más rápidos y sensibles. Se llenan aproximadamente 6 capilares heparinizados con sangre periférica, centrifugando 45 min a 5000g, para después observar la capa entre los eritrocitos y leucocitos microscópicamente y buscar las formas sanguíneas del parásito. Tiene una sensibilidad parecida al método de Strout y como emplea poco volumen de sangre, es ideal para el estudio de Chagas agudo en niños y de Chagas congénito⁵⁵

e) METODO DE SILICONES

La sangre se deposita sobre aceite de silicones de 1075 de densidad, se centrifuga para que los glóbulos rojos que son los que tienen mayor densidad se depositen en el fondo y los leucocitos, plaquetas y parásitos quedan en la parte superior del aceite de silicones. Este sobrenadante se vuelve a centrifugar para después observar el sedimento al microscopio¹³⁶.

2.- DETECCION TARDIA

a) XENODIAGNOSTICO¹⁹

Este método se basa en la reproducción en condiciones de laboratorio del ciclo biológico natural del parásito en triatomíneos criados en el laboratorio y libres de infección, los que se alimentan con la sangre del paciente. Se utilizan 4 cajas con 10 ninfas de tercer estadio, a las que se dejan en ayuno 2 semanas antes de alimentarse con la sangre del paciente; este procedimiento se realiza por un periodo de aproximadamente 30 min sobre el antebrazo o sobre la espalda del paciente. Las ninfas se retiran y se observan sus heces al microscopio periódicamente durante 60 días. Su sensibilidad es cercana al 100% en los casos agudos y un 50 % en los crónicos, la que puede aumentar cuando al mismo paciente se le realiza un número mayor de xenodiagnósticos.

b) HEMOCULTIVO²²

En este método se aprovecha la capacidad de *T. cruzi* de crecer en varios medios de cultivo *in vitro*, como el NNN, LIT, PECKCHANIAN, REICHENOW-WARREN y otros. Según experiencias de varios investigadores⁴³, el medio de Warren, que es elaborado de infusión de cerebro e hígado de vaca y sangre de carnero desfibrinada, es el que ha dado mejores resultados. En 10 a 20 tubos preparados con el medio de elección, se depositan 1ml de sangre con anticoagulante o el sedimento obtenido de la centrifugación por 15 min a 5000g de 5 ml de sangre total y se incuban de 28-30°C con agitación cada 24 hrs. La lectura se realiza entre los 10-60 días después del sembrado de la muestra, tomando el material de la superficie de los cultivos para su observación en el microscopio. En caso de ser negativos a los 60 días se recolectan todos los sobrenadantes de los tubos para concentrarlos y definir como negativa la muestra. La sensibilidad de este método es muy parecida al xenodiagnóstico.

c) INOCULACION DE ANIMALES SENSIBLES DE LABORATORIO⁹⁷

Es un método usado para el aislamiento de cepas y el diagnóstico diferencial entre infecciones de *T. cruzi* y de especies similares cuando se estudian parásitos provenientes del tracto digestivo de los insectos o de infecciones de animales reservorios. El desarrollo de los parásitos en el animal dependerá tanto de la susceptibilidad de este, así como de las características propias del parásito. Se inocula sangre tratada con citrato a ratones lactantes de 20 días (cepas C3H o albinos), o a hamsters jóvenes y ratas de aproximadamente 5 días (Long Evans o Wistar). Las primeras formas aparecen entre los 7 y 20 días de postinoculación. Este método alcanza una sensibilidad del 30% en una sola inoculación, pero al realizar varias inoculaciones se eleva hasta un 70%.

1.7.1.2 DETECCIÓN DE FRACCIONES DEL PARASITO

a) BUSQUEDA DE ANTIGENOS LIBRES Y UNIDOS A ANTICUERPOS

La búsqueda de antígenos de *T. cruzi* en diferentes fluidos es una forma específica de realizar el diagnóstico de la enfermedad. Se ha detectado antígeno libre y unido a anticuerpos formando un complejo inmune. Corral y col³⁶ identificaron la presencia de complejos inmunes circulantes formados por IgM e IgG en pacientes con Chagas agudo por medio de ELISA con sensibilidad de 90% para IgG y 86.66% para IgM, lo que ayuda a un diagnóstico temprano y tratamiento inmediato en la etapa aguda.

También se han encontrado dos antígenos de *T. cruzi* en la orina de pacientes con infección aguda y crónica, estos fueron de naturaleza glicoproteica con pesos moleculares de 80 y 55 kDa³⁷. Kátzin y col⁷¹ empleando un anticuerpo monoclonal B2/5 inmunoprecipitaron un polipeptido de 100 kDa en la orina del 84% de pacientes crónicos. Este procedimiento de detección urinaria abre nuevas perspectivas para el diagnóstico.

b) DETERMINACION DEL DNA DEL PARASITO (Reacción en cadena de la ADN polimerasa "PCR")

La PCR es un método muy sensible para la determinación de *T. cruzi* en pacientes crónicamente infectados. Tiene un 100% de sensibilidad y 86% de especificidad. Se han desarrollado y empleado diversas herramientas para mejorar la técnica, como sondas a partir de DNA nuclear, RNA ribosomal y DNA de minicírculos.

Ashall y col.⁹ desarrollaron una sonda altamente específica para *T. cruzi*. Mientras que Morser y col¹¹³ desarrollaron la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) que demostró ser específica para distintas cepas de *T. cruzi*. Esta técnica utiliza oligonucleótidos complementarios a secuencias tanto del DNA como del RNA del parásito.

Se han empleado oligonucleótidos complementarios a secuencias de RNA ribosomal, de la subunidad 24S, donde se detectan aproximadamente 1 parásito en 1000ml de sangre¹⁵⁴. Otros investigadores utilizan oligonucleótidos para la amplificación de una secuencia de DNA satélite que se encuentra en el genoma del parásito con aproximadamente 10^4 copias por célula, en donde puede detectarse 1 parásito en 20ml de sangre⁴⁷. Otra secuencia de DNA amplificada es la de los minicírculos del cinetoplasto con la que también se detecta 1 parásito en 20ml de sangre de pacientes Chagásicos y en muestras de triatomíneos¹⁶⁰. Además, la amplificación de las secuencias hipervariables de los

minicírculos del DNA de cinetoplasto es un método que resulta el doble de sensible que el Xenodiagnóstico y detecta 0.1% del genoma de un solo parásito^{10,110}. Por último, la amplificación de secuencias del DNA nuclear detecta el 0.5% del DNA de un solo parásito¹¹³

1.7.2 INMUNOLOGICOS

Con estos métodos se demuestra la presencia de anticuerpos específicos contra *T. cruzi*, son los métodos de elección para la fase indeterminada y crónica de la enfermedad. El inmunodiagnóstico de precisión se basa como mínimo en el resultado de dos reacciones diagnósticas practicadas simultáneamente, utilizando principalmente aquellas pruebas ponderadas en cuanto a sensibilidad y especificidad, dentro de estas pruebas se encuentran la Hemaglutinación indirecta (HAI), Inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA, Western Blot (W.b), entre otras. De esta forma se logra una sensibilidad y especificidad diagnóstica arriba del 95%¹⁷⁵

a) REACCION DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA (HAI)¹⁵

Es una prueba rápida y económica, ideal para el tamizaje de muestras obtenidas en encuestas seroepidemiológicas y en bancos de sangre. Este método emplea glóbulos rojos tratados con formol y sensibilizados con antígeno de *T. cruzi*, tiene una sensibilidad inicial del 27% en el primer mes de la infección, del 50% en el segundo mes, obteniéndose hasta un 95% de sensibilidad después de 24 meses⁹⁶

b) INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Es una de las reacciones serológicas más sensibles, puede ser utilizada para la detección de IgM en los casos agudos y de IgG en los crónicos. Esta reacción es la primera en hacerse positiva en el curso del estudio de la infección Chagásica, llegando al 89.2% hacia el segundo mes y al 100% de sensibilidad a partir del cuarto mes²⁹.

c) REACCIONES INMUNOENZIMATICAS (ELISA)

El ensayo Inmunoenzimático ELISA para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* fue establecido por Voller et al. 1975¹⁷⁴. Tiene una sensibilidad comparable a la observada en inmunofluorescencia y junto con esta última prueba dan un diagnóstico confirmativo con una sensibilidad del 100%. Hoy es una de las pruebas de gran utilidad para el diagnóstico de Chagas.

d) FIJACION DE COMPLEMENTO (Machado-Guerreiro)⁵⁷

Esta técnica es rigurosa y compleja en su preparación, pues el éxito de la misma depende de la correcta preparación de los antígenos y reactivos utilizados. La técnica usada de rutina es la de

hemólisis al 100%, que tiene una sensibilidad del 35% en el caso de agudos durante el primer mes y aumenta a 71% en el segundo mes y durante la etapa crónica la sensibilidades de 90-95%

e) *DOT-ELISA*⁴

Araujo et al. en 1985⁷ fueron de los primeros en utilizar esta técnica con buenos resultados empleando antígeno soluble de *T. cruzi*. De Hubsch et al⁴⁴ usaron esta técnica con antígeno completo de *T. cruzi* y fracción citoplásmica del mismo y obtienen especificidades de 96% y 100% respectivamente, así como una sensibilidad del 100% para ambos antígenos⁷.

1.8 TRATAMIENTO

Hasta el momento no se dispone aún de un medicamento ideal. Los fármacos disponibles no actúan sobre la fase intracelular (amastigotes). Solo dos drogas tripanocidas han sido aceptadas, registradas y comercializadas por autoridades nacionales de salud en países de América Latina

1.8.1 NIFURTIMOX (*Lampit*) MR 1972-1992

Es un derivado nitrofuránico (Bayer), se define como 3-metil-4-(5'-nitrofurfuril idenamino)-tetrahydro-4H-1,4 tiazida-1,1 dióxido. Tiene acción efectiva sobre las formas sanguíneas del tripanosoma. Actualmente no se encuentra en el mercado Este medicamento inhibe el crecimiento, estimulando la generación de H₂O₂ en toda la célula y la producción de O₂ por la fracción mitocondrial de *T. cruzi*

Se fórmula en tabletas de 120mg/base para ser administrada por vía oral La dosis recomendada va de acuerdo con la edad del paciente como sigue.

* De 0-2 meses 6-7 5mg/Kg/2 veces al día (total de 12-15 mg/día), durante 60 días

* 3 meses a 12 años: 6-7mg/Kg/2 veces al día (total de 12-14mg/día), durante 60 días

* 13 a 20 años: 3-4mg/Kg/3 veces al día (cada 8 hrs, total de 9-12mg/día), durante 60 días

* 21 o más años. 3-4mg/Kg/3 veces al día (cada 8 hrs, total de 9-12mg/día), durante 60 días

No se debe excederse la dosis total de 700 mg en 24 horas.

Los efectos adversos. Anorexia, intolerancia digestiva, irritabilidad nerviosa, insomnio, pérdida de peso en niños¹¹⁴. Con menos frecuencia pueden presentarse crisis convulsivas

1.8.2 BENZNIDASOL (*Radamil*) MR 1975

Es un derivado nitroimidazólico (Roche), se define como N-benzil-2 nitro-1 imidazol acetamida Tiene una acción efectiva en contra del parásito, en fase sanguínea Actúa afectando la

síntesis de proteínas y del ARN del parásito, 100mg de la droga provocan la inhibición total de la producción de proteína en una hora, 26 y 100mg/Kg/día mantienen niveles plasmáticos máximos y mínimos por encima de la concentración mínima inhibitoria¹³⁰.

La dosis recomendada para personas en todos los grupos de edad es de 5mg/Kg/día, administrando 2.5mg cada 12 horas, durante 30 días consecutivos

Los efectos colaterales que se presentan son, exantema multiforme, anorexia, artralgias, cefalea, neuropatías, cólicos, náusea, vómitos.

El tratamiento sintomático de los pacientes chagásicos, cardiopatas, o con formas mega, se hace a base de digitálicos, diuréticos, marcapasos de demanda y estimulantes de motilidad digestiva, medidas higiénicas y en casos selectos intervención quirúrgica. En cuanto al megaesofago el tratamiento se inicia con medidas paliativas que faciliten el vaciamiento esofágico y la disminución de los fenómenos de reflujo y esofagítis⁹³

1.9 PROFILAXIS

Al no contar con una quimioterapia adecuada, ni una vacuna efectiva para esta enfermedad, la medida más específica contra la infección, es la eliminación de los vectores en las viviendas, así como también en los alrededores de estas, la cual se logra con el mejoramiento de la habitación humana, desmonte de los alrededores de las viviendas y aplicación de insecticidas de acción residual¹²² En la actualidad los insecticidas más eficaces para el control de los triatomas son los piretroides, dentro de los cuales los más comunes son la Deltametrina (Roussel-Uclaf), Ciflutrina (Bayer) y la Lambda-cihalotrina (Zeneca)¹⁴⁹. En cuanto a las medidas profilácticas para evitar la transmisión por transfusión sanguínea, el violeta de Gencia es la droga disponible y efectiva empleada como quimioprofilaxis¹²⁷

2 ANTECEDENTES

En México en 1928, Hoffman⁶⁵, estudia la relación entre Triatomíneos y la enfermedad de Chagas, doce años después Mazzotti¹⁰⁴ describe los primeros casos en Oaxaca y Biagi y Arce en 1965, describen los primeros casos de cardiopatía chagásica¹². Las primeras comprobaciones serológicas de esta enfermedad se llevaron a cabo por Perrin, Díaz y Brener¹²⁴. Sin embargo la fuente de información más importante de esta enfermedad fue a partir de 1957 donde se diagnosticaron aproximadamente 250 casos en toda la República Mexicana⁴⁸.

Posteriormente entre 1982 y 1985 se detectaron 107 casos, así como la existencia de vectores en varias de las entidades de la República¹⁴².

La encuesta epidemiológica Nacional llevada a cabo por el INDRE en 1992, reporta una prevalencia de menos de 1.6% en todo el territorio nacional. Sin embargo, existen estados que están por arriba de la media nacional (p.j. Chiapas, Oaxaca, Guerrero, etc.), lo que indica que existen zonas endémicas localizadas en regiones específicas. Otros estudios realizados en varias poblaciones, indican una prevalencia que varía del 8% al 85%, lo que apoya la regionalización de la enfermedad¹⁷¹.

Respecto al estado de la fase crónica de la enfermedad, en nuestro país el grupo del Dr. Reyes reporta un 8% de tripanosomiosis entre los enfermos con miocardiopatía que ingresaron al Instituto Nacional de Cardiología, en el periodo comprendido entre 1977 y 1988⁵⁶.

El diagnóstico de la enfermedad en su fase crónica es principalmente serológico, debido a la baja parasitemia durante esta fase. La existencia de reacciones cruzadas entre antígenos de *Leishmania* y *T. cruzi*, representan un obstáculo para el diagnóstico específico de la enfermedad de Chagas, sobre todo en áreas donde ambos parásitos son coendémicos^{8,34}. Otra de las limitaciones en el diagnóstico serológico, es la estandarización de los antígenos obtenidos a partir de *T. cruzi*; ya que la población que circula entre sus diferentes hospederos (vector, reservorio, humano) es muy heterogénea. De tal forma que se han reportado diferencias entre las distintas cepas, encontrándose tanto componentes clonales específicos, como componentes altamente conservados¹³¹.

Con el fin de evitar reacciones cruzadas y realizar un diagnóstico más certero, se han estudiado antígenos específicos de *T. cruzi* purificados por métodos bioquímicos así como recombinantes.

Entre los primeros antígenos purificados y utilizados con fines diagnósticos se encuentra una glicoproteína (gp) de 25 kDa (gp 25), la cual es una Cisteína-Proteinasa, que es el resultado de la

ruptura proteolítica de una gp de 57/51 kDa; gp 25 se encuentra en todos los estadios del parásito y está constituida por una mezcla compleja de carbohidratos que constituyen el 40% de la molécula, encontrando a serina, treonina y prolina como aminoácidos (aa) predominantes¹⁶⁹.

Scharftein y col¹⁴⁴ encontraron que el 98% de los sueros de pacientes chagásicos crónicos, en varias zonas de Sudamérica, reconocían a gp 25. Así mismo Tachibana y col¹⁶³ utilizan un anticuerpo monoclonal contra la gp de 25 kDa y realizan un ELISA competitivo para diagnosticar pacientes con Chagas crónico, obteniendo resultados similares al anterior.

Otra glicoproteína que ha sido purificada con el mismo fin, es una gp de 90 kDa que por ELISA presentó 96.6% de sensibilidad y 91.9% de especificidad, además de que permitió el diagnóstico diferencial entre *T. cruzi*, *T. rangeli* y varias especies de *Leishmania*¹⁴⁵. Se ha reportado la purificación por cromatografía de afinidad, de un antígeno de 52 kDa que reaccionó con sueros de pacientes con enfermedad de Chagas, pero no con pacientes de Leishmaniosis en ELISA⁵⁴.

También la purificación de exoantígenos con fines diagnósticos ha sido de gran utilidad, ya que los sueros de pacientes Chagásicos con enfermedad aguda identifican dos grupos principales de estos antígenos. Un primer grupo de proteínas de 160 a 200 kDa, las cuales corresponden a SAPA¹³³, antígeno que induce una respuesta de anticuerpos durante las infecciones agudas y congénitas en humanos.

El antígeno SAPA/Neuraminidasa/Trans-sialidasa, es una familia de proteínas compuesta por diversos miembros, codificada por varios genes que se expresan en tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*. Todas las proteínas presentan secuencias amino terminales idénticas y además contienen unidades antigénicas repetidas de 20aa, que están localizadas en el extremo carboxílico de la molécula. La región responsable de la actividad enzimática se encuentra en la parte amino terminal de la molécula⁵⁴.

Un segundo grupo de exoantígenos detectados por sueros de pacientes agudos, así como por conejos con infección temprana, tiene un peso molecular de 40-50 kDa y puede proteger contra infecciones agudas¹⁸⁰.

Recientemente se ha reportado que un anticuerpo monoclonal que reconoce a un antígeno de secreción de 85 kDa, induce pasivamente una protección parcial contra la infección¹¹⁹. Por lo que los antígenos de secreción de *T. cruzi* podrían ser buenos candidatos para el diagnóstico, así como para el desarrollo de vacunas⁵³.

La clonación de genes de *T. cruzi* fue primeramente realizada por Peterson y col¹²⁵ y actualmente algunos grupos ya han utilizado éstos antígenos recombinantes para el diagnóstico. Cotrim y col³⁹ y Paranhos y col¹²⁰ estudiaron la clona H-49 que produce una proteína recombinante de aproximadamente 150 kDa, la cual reacciona fuertemente con anticuerpos de pacientes Chagásicos crónicos. Esta proteína se encuentra en todos los estadios del parásito, y está asociada al citoesqueleto de este, localizándose a lo largo de la zona de unión entre el flagelo y el cuerpo celular. Por inmunoensayo de dot-blot se observó una reactividad de 99% con sueros de pacientes crónicos, sin reacción cruzada con anticuerpos anti-*T. rangeli* ni con sueros de pacientes con Leishmaniosis cutánea, por lo que se propone como un buen marcador de la fase crónica^{40,107}.

Otros antígenos utilizados para el diagnóstico, son los antígenos (FRA) y (CRA)^{4,83}. FRA es un antígeno flagelar encontrado en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos, el cual consiste de unidades repetitivas de 68aa; CRA, es un antígeno citoplásmico compuesto por unidades repetitivas de 14aa y se encuentra solo en epimastigotes.

La mezcla de estos dos antígenos utilizados en ELISA da un 100% de especificidad y sensibilidad, comparado con otras técnicas de ELISA que utilizan distintos antígenos, así como con las pruebas de Hemaglutinación e Inmunofluorescencia indirectas, cuando son utilizados en encuestas epidemiológicas y en el análisis de muestras en los bancos de sangre, por lo que estos autores sugieren la utilización de la mezcla de estos antígenos recombinantes, por su gran sensibilidad y especificidad.

Zingales y col¹⁸² utilizan dos antígenos recombinantes denominados B-12 y B-13 de 20 y 12aa respectivamente, por el método de radioinmunoensayo (RIA). probaron 70 sueros de pacientes Chagásicos y encontraron buena reactividad con el antígeno B-13, pero el diagnóstico se mejora si se usan ambos, sin embargo estos resultados solo se obtuvieron con pacientes Chagásicos Crónicos.

Otra de las alternativas para el diagnóstico, es la utilización de antígenos obtenidos de parásitos de la misma familia que *T. cruzi*, pero no patógenos para el hombre, así pues, se ha reportado que *T. cruzi* comparte determinantes antigénicos con *C. luciliae* que es un Tripanosomátido patógeno para insectos⁹⁰, demostrándose esta reacción cruzada por ELISA, IFI y W Blot (Comunicación personal); pero hasta la fecha no se ha utilizado a *C. luciliae* para el diagnóstico de Chagas crónico, ni por consiguiente la utilización de las glicoproteínas inmunodominantes de *C. luciliae* para el mismo fin.

3 JUSTIFICACION

El uso de proteínas purificadas y antígenos recombinantes que son reconocidos específicamente por sueros de pacientes Chagásicos, ha disminuido la existencia de reacciones cruzadas con otros parásitos de la misma familia que son patógenos para el hombre, tal es el caso de *Leishmania*. ayudando así a un mejor diagnóstico diferencial sobre todo en encuestas epidemiológicas y en pruebas de escrutinio utilizadas en los bancos de sangre.

Desafortunadamente la poca accesibilidad a los antígenos recombinantes y a las proteínas purificadas de *T. cruzi*. en nuestro medio, para fines diagnósticos, ha obligado a que se sigan utilizando extractos crudos principalmente de epimastigotes, que es la fase más fácilmente aislada en los medios de cultivo “*in vitro*”, aunque se hayan obtenido valores mayores de sensibilidad y especificidad utilizando tripomastigotes sanguíneos y amastigotes^{41,42}.

La ya demostrada reacción cruzada de *T. cruzi* con otros tripanosomátidos no patógenos para el hombre como lo es *C. luciliae*⁹⁰ que es parásito de insectos y la ventaja de que a pesar de que *C. luciliae* es filogenéticamente más cercano al género *Leishmania*⁹⁸, se ha observado menos reacción cruzada con ésta última en las pruebas de ELISA y Western blot. Además, la obtención de antígeno a partir de *C. luciliae* es más rápida y abundante ya que el tiempo de crecimiento de este parásito es de 3 días y no de 7 días que es lo que tarda *T. cruzi* en crecer, al utilizar la misma cantidad de inóculo. lo que facilita su manejo en el laboratorio.

En esta tesis se propone a *C. luciliae* como fuente alterna de antígeno para ser utilizado en las pruebas inmunológicas de ELISA y W. blot, para el diagnóstico diferencial en pacientes con miocardiopatías que llegan al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

4 HIPOTESIS

El gran cruce antigénico de *T. cruzi* con *C. luciliae*, nos permitirá utilizar por lo menos una glicoproteína inmunogénica de *C. luciliae*, ya sea purificada o en forma recombinante para realizar el diagnóstico confirmatorio de Chagas crónico, sin la necesidad de trabajar con un parásito patógeno

5 OBJETIVOS

Estudiar la reacción cruzada que existe entre *T. cruzi* y *C. luciliae* por las técnicas de ELISA y Western blot y determinar la especificidad y sensibilidad al enfrentar sueros de pacientes con y sin Miocardía Dilatada Chagásica , con estos dos antígenos

Comprobar la ya descrita reacción cruzada entre los tripanosomatideos *T. cruzi* y *C. luciliae* por las técnicas de ELISA y Western blot.

Identificar la proteína más inmunogénica de *C. luciliae* reconocida por los sueros de pacientes Chagásicos Crónicos, con el fin de realizar pruebas bioquímicas para determinar los epítomos principales, así mismo determinar si estos son compartidos con otras glicoproteínas tanto de *C. luciliae* como de *T. cruzi*.

Con ayuda de anticuerpos anti-antígeno dominante: Obtener clonas recombinantes

6 METODOLOGIA

6.1 PARASITOS

Se utilizó la cepa Ninoa, que es un aislado de *T. cruzi* de una niña del estado de Oaxaca con enfermedad de Chagas en fase aguda, aislado en 1978 por el Dr. Máximo Cortés, del Dpto. de Parasitología E.N.C.B. El parásito se mantiene en nuestro laboratorio por pasos sucesivos en ratón y medio de Infusión-Cerebro-Corazón (BHI), enriquecido con suero de neonato bovino.

6.2 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

6.2.1 MEDIO BHI

Para la preparación del medio de cultivo (BHI), Infusión-Cerebro-Corazón, se requieren 3.7g de BHI, 2.3g de agar bacteriológico (Bioxon) y un gramo de dextrosa (Merck) Se disuelven en 100ml de agua destilada y se esterilizan a 15 lb por 15min. Una vez solidificado, se agregan 50ml de solución salina estéril al 0.85% pH 7.2 y suero bovino neonato (Gibco RBL) a una concentración final del 10%.

6.2.2 MEDIO LURIA AMPICILINA (CON AGAR)

Este medio se utiliza para inmunodiagnóstico en genotecas de expresión de Lambda, para esto se pesan 10 grs. de Triptosa, 5 grs. de Extracto de Levadura, 5 grs. de Cloruro de sodio, 2 grs. de Glucosa y 15 grs. de Agar. Todo esto para un litro de agua destilada. Esterilizar 15 min. a 15 lb. Dejar enfriar más o menos a 40°C y agregar 0.1 gr / ml de Ampicilina, e inmediatamente vaciarlo tanto a cajas chicas como grandes.

6.2.3 MEDIO LURIA AMPICILINA (SIN AGAR)

Se prepara igual que el medio anterior, pero a este no se le agrega agar y se esteriliza en un matrón, para utilizarlo en el crecimiento de la cepa de *E. coli* Y1090.

6.2.4 MEDIO TOP - AGAR

Para este medio se requiere de 1.0 grs. de Bacto - Triptona, 0.5 grs. de NaCl, 0.8 grs. de Bacto - Agar y 0.5 grs. de Extracto de Levadura. Esterilizar 15 min. a 15 lb. Dejar enfriar más o menos a 60°C y añadir 1 ml. de MgSO₄.

6.2.5 BUFFER DE FAGO LAMBDA

Se requieren 20 mM de Tris - HCL pH 7.4, 100mM de NaCl y 10mM de MgSO₄. Diluir en un litro y esterilizar 15 min. a 15 lb.

6.2.6 BUFFER SM

Se prepara añadiendo Gelatina 0.01% al buffer de fago

6.2.7 DILUYENTE DE FAGO

Para este se requiere 10mM de Tris-HCl pH 7.4 y 10mM de Cloruro de Magnesio MgCl₂ en 1 lt.

6.3 EXTRACTOS ANTIGENICOS

Tanto *C. luciliae* como *T. cruzi* se cultivaron en BHI; *T. cruzi* se cosechó a los 8 días, mientras que *C. luciliae* a los 4 días, centrifugándose el medio líquido a 1800rpm en una centrifuga (Sorvall RT 6000B) a 4°C, lavando el concentrado de parásitos seis veces con PBS (Amortiguador de Fosfatos Salinos) pH 7.2. El paquete obtenido se resuspende en 4 ml de PBS, agregándose un coctel de inhibidores de proteasas formado por 0.2ml de EDTA 10mM, 0.1ml de PMSF 5mM, 0.002ml de aprotinina y 0.09ml de Acido *E*-amino caproico 10mM, sonicar posteriormente hasta que los parásitos se lisen totalmente (manteniendo todo el tiempo el paquete en hielo) Volver a centrifugar el paquete a 12000rpm por 30min en una centrifuga (Beckman Mod J2-21), tomar el sobrenadante que es el que contiene el antígeno soluble. Medir proteínas por el método de Lowry,⁹¹ alicuotarlo y guardarlo a -20°C Tiene estabilidad de 5 meses

6.4 SUEROS HUMANOS

Se probaron 91 sueros de pacientes Chagásicos crónicos, de los cuales 39 de ellos provienen de Brasil y 52 de individuos de distintos estados de la República, pacientes con miocardiopatía Chagásica atendidos en el INC

Para evaluar reacciones cruzadas se incluyeron 21 sueros de pacientes con Toxoplasmosis y 32 con Leishmaniosis tanto cutánea como visceral, todos ellos donados por el Dr. Velasco Castrejón y la M C Guzmán Bracho, del Dpto. de Parasitología del INDRE, 28 sueros de pacientes con artritis reumatóide, 6 con Lupus y 41 con Cardiomiopatía no Chagásica, todos ellos de pacientes del INC

6.5 SUEROS DE CONEJO

Antes de inmunizar cada conejo con el extracto crudo de *C. luciliae*, *T. cruzi*, así como con la gp de 30 kDa respectivamente, se sangraron, obteniéndose así el suero preinmune

En la inmunización de los conejos con los extractos crudos de *C. luciliae* y *T. cruzi*, se dieron cuatro retos, el primero en la semana 0 se utilizó adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto para los subsiguientes retos, realizándose la segunda inmunización en la tercera semana después del primer reto, el tercer reto a la quinta semana y el cuarto a la sexta semana. La cantidad de antígeno utilizado en cada inmunización fue de 1 mg / ml.

Con la proteína de 30 kDa también se dieron cuatro retos, siendo el primero en la semana 0, el segundo a las dos semanas, el tercero a las cuatro semanas y el cuarto a la quinta semana. La banda de 30kDa se cortó de la nitrocelulosa transferida, para realizar el primer reto inoculándose en los dos ganglios poplíteos del animal, el segundo reto se hizo de igual manera, pero en el lomo del animal y los retos restantes se realizaron con la glicoproteína que se cortó de la poliacrilamida para inocularse por vía subcutánea. El sangrado de los animales se realizó 14 días después del último reto.

6.6 ELISA EN PLACA

Se realizó la técnica de ELISA según Voller¹⁷⁴. Sensibilizándose placas Polisorp (Nunc) de 96 pozos, con 0.1 ml por pozo, conteniendo 1µg de proteína del antígeno soluble de *C. luciliae* y *T. cruzi* en amortiguador de Carbonatos (0.05 M, pH 9.6) toda la noche a 4°C

Después de cinco lavados con PBS-Tween 0.05%, se bloquean con albúmina 1% - PBS - T 0.05% 1hr. a 37°C. Posteriormente se añadió 0.1 ml por pozo de los sueros diluidos 1:400 en ABS 1% - PBS - T 0.05%, por triplicado, incubándose 1 hr. a 37°C. Después de cinco lavados adicionar 0.1 ml/pozo de anti-IgG humana conjugada con peroxidasa (Cappel) diluida 1:20000, incubar 1 hr a 37°C. Realizar los últimos lavados para revelar la reacción con 0.1ml./pozo de una mezcla de 8 mg. de orto-fenilendiamina con 20ml de amortiguador de citratos (0.1M, pH 5) y 0.008 ml de H₂O₂ al 30% durante 15 min., para parar la reacción con 0.05 ml /pozo de H₂SO₄ 2.5 N. Leer a 490 nm. El valor de corte para *C. luciliae* fue (0.13) U.D.O y para *T. cruzi* (0.18) U.D O., los que fueron establecidos a partir del valor de la media más cinco desviaciones estandar, de cincuenta sueros de una población humana clínicamente sana.

6.7 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Se realizó según la técnica de Segura y col¹⁵¹, utilizando parásitos completos y fijados con formaldehído al 1%, aproximadamente 10-15 parásitos por campo (40x). los que se fijan en portaobjetos a temperatura ambiente hasta que se seque la gota. Lavar tres veces con PBS pH 7.2 y colocar los sueros de conejo contra el antígeno completo de *T. cruzi* y *C. luciliae* y el suero contra la gp. de 30kDa a una dilución cada uno de 1:80, incubar en cámara húmeda 1 hr a 37°C. Lavar de nuevo cinco veces con PBS y agregar un segundo anticuerpo ant-IgG de conejo unido a isotiocianato de fluoresceína (Pierce) dil (1: 2000), incubar 1 hr a 37°C. Realizar los últimos lavados, secar y montar con glicerina para observarse en el microscopio de epifluorescencia

6.8 ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA (Western - blot)

Se realizó la electroforesis por el método de Laemmli⁸⁴, usando geles de poliacrilamida al 10%. posteriormente se hizo la transferencia a membranas de nitrocelulosa por el método de Towbin y col¹⁶⁷. durante 1 hr. a 100 volts La membrana se bloquea con ASB 3% -PBS- T 0 1% por toda la noche a 4°C Lavar cinco veces con PBS - T 0 1% , se cortaron las tiras de 0.5 cm. para colocar los sueros de los pacientes diluidos (1.1000) 2 hrs a temperatura ambiente, volver a lavar para incubar con anti - IgG - humana diluída (1.1000) 1 hr. a temperatura ambiente; tras cinco lavados más se revela con 30 mg de 4 - cloronaftol diluidos en 10 ml. de metanol y 50 ml. de PBS con 0.050 ml. de H₂O₂ La reaccion se detiene lavando la membrana con agua destilada

6.9 TECNICAS DE ELUCION

6.9.1. ELUCION CON: LiCl 5M, Urea 2M, SDS 1%, MgCl₂ 2M y NaCl 5M¹³⁷

Las tiras de nitrocelulosa transferidas con el antígeno de *C. luciliae* se bloquean con ABS 3% - PBS - T 0.1% toda la noche a 4°C Se lavan cinco veces con PBS-T 0.1%, se colocan con los sueros 1:100 de pacientes Chagásicos crónicos 2 hrs a temperatura ambiente, lavar de nuevo cinco veces y cortar la banda de 30kDa para proceder a eluir los anticuerpos contra la gp30, con cada uno de los reactivos a probar por separado (LiCl 5M, Urea 2M, SDS 1%, MgCl₂ 2M y NaCl 5M), incubar por 30 min en agitación. Recuperar el eluido y probarlo en otra nitrocelulosa transferida con el antígeno tanto de *C. luciliae* como de *T. cruzi*, para realizar el W. blot..

6.9.2 ELUCION CON GLICINA - HCl pH 2.8⁶⁶

Las tiras de nitrocelulosa se bloquean en ABS - 3% - Tris -Salina- T 0.05% toda la noche a 4°C Lavar con TBS - T 0.05% cinco veces, colocar los sueros de los pacientes diluidos 1 100 en TBS - T 0.05% 2hrs a temperatura ambiente, se lava nuevamente cinco veces y se eluye el anticuerpo unido a la banda de 30kDa con Glicina - HCl pH 2.8 en agitación cinco minutos, neutralizando inmediatamente con Tris - HCl 1M pH 8.6. Repetir la elución tres veces. Se prueba los eluidos en tiras nuevas de nitrocelulosas transferidas con el antígeno de *C. luciliae*

6.10 OXIDACION DE CARBOHIDRATOS CON PERYODATO DE SODIO (NaIO₄)

6.10.1 TECNICA DEL PERYODATO REALIZADA EN NITROCELULOSA

Se hizo una modificación del método de Woodward y col¹⁷⁸. Las nitrocelulosas con el antígeno de *C. luciliae* transferido y ya bloqueadas se enjuagan 10 min. con amortiguador de acetato de sodio 50mM a pH 4.5. Se incuban con las diferentes concentraciones de peryodato (0.1, 5 y 20 mM), disuelto en el amortiguador de acetato de sodio, 1 hr. en obscuridad; despues se enjuaga con acetato de sodio y se incuba con borohidruro de sodio 50mM en PBS por 30 min. a 23°C Lavar cuatro veces con PBS - T - 0.01% Colocar los sueros de pacientes Chagasicos crónicos (1 100) 2 hrs. seguir el mismo procedimiento del W blot. Debido a que es difícil encontrar controles adecuados para seguir el grado de ruptura de los anillos peryodicos, se recomienda usar reactivos frescos, siendo esta una limitacion de la técnica.

6.10.2 TECNICA DEL PERYODATO REALIZADA EN ELISA

Esta técnica se realizó según una modificación de Spiro¹⁵⁵. El ELISA se lleva acabo como se mencionó anteriormente, solo que después de sensibilizar la placa, se lava dos veces con amortiguador de Acetato de sodio 50mM pH 4.5, para añadir 0.1ml de las concentraciones de peryodato de sodio (0.1, 5, 20 mM) /pozo, disueltos en el amortiguador de acetatos 1 hr. en obscuridad Quitar el exceso del peryodato y añadir 0.1 ml /pozo de Borohidruro de sodio 50mM en PBS por 20 min Lavar seis veces con PBS - T 0.05% para bloquear con albúmina 1% - PBS - T 0.05% 1 hr a 37°C y posteriormente terminar la técnica como un ELISA convencional Los sueros de pacientes Chagásicos crónicos se utilizaron a una dilución de 1:400 y el segundo anticuerpo anti-IgG humana (Cappel) acoplado a peroxidasa se utilizó a una dilución de 1:20000

6.11 DIGESTION CON EXO Y ENDOGLICOSIDASAS

Para investigar la participación de los carbohidratos en los epitopos reconocidos por los sueros de pacientes Chagásicos contra la proteína de 30kDa de *C. luciliae*, se realizó el método modificado de Kobata⁷⁸. Se utilizó la temperatura, amortiguador y concentración de enzima según Matsumoto y col⁹⁹, usando el amortiguador de Acetato de sodio 0.25 M pH 5 para la Endoglicosidasa F y Amortiguador de Citrato - Fosfato 0.1 M pH 5 para la N - Acetilglicosamina y para la Hialuronidasa.

Las glicosidasas probadas en este estudio fueron: Endoglicosidasa F, B-N Acetilglicosamina, Hialuronidasa.

Al antígeno de *C. luciliae* se le añaden por separado en diferentes tubos, cada una de las enzimas, añadiendo así 0.001 ml. de Hialuronidasa para 0.1 ml de proteína, 0.001 ml de Endoglicosidasa F para 0.020 ml de proteína y 0.001 ml de B - N Acetilglicosamina para 0.1 ml de proteína. Se dejan reaccionar con la enzima 18 hrs a 25°C la B-N-Acetilglicosamina, mientras que la Hialuronidasa y la Endoglicosidasa F se dejan a 37°C. La reacción se detiene por ebullición durante 2 min. A los antígenos tratados se les hace inmunoelectrotransferencia como ya se ha descrito y se enfrentan con sueros de pacientes Chagásicos crónicos.

Debido a la carencia de sustratos para cada una de las enzimas probadas, ó del sistema de control de actividad enzimática, las enzimas fueron utilizadas en exceso de concentración, para disminuir lo más posible una actividad inadecuada.

6.12 MARCAJE CON ¹²⁵I DE LAS PROTEINAS DE SUPERFICIE DE *C. luciliae*¹¹¹

Los parásitos se cosechan y se lavan 3 veces con PBS pH 7.4, resuspender el botón en 1 ml de PBS teniendo aproximadamente 100×10^6 parásitos. Poner esta mezcla en un tubo de Iodogen agitando por 20 min. y añadir 0.001 de ¹²⁵I (1mCi) y dejando 10 min. (mantenido la reacción en hielo). Pasar esta mezcla a otro tubo, para lavarla 3 veces con PBS a 3200 rpm en una centrifuga (Beckman Mod J2-21). Al botón de parásitos marcados se le agrega 0.2 ml de buffer de lisis compuesto por Tris- Hcl pH 8 10 mM pH 8, 1mM de EDTA y NP40 1%, pero añadiendo anteriormente un coctel de inhibidores de proteasas (EDTA 1mM, TLCK 1mM, Iodoacetamida 2mM), centrifugar a 14000rpm por 15 min y recolectar el sobrenadante que es el que tiene las proteínas de superficie marcadas con ¹²⁵I, tomar 0.001 ml. y medir en un contador de centelleo gamma, para darse una idea del tiempo que tomará en el

proceso de revelado. Lo demás se guarda a -70°C para realizar después la Inmunoprecipitación. Todo se realiza con las precauciones propias que se requieren para trabajar radioactividad.

6.13 INMUNOPRECIPITACION¹³⁸.

Se utiliza como antígeno el lisado de *C. luciliae* marcado con ^{125}I . Se incuban 0.020 ml de este antígeno con 0.001 ml de los sueros de conejo por separado, contra la gp. de 30 kDa de *C. luciliae*, contra el antígeno total de *C. luciliae* y contra el antígeno total de *T. cruzi*, 2 hr a temperatura ambiente.

Agregar a esta mezcla 0.020 ml. de proteína A o G e incubar 1 hr. a temperatura ambiente en agitación. Lavar el precipitado 3 o 5 veces con PBS, centrifugando a 1300rpm en una centrifuga (Eppendorf 5415C) por 10 min. A los precipitados ya lavados agregar 0.020 ml. de buffer de muestra mas 0.002 ml. de DTT (Ditiotreitol) y se calientan por 3 min. a 90°C . Centrifugar las muestras para correrlas en los geles de poliacrilamida al 10% a 200 volts. se tiñe con azul de Coomassie al 0.1%, desteñir y secar el gel para finalmente ponerlo a revelar en una placa autorradiográfica.

6.14 INMUNODETECCION EN GENOTECAS DE EXPRESION DE LAMBDA, POR EL METODO DE PROTO-BLOT⁶⁸.

La *E. coli* Y1090 se creció en medio Luria sin agar, toda la noche a 37°C con buena aereacion. Se hicieron dos diluciones del fago (de la genoteca de *T. cruzi*), 1:25 y 1:50. Para realizar esto, a seis tubos grandes se les agrega las diluciones del fago, añadiendo a tres de ellos la dilución 1:25 que contiene 0.002 ml de fago mas 0.098 ml. de diluyente de fago. de esta dilución se toman 0.002 ml y se le añade 0.098 ml. de diluyente, para así tener la dilución 1:50, que se agrega a los otros tres tubos. Añadir a cada uno de los seis tubos 0.6 ml del cultivo de *E. coli* Y1090 e incubar 20 min, para posteriormente añadir 7.5 ml. de Top-Agar a una temperatura de 40°C , agitarlos y vertir cada tubo a una caja grande de Luria-Agar. Dejar solidificar y meter a 37°C por 6 hrs. mas o menos hasta que aparezcan las placas de lisis.

Poner sobre las placas los papeles de nitrocelulosa impregnados con IPTG (Isopropil-B-galactosida) 10mM y dejarlos toda la noche a 4°C . Lavar las nitrocelulosas en TBS-T 0.01% cuatro veces por 10 min. y bloquearlas 1hr. a temperatura ambiente con leche descremada 1% en TBS-T 0.01%. Ponerlas en el suero de conejo contra la gp. de 30kDa. diluido 1:300 en TBS-T 0.01%. lavar de

nuevo 5 veces, poner un segundo anticuerpo contra la IgG de conejo acoplado a Fosfatasa alcalina (pierce) y revelar con 10ml. de AP1X, 0.066ml. de NBT (nitro-blue-tetrazolium) y 0.033 ml. de BCIP (5-bromo,4-cloro,3-indolil phosphate), como ya se había descrito. Parar la reacción con agua destilada.

6.15 TRATAMIENTO ESTADISTICO¹⁰⁷.

Se calcularon los valores de Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos. utilizando estadística descriptiva y tabla 2x2 tomando como referencia el antígeno de *T. cruzi* y como positivos verdaderos a los sueros que tenían dos pruebas serológicas positivas para *T. cruzi*.

La concordancia de los resultados entre el antígeno de *T. cruzi* y *C. luciliae* se estimó por el índice Kappa. Estos valores se calcularon de acuerdo a la siguiente tabla de contingencia

Estandar	Diagnóstico	Ideal
(+)	(-)	Total
a	b	a + b
c	d	c + d
a + c	b + d	a + b + c + d

En donde a = no de casos verdaderos (+)

c = no de casos falsos (-)

a + c = Total de casos con enfermedad independientemente de los resultados de la prueba diagnóstica.

a + b = Total de casos con resultados positivos independientemente de tener o no la enfermedad.

a + b + c + d = Total de casos estudiados

b = no de casos falsos (+)

d = no. de casos verdaderos (-)

b + d = Total de individuos sin la enfermedad. independientemente de los resultados de la prueba diagnóstica

c + d = Total de casos con resultados negativos independientemente de tener o no la enfermedad

$$\text{Sensibilidad} = (a / a+c) (100)$$

$$\text{Especificidad} = (d / d+b) (100)$$

$$\text{K} = (P_o - P_e) / (1 - P_e) \quad \text{donde: } P_o = (a+d / N), P_e = (\text{Exp} (a) + \text{Exp} (d)) / N.$$

$$\text{Exp} (a) = ((a+c) / N (a+b) / N) N, \text{Exp} (d) = ((b+d) / N (c+d) / N) N$$

$$\text{VPP} = (a / a+b) (100)$$

$$\text{VPN} = (d / c+d) (100)$$

7 RESULTADOS

7.1 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Para definir si los extractos de *C. luciliae* se pudieran emplear en la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, se realizaron estudios en ELISA de sensibilidad y especificidad utilizando sueros de pacientes Chagásicos crónicos y extractos totales de ambos parásitos.

En este estudio se utilizaron 91 sueros de pacientes con enfermedad de Chagas crónica, con al menos dos pruebas diagnósticas positivas, de los cuales 52 correspondieron a pacientes estudiados en el INC y 39 a pacientes brasileños. Además, también se incluyeron 127 sueros de individuos con otras enfermedades tales como Toxoplasmosis, Leishmaniosis visceral y cutánea, Lupus Eritematoso Sistémico, Artritis Reumatoide y cardiopatías no Chagasicas

La prueba de ELISA fue siempre positiva para sueros de pacientes chagásicos probados con antígeno de *T. cruzi*, sin embargo 3 de los 127 sueros de pacientes con otras enfermedades, dieron falsos positivos (2.3%). Estos últimos correspondieron a sueros de individuos con Leishmaniosis visceral, que mostraron valores cercanos al punto de corte.

Así mismo al probar el antígeno de *C. luciliae* en ELISA, también dieron positivos todos los sueros de los pacientes chagásicos, sin embargo, 21 de 127 (17%) de los sueros de pacientes no chagásicos fueron positivos. Estos falsos positivos correspondieron a sueros de pacientes con Leishmaniosis cutánea y visceral, dando valores más altos con la forma visceral (Tabla 1)

Tomando como antígeno de referencia a *T. cruzi* se obtuvieron los parámetros de Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo positivo (VPP), Valor predictivo negativo (VPN) e Índice Kappa (Tabla 2).

La sensibilidad fue del 100%, indicando que con el antígeno de *C. luciliae* se tiene la capacidad de identificar el 100% de los individuos infectados con *T. cruzi* (verdaderos positivos), la especificidad fue de 83.4%, por lo que la posibilidad de no detectar a los individuos no infectados con *T. cruzi* (verdaderos negativos) es 26.4%.

El Valor predictivo positivo (VPP), que es la probabilidad de que un resultado positivo indique la presencia de enfermedad fue de 81.2% y el Valor predictivo negativo (VPN) que es la probabilidad de que un resultado negativo indique la ausencia de enfermedad, fue del 100%.

La concordancia de los resultados entre los dos antígenos utilizados se estimó por el índice Kappa que resultó ser 0.8.

La reacción cruzada observada por los sueros de pacientes con Leishmaniosis disminuye la especificidad, pero ésta es aceptable dentro de los límites convencionales. Debido a que el diagnóstico clínico no representa problema, ya que son patologías clínicamente diferentes, el extracto probado sigue siendo potencialmente útil.

7.2 PATRÓN ANTIGÉNICO RECONOCIDO POR SUEROS DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÓNICOS

Con la finalidad de obtener el patrón antigénico reconocido por los sueros de pacientes Chagásicos crónicos con el antígeno soluble de *C. luciliae*, se realizó una Electroinmunotransferencia y se encontró reconocimiento de 11 bandas inmunogénicas con pesos moleculares (PM) de 97.5, 66.62, 62.7, 60.7, 47.5, 42, 35, 30, 28, 26.5 y 24.5 kDa. La glicoproteína de 30kDa es inmunodominante, reconocida por el 100% de los sueros probados (Fig 1). Sin embargo, 5 sueros de pacientes con Leishmaniosis visceral, también reconocieron esta banda en *C. luciliae*; pero este reconocimiento menos homogéneo que el encontrado con los sueros de pacientes Chagásicos (Fig 2). Al analizar los resultados anteriores respecto a la gp de 30kDa se obtuvo una Sensibilidad del 100%, una Especificidad del 96.06% y un índice Kappa del 0.95 al comparar el patrón de reconocimiento entre *T. cruzi* y *C. luciliae*.

Después de demostrar el cruce antigénico entre *T. cruzi* y *C. luciliae*, se prosiguió a estudiar específicamente a la gp 30kDa de *C. luciliae* con el fin de conocer: 1) La homología de epitopos con otras glicoproteínas (gps) tanto en el extracto de *C. luciliae* como en el de *T. cruzi*. 2) Su estructura antigénica y 3) Su ubicación en el parásito. También se aisló la gp 30kDa para la producción de anticuerpos que se utilizarían en estudios de inmunofluorescencia, Western blot y en la clonación del gen correspondiente.

TABLA 1

Comparación de los resultados obtenidos en ELISA con sueros de diferentes enfermedades probados con antígeno de *C. luciliae* y *T. cruzi*

ENFERMEDAD	ANTIGENO	
	<i>T. cruzi</i> % de Positivos	<i>C. luciliae</i> % de Positivos
Chagas crónico n=91	91/91 100 %	91/91 100 %
Toxoplasmosis n=21	0/21 0 %	0/21 0 %
Artritis Reumatoide n=28	0/28 0 %	0/28 0 %
Lupus Eritematoso Sistémico n=5	0/5 0 %	0/5 0 %
Leishmaniosis n=32	3/32 9.3 %	21/32 65.62 %
Cardiomiopatías no Chagásicas n=41	0/41 0 %	0/41 0 %

Positivos/Pruebas totales.

TABLA 2

Extracto de *T. cruzi* (Ag. Referencia)

		Positivo	Negativo	T o t a l
Extracto de <i>C. luciliae</i>	Positivo	91 (a)	21 (b)	112 (a+b)
	Negativo	0 (c)	106 (d)	
	Total	91 (a+c)	127 (b+d)	218 (N)

Sensibilidad = 100%

Especificidad = 83.46%

VPP = 81.2%

VPN = 100%

K=0.8

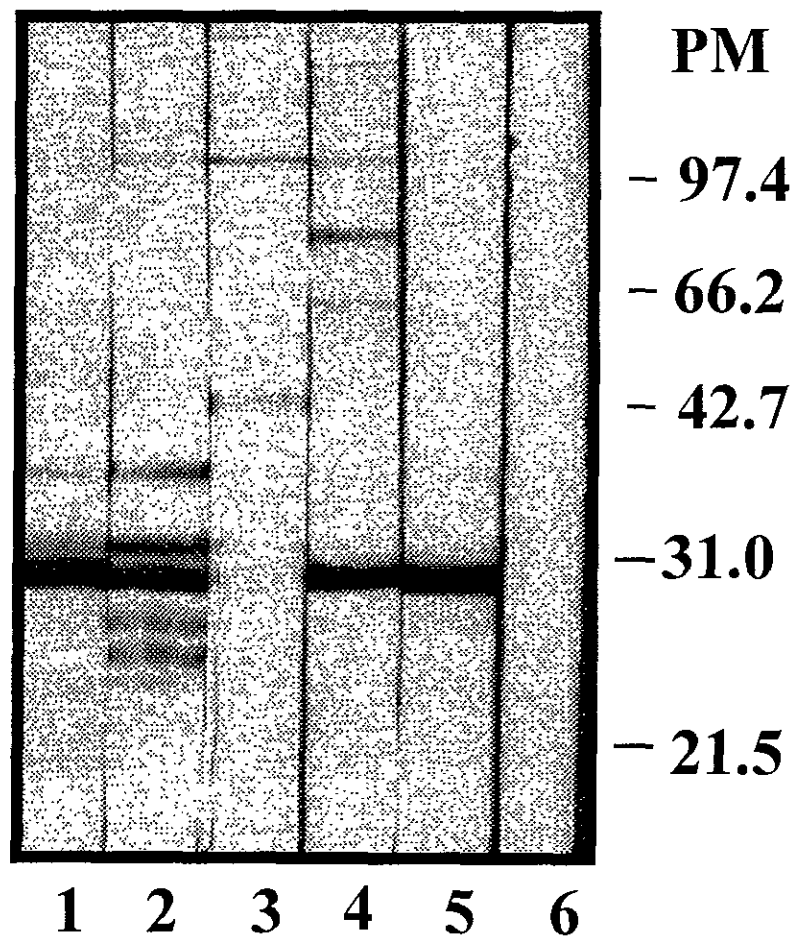


Fig 1

Analisis por Inmunotransferencia de extracto soluble de *C. luciliae* con sueros de pacientes Chagásicos crónicos. 100 μ g de proteína del extracto soluble fué aplicado a geles de electroforesis en poliacrilamida y posteriormente transferidos a una membrana de nitrocelulosa, como se describe en materiales y métodos. Luego se incubaron las tiras de nitrocelulosa en presencia de sueros de distintos pacientes Chagásicos, carriles 1-5, Blanco, carril 6.

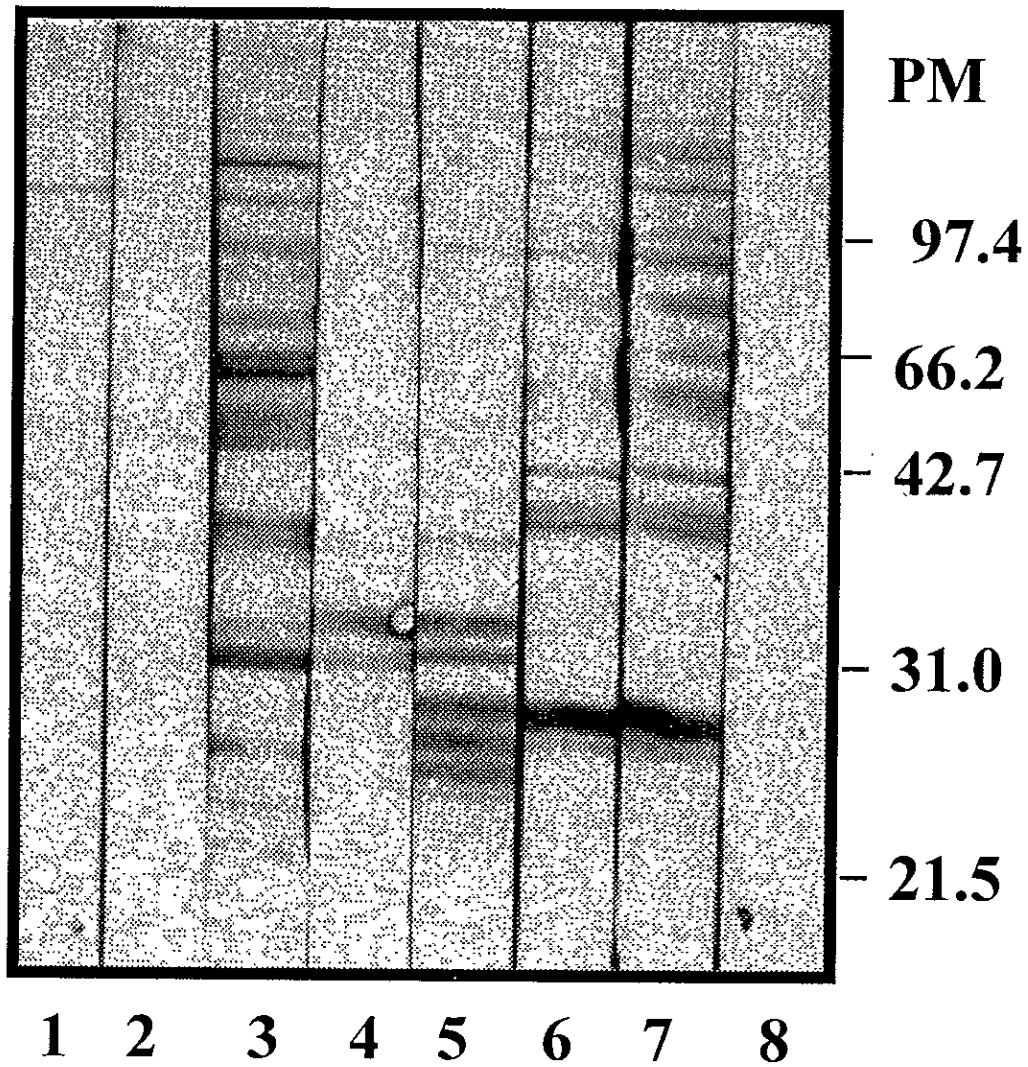


Fig 2

Análisis por Inmunotransferencia de extracto soluble de *C. luciliae* con sueros de pacientes con Leishmaniosis visceral. Las muestras se prepararon como en la figura 1 Carriles 1-2.-Blancos, 3-7.- Sueros de pacientes con Leishmaniosis visceral, 8.- Control negativo

7.3 HOMOLOGÍA DE LA GP30 CON OTRAS PROTEÍNAS TANTO DE *T. cruzi* COMO DE *C. luciliae*

Para estudiar la homología de epítomos de la gp 30kDa con otras glicoproteínas, tanto de *C. luciliae* como de *T. cruzi*, se realizó un W. Blot con sueros de pacientes Chagásicos crónicos y extracto total de *C. luciliae*. Para obtener anticuerpos monoespecíficos, se eluyeron solo los anticuerpos unidos a la región de 30kDa por varias técnicas. Los anticuerpos eluidos son utilizados nuevamente para realizar un segundo W. Blot con extractos de *C. luciliae* y *T. cruzi* para ver que otras proteínas son reconocidas por estos anticuerpos en ambos extractos. Las técnicas utilizadas para la elución de anticuerpos, utilizan compuestos distintos como Cloruro de Litio (LiCl) 5M, Urea 2M, SDS 1%, Cloruro de Magnesio (MgCl₂) 2M, Cloruro de Sodio (NaCl) 5M y Glicina-HCl pH 2.8 respectivamente.

A excepción del SDS 1% y de la Glicina-HCl pH 2.8, los otros reactivos no lograron eluir los anticuerpos contra la gp 30kDa, lo que indica que los anticuerpos contra gp 30kDa presentan una afinidad muy alta, sin embargo a pesar de que el SDS logra eluir una buena parte de ellos, comparado con las otras técnicas (Fig 3), los desnaturaliza, ya que al incubarse posteriormente con los antígenos, no hubo reconocimiento (dato no mostrado). Debido a lo anterior, se seleccionó la técnica de Glicina-HCl pH 2.8, para obtener los anticuerpos dirigidos contra la banda de 30kDa.

Cuando los anticuerpos policlonales monoespecíficos contra la gp30 se ensayaron con extractos totales de *C. luciliae*, se observó que además de reconocer a gp30, estos anticuerpos reconocieron otras dos proteínas cuyos pesos moleculares son de 31, 35 kDa (Fig. 4). Estos mismos anticuerpos reconocieron por inmunotransferencia tres proteínas en extractos totales de *T. cruzi*; cuyos pesos moleculares son de 30, 33 y 35kDa, respectivamente (Fig. 5). Estos resultados sugieren que el anticuerpo anti-gp30 reconoce un grupo de proteínas que comparten determinantes antigénicos y que estructuralmente están relacionadas.

7.4 EFECTO DEL PERYODATO SOBRE LA UNIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO

Con el fin de determinar si la gp30 contiene en su estructura carbohidratos con características antigénicas, se estudio el efecto de diferentes concentraciones de peryodato de sodio sobre el reconocimiento de la molécula por un "pool" de anticuerpos de pacientes Chagásicos

En primer lugar extractos completos de *T. cruzi* y *C. luciliae* adsorvidos a microplacas para ELISA se trataron con una concentración de peryodato de hasta 20mM y después se incubaron con un “pool” de sueros de pacientes Chagásicos (Fig. 6).

La reactividad hacia el antígeno de *C. luciliae* en ELISA, utilizando una concentración de peryodato de sodio 0.1mM , disminuyó un 18% respecto al control no tratado, mientras que a concentraciones arriba de 5mM esta disminuyó un 29%; así mismo la reactividad hacia el antígeno de *T. cruzi* a una concentración de Peryodato de sodio 0.1mM disminuyó solamente 5.6%. mientras que a concentraciones arriba de 5mM esta fue de un 21%

Esta disminución, indica que al menos un 20 a 30% de los anticuerpos están dirigidos contra carbohidratos

C. luciliae

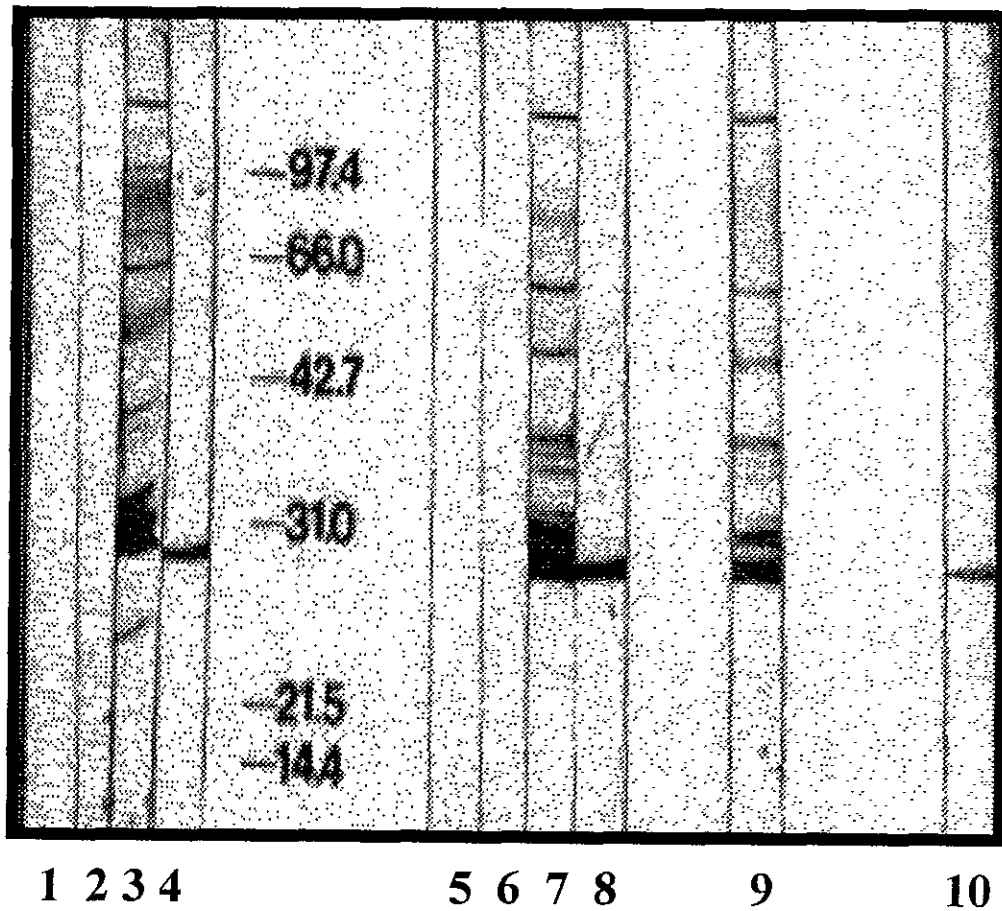


Fig 3

Análisis de distintas técnicas de elución en ensayos de W. Blot con anticuerpos de pacientes Chagásicos crónicos contra el extracto soluble de *C. luciliae*. Las técnicas se describen con detalle en materiales y métodos, 1.- Blanco, 2.- Control negativo, 3.- Control positivo sin eluir, 4.- control positivo eluido con Glicina-HCl pH 2.8, 5.- Blanco, 6 - Control negativo, 7.- Control positivo sin eluir, 8.- Control positivo eluido con LiCl 5M, Carril 9.- Control positivo eluido con Urea 2M., Carril 10.- Control positivo eluido con SDS 10%

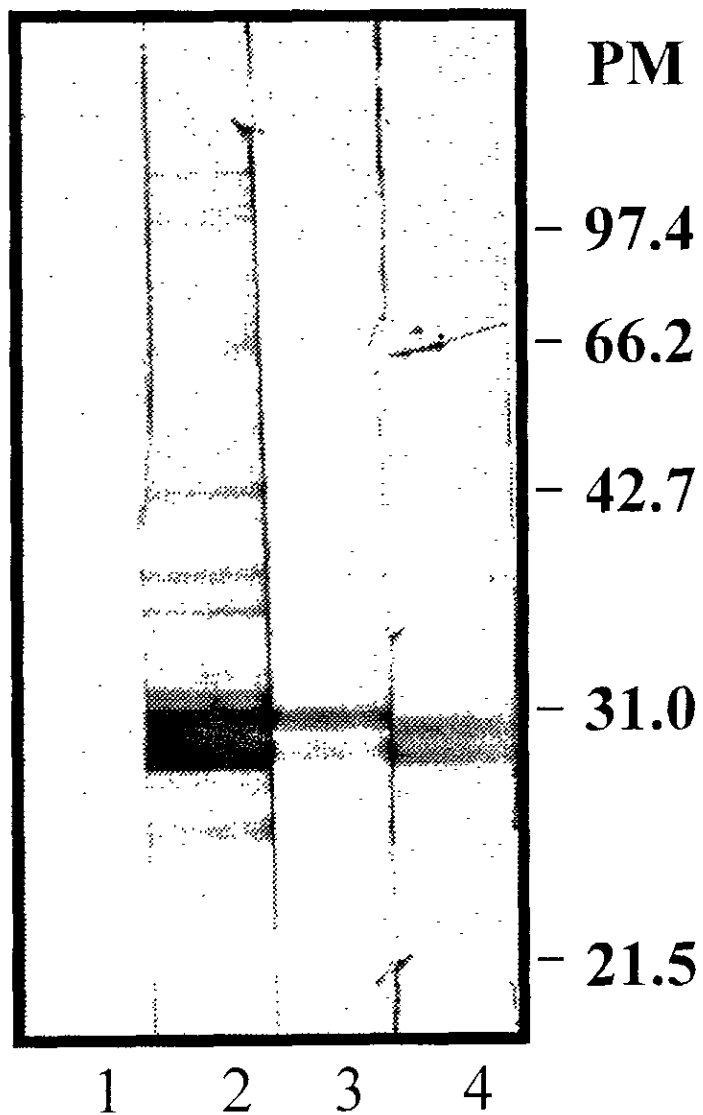


Fig 4

Ensayo de W. Blot: Reconocimiento del extracto soluble de *C. luciliae*, por anticuerpos policlonales contra la zona de 30kDa eluidos por la técnica de Glicina-HCl pH 2.8. Los experimentos se realizaron como se describe en materiales y métodos. Carriles 1.- Blanco, 2.- Control positivo, 3-4.- Anticuerpos policlonales eluidos.

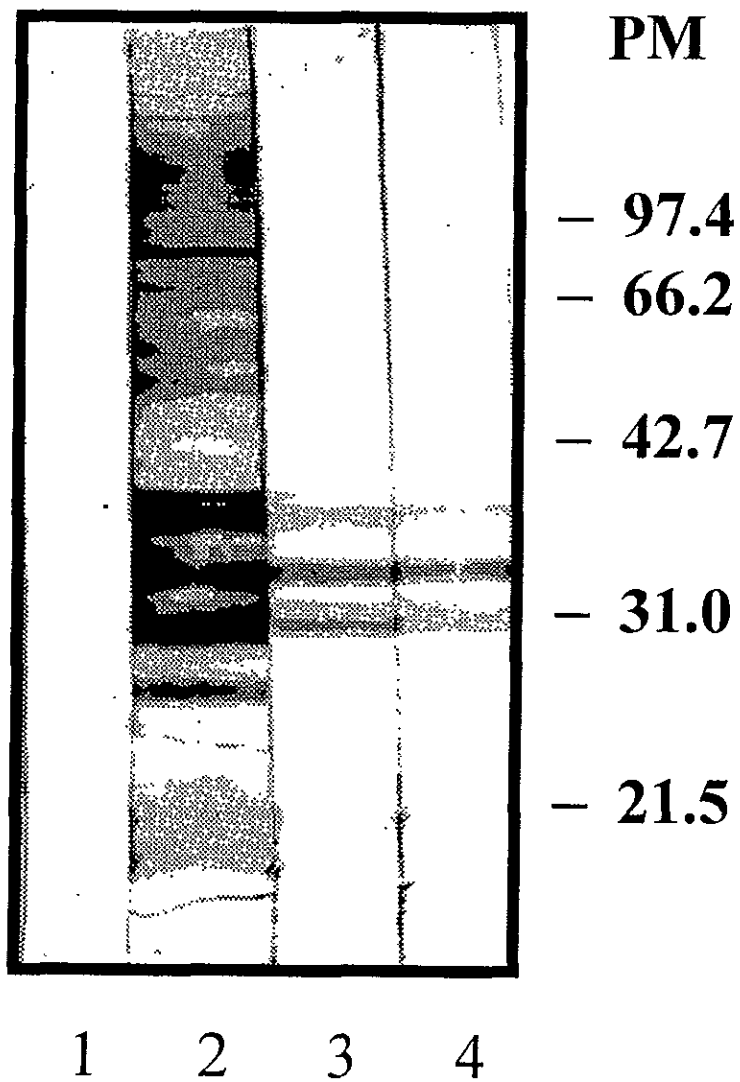


Fig 5

Ensayo de W. Blot: Reconocimiento del extracto soluble de *T. cruzi*, por anticuerpos policlonales contra la zona 30kDa eluidos con la técnica de Glicina-HCl pH 2.8: La técnica se realizó como se describe en materiales y métodos Carriles 1.- Blanco., 2.- Control positivo, 3-4.- Eluidos de dos sueros positivos.

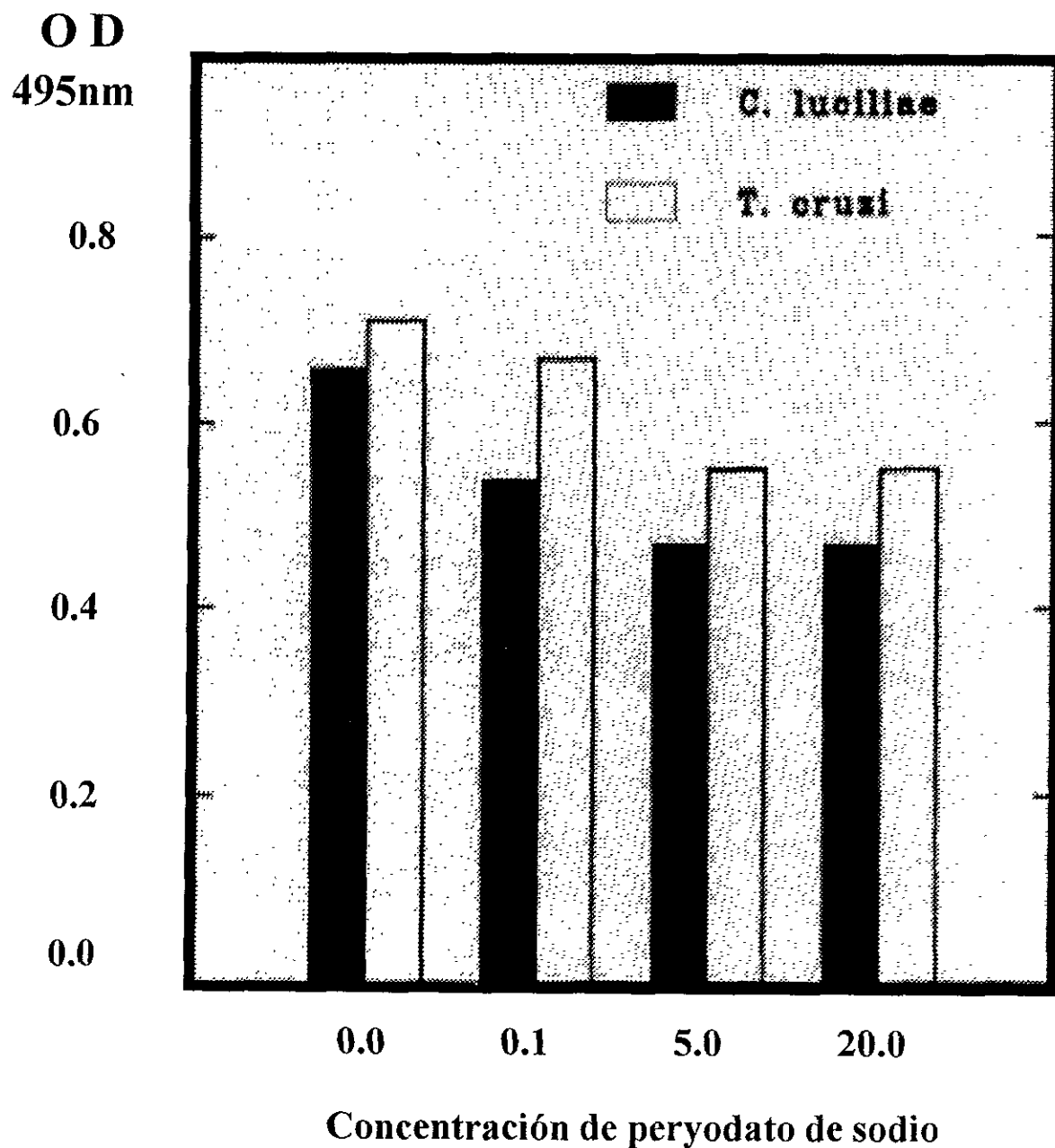


FIG. 6

Ensayo de ELISA: Efecto del peryodato sobre el reconocimiento de un "pool" sueros de pacientes Chagásicos crónicos contra el antígeno soluble de *C. luciliae* y *T. cruzi*. La detección se realizó como se describe en materiales y métodos. Lecturas de absorbancias a 495nm, obtenidas a diferentes concentraciones de peryodato de sodio.

Otro tipo de análisis consistió en tratar con peryodato de sodio extractos totales de ambos parásitos después de transferirlos a membranas de nitrocelulosa. Estos extractos tratados se incubaron con un "pool" de sueros de pacientes Chagásicos y se observó una disminución en la reactividad. La disminución de la reactividad representa un porcentaje pequeño. Por otro lado, no se afectó el reconocimiento de las bandas más inmunogénicas como la gp de 30kDa, tanto en *C. luciliae* (Fig. 7A) como en *T. cruzi* (Fig. 7B) lo que sugiere que los anticuerpos anti-gp30 están dirigidos contra epitopos protéicos o que el papel de los carbohidratos en el reconocimiento es muy pequeño.

7.5 EFECTO DE ALGUNAS ENZIMAS EN EL RECONOCIMIENTO DE LAS GLICOPROTEÍNAS POR ANTICUERPOS

Debido a que los carbohidratos de la gp 30kDa parecen no participar importantemente en los sitios de unión reconocidos por los anticuerpos de pacientes chagásicos y con el fin de verificar estos hallazgos, se realizaron ensayos más específicos, usando Glicosidasas,

Para esto, el antígeno de *C. luciliae* transferido a nitrocelulosa se trató con varias enzimas utilizando así, Hialuronidasa, β -n Acetilglicosaminidasa y Endoglicosidasa F, cuya función se describe en la siguiente tabla.^{78,81,88}

ENZIMA	FUNCION	PRODUCTO
B-N Acetilglicosaminidasa	Hidrolisa uniones glicosidicas β -D 1-3N acetoamido deoxi	N'N diacilcetobiosa
Endoglicosidasa F	Hidrolisa uniones glicosidicas β -D 1-4N acetilacetamida	N-acetilglucosamina, unida a polipéptidos
Hialuronidasa	Hidroliza uniones N acetil hexosamina del acido hialurónico	Acido 4-5 hexurónico insaturado

Con el tratamiento enzimático tampoco hubo significantes cambios en la reactividad de los anticuerpos contra la gp 30kDa ni a otros componentes (Fig 8), ya que no se observó pérdida en la reactividad hacia las bandas, comparandola con el control no tratado. La observación fue visual y subjetiva, pero los cambios no fueron evidentes.

7.6 LOCALIZACIÓN DE GP30 EN *C. luciliae* Y SU HOMÓLOGA EN *T. cruzi*

7.6.1 MÉTODO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Para determinar la ubicación de la gp de 30kDa en *C. luciliae* y su homóloga en *T. cruzi*, se realizó una inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando parásitos completos tanto de *C. luciliae* (coamastigotes) y de *T. cruzi* (epimastigotes). Los parásitos se fijaron con formaldehído y se incubaron por separado con sueros de conejo inmunizados con antígeno completo de *C. luciliae*, antígeno completo de *T. cruzi* y contra la banda de 30kDa. Los anticuerpos obtenidos contra el antígeno completo de *C. luciliae*, mostraron una fluorescencia intensa, ya que estos reconocen gran cantidad de epitopos. Con los sueros que reconocen el antígeno completo de *T. cruzi*, se observó fluorescencia positiva pero de menor intensidad, sin embargo con los anticuerpos que reconocen la banda de 30kDa, la fluorescencia fue negativa (imágenes no mostradas). Estos datos sugieren que la gp de 30kDa en *C. luciliae* y su homóloga en *T. cruzi* no tiene epitopos expuestos y por lo tanto no hay reacción antígeno-anticuerpo, ó que la proteína no sea membranal, o quizá esta sea secretada o que el proceso de fijación destruya los epitopos.

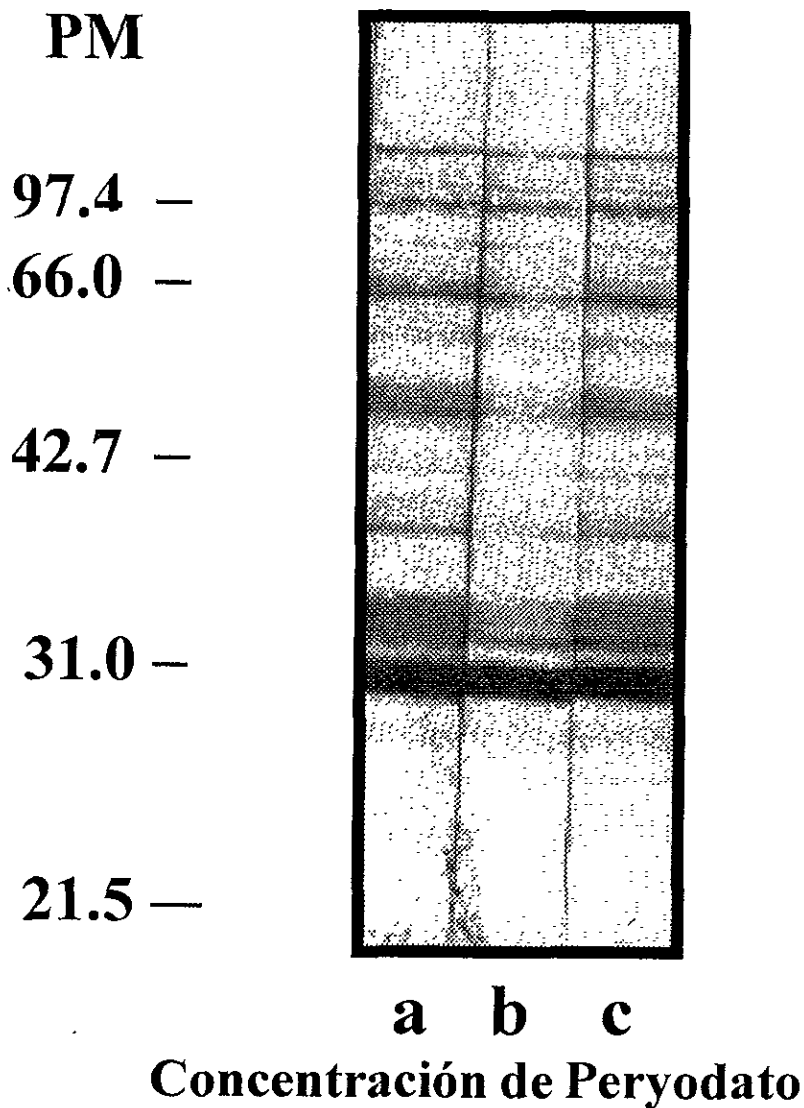


Fig 7A

Analisis deW. blot: Efecto del peryodato sobre la reactividad un "pool" de sueros de pacientes Chagásicos crónicos contra el antígeno soluble de *C. luciliae*. El antígeno ya transferido a la nitrocelulosa, se trató con diferentes concentraciones de peryodato de sodio y posteriormente se incubaron con un "pool" de sueros de pacientes Chagásicos crónicos. **a.- 0.1mM, b.- 5mM, c.- 20mM.**

PM

97.4 —

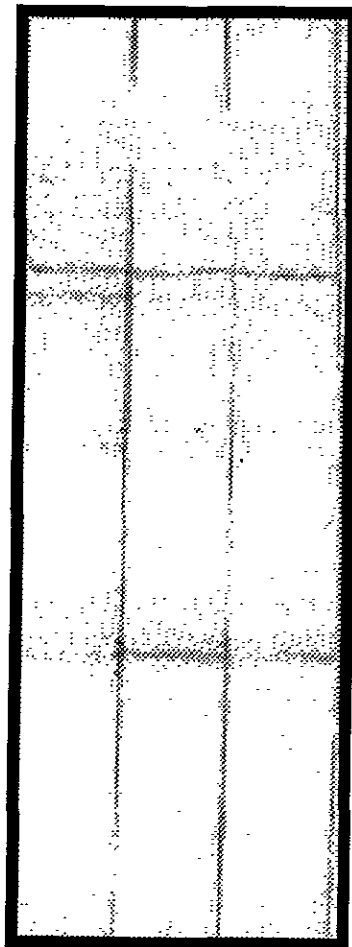
66.0 —

42.7 —

31.0 —

21.5 —

14.4 —



d e f

Concentración de peryodato

Fig 7 B

Analisis de W. blot: Efecto del Peryodato sobre la reactividad de un “pool” de sueros de pacientes Chagasicos crónicos contra antígeno de *T. cruzi*. El antígeno se trató como se describe en la figura 7A. Las concentraciones de peryodato usadas fueron: Carriles d.- 0.1mM, e.- 5mM y f.- 20mM.

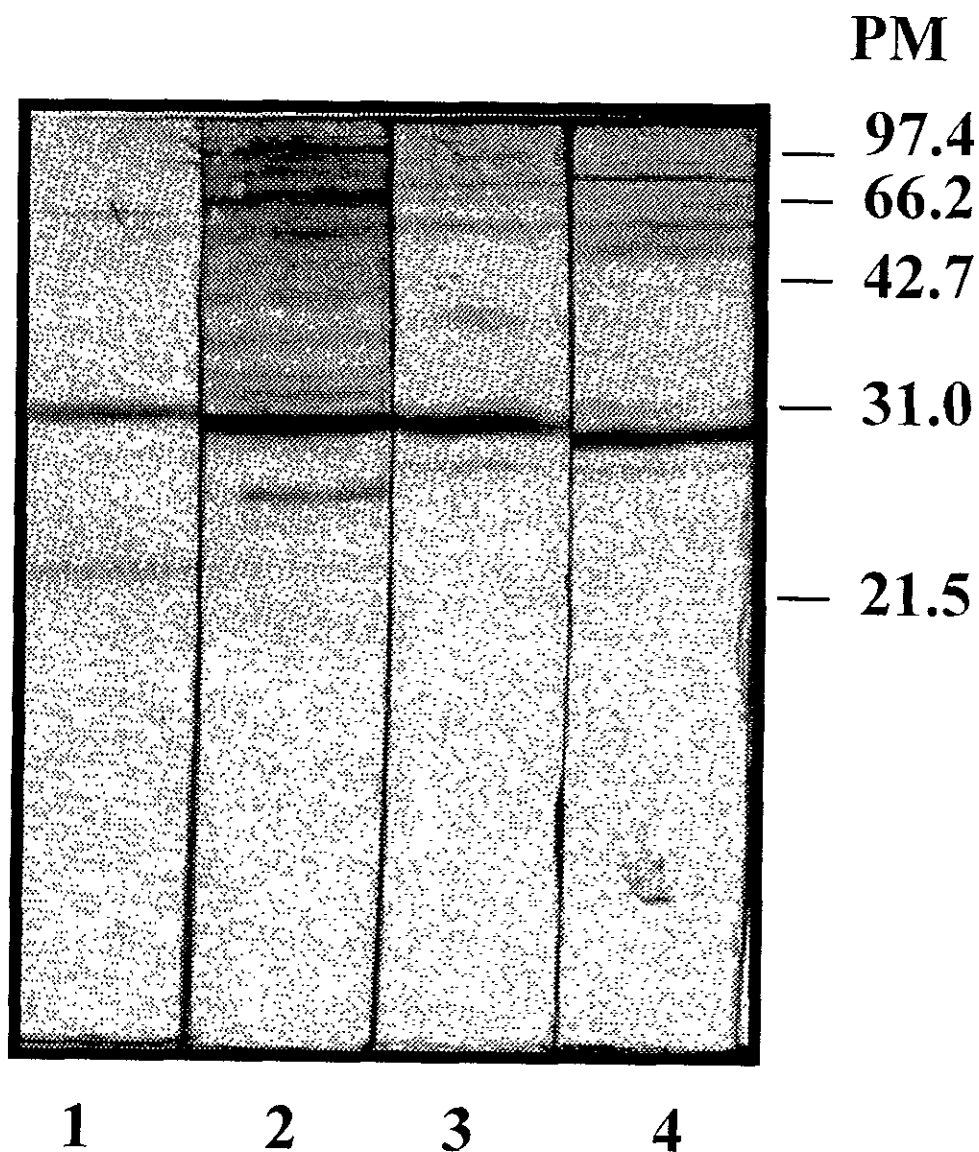


Fig 8

Analisis de W. blot: Efecto de diferentes enzimas hidrolíticas sobre la reactividad de un "pool" de sueros de pacientes Chagásico crónico contra el antígeno soluble de *C. luciliae*. El antígeno transferido, se trató por separado con cada una de las enzimas, usando el buffer adecuado para cada una de ellas. Carriles: 1.- Control (+) sin tratamiento enzimático, 2.- Tratamiento con Hialuronidasa, 3.- Tratamiento con β -N-Acetil glicosaminidasa, 4.- Tratamiento Endoglicosidasa F.

7.6.2 MARCAJE DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE CON ¹²⁵I

Para confirmar lo anterior, se realizó un marcaje de proteínas de superficie con ¹²⁵I-NaI y posteriormente se realizó una inmunoprecipitación, con suero de conejo contra la zona de 30kDa. En este experimento se obtuvo un resultado negativo, ya que no se observó bandeo en la autorradiografía, pero sin embargo no se descartaría aún la posibilidad de que fuera una proteína de superficie, ya que quizá no tenga expuesto el aminoácido Tirosina, que es el que se marca con yodo y por lo tanto no se observa en la autorradiografía.

7.6.3 CLONACIÓN DEL GENE DE *T. cruzi* QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA HOMÓLOGA A GP30 DE *C. luciliae*

Con el fin de clonar el gene que codifica para la proteína gp30 homologa en *T. cruzi*, primero se estudio si los anticuerpos de conejo inmunizados con la zona de 30kDa reconocían la proteína en tripomastigotes y amastigotes en ensayos de W. blot, estos anticuerpos reconocieron a la proteína homóloga tanto en tripomastigotes como en amastigotes, además de otras proteínas de alto PM (Fig 9)

Con estos anticuerpos se realizó el tamizaje de una biblioteca de cDNA de amastigotes/tripomastigotes (75/25%). Se tamizaron alrededor de 160.000 clonas sin encontrarse alguna positiva, lo que sugiere que posiblemente el producto de expresión es tóxico para las bacterias en el sistema empleado.

Una alternativa es realizar el tamizaje en una biblioteca genómica en la cual se expresan solo una parte de la molécula y así evitar su toxicidad, detectandose con los anticuerpos generados. Por otro lado, se puede secuenciar la gp30 purificada y diseñar oligonucleótidos con el fin de obtener sondas y utilizarlos en el tamizaje de las bibliotecas y así obtener el gene para esta proteína tanto en *C. luciliae* como en *T. cruzi*.

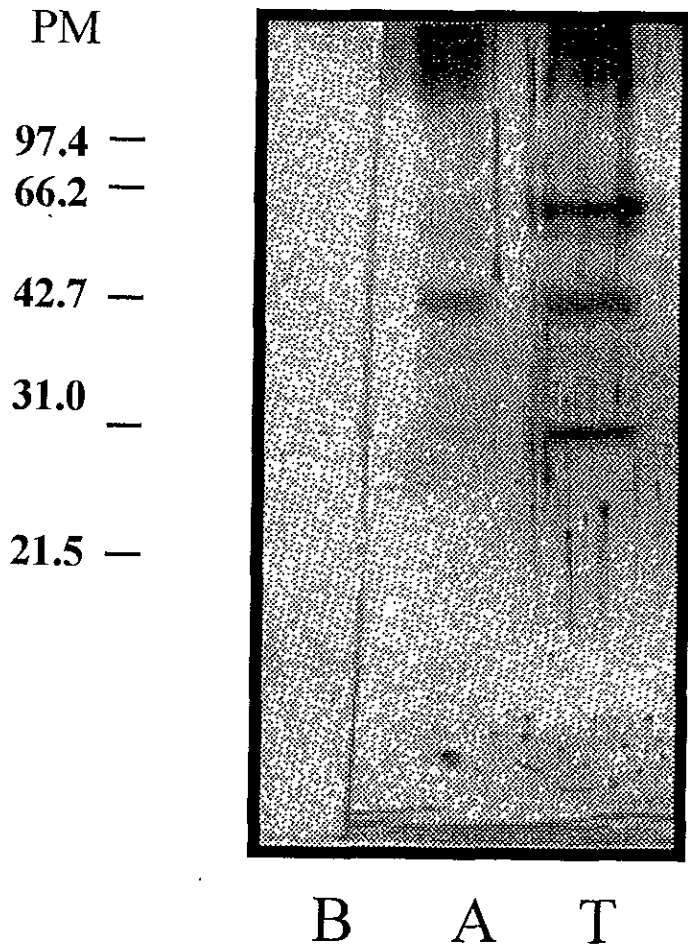


Fig 9

Analisis de W. blot: Reconocimiento de amastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* por un suero policlonal de conejo contra la zona de 30 kDa. B.- Blanco. A - Amastigotes, T.- Tripomastigotes sanguíneos.

8 DISCUSION

El establecimiento del diagnóstico en un paciente con enfermedad de Chagas crónica, continúa basándose en la confirmación serológica de la exposición al agente causal, *Trypanosoma cruzi*, dentro del contexto de los hallazgos clínicos característicos. El diagnóstico serológico de la etapa indeterminada y crónica aún adolece de la especificidad deseada, debido a la presencia de antígenos de reacción cruzada con otros organismos patógenos y no patógenos, de la misma familia de *T. cruzi*, por lo que aún se continúa con la búsqueda de mejores antígenos para el diagnóstico.

En este sentido se ha informado de la utilidad de distintas proteínas purificadas y recombinantes de *T. cruzi* para mejorar el diagnóstico, como son las denominadas SAPA, FRA, CRA, gp25 kDa, gp90 kDa entre otras, que al ser comparadas dan sensibilidades que oscilan entre 96-99%^{4,40,83,107,145}

Diversos estudios en la literatura han reportado reacción cruzada entre proteínas homólogas de otros parásitos. Dentro de estos parásitos con los que *T. cruzi* tiene cruce antigénico y que son de gran importancia, se encuentran *Trypanosoma rangeli* y *Leishmania sp.*, lo que dificulta el inmunodiagnóstico diferencial en estudios epidemiológicos, por coexistir con *T. cruzi* en las mismas áreas endémicas, aunque este no es problema desde el punto de vista clínico, ya que son entidades diferentes.

Se sabe que *T. cruzi* y *T. rangeli*, comparten el 60% de sus antígenos solubles². El principal antígeno de reacción cruzada es una gp de superficie de 72 kDa, que se encuentra en los epimastigotes de *T. rangeli*, y es reconocido por los sueros de pacientes Chagásicos; sin embargo sueros de animales inmunizados con *T. rangeli*, no reconocen antígenos de *T. cruzi*⁵⁸.

Con respecto al cruce antigénico entre *T. cruzi* y *Leishmania*, se ha visto que estos parásitos comparten un gran número de antígenos, como lo demuestra el estudio realizado por Chiaramonte³³, en donde anticuerpos de pacientes Chagásicos reconocen por inmunoblot, diversos antígenos de *Leishmania mexicana* con pesos moleculares de 124,107,97,59,32 kDa, mientras que sueros con Leishmaniosis reconocieron bandas de 85,81,70,65-60, 37 y 32 kDa, en antígenos de *T. cruzi*. Hay otras proteínas específicas que participan en la reacción cruzada, tal es el caso de la gp HSP de choque térmico con un PM de 70 kDa que se encuentra en ambos parásitos y es una de las proteínas más conservadas; Levy, demostró que sueros de pacientes Chagásicos y de pacientes con lesiones

mucocutáneas metastásicas producidas por *Leishmania brasiliensis brasiliensis*, reaccionan con esta proteína, aunque se ha visto que algunos sueros de pacientes chagásicos no reaccionan con la hsp-70 humana, a pesar de existir 70% de homología en sus aminoácidos^{50,89}.

Otra proteína que posee reacción cruzada entre *T. cruzi* y *Leishmania*, es la proteína ácida ribosomal, perteneciente a las proteínas P, que se localizan dentro de la subunidad 60S de los ribosomas, las cuales participan en la síntesis de proteínas, denominándose (LcPO, TcPO y HuPO). para *Leishmania chagasi*, *T. cruzi* y Humano, respectivamente. Así se ha visto que sueros de pacientes chagásicos y de *Leishmania chagasi*, tienen anticuerpos de reacción cruzada contra LcPO, TcPO y HuPO¹⁵².

Otra alternativa para obtener antígenos para el diagnóstico es el uso de Tripanosomátidos de insectos no patógenos al humano. La *C. luciliae* forma parte de ésta alternativa, ya que en estudios realizados en la década de los 70's se informó de su potencialidad. En este trabajo se estudió la potencialidad del estudio de *C. luciliae* en ensayos de ELISA, utilizando sueros de individuos Crónicos Chagásicos, de Leishmaniosis, Toxoplasmosis, Miocardiopatía dilatada no chagásica y Enfermedades autoinmunes. Encontramos que el extracto era reconocido por el 100% de los individuos chagásicos. así también por individuos de Leishmaniosis y al calcular los valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y el índice de correlación K, encontramos valores de 100%, 83.4%, 81 2%, 100% y 0 8 respectivamente.

Estos resultados nos permiten apoyar el uso potencial de extractos de *C. luciliae* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Así también estudiamos por medio de ensayos de inmunotransferencia, extractos de *C. luciliae* y los enfrentamos con sueros de individuos chagásicos, obteniendo el patrón antigénico. Se reconoció una banda en la zona de 30kDa que era inmunodominante e antigénica.

Con la finalidad de saber si esta banda de la zona de 30kDa de *C. luciliae* compartía estructuras antigénicas en *T. cruzi*, se realizaron eluciones de anticuerpos a partir de papel de nitocelulosa que habían sido transferidas con extractos de *C. luciliae* y de la zona de 30 kDa, las eluciones se realizaron por tratamiento con glicina-HCL pH 2.8 y se comprobó que los anticuerpos eluidos reconocían, al ser probados en otra membrana transferida con extracto de *C. luciliae*, la banda de 30kDa y otras de 31 y 35kDa y al utilizar el extracto de *T. cruzi* reconocían 3 bandas de 31,33 y 35kDa, lo que demuestra el cruce antigénico entre estos dos extractos. Los resultados sugieren que existan moléculas

estructuralmente relacionadas entre ambos parásitos, aunque no necesariamente se trate de la misma proteína.

Al calcular los valores de sensibilidad y especificidad con respecto a la banda de 30kDa, observamos que estos eran de 100% y 96.06% respectivamente, de tal forma que si pudiera purificarse y utilizarse en ensayos de ELISA, se podría obtener una prueba con valores de especificidad y sensibilidad aceptables.

Por otra parte, con el afán de conocer la ubicación celular de la gp de 30kDa tanto en *C. luciliae* como de su proteína homóloga en *T. cruzi*, se probaron varias técnicas, la primera en realizarse fue la de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) con parásitos fijados con formaldehído y se observó positividad con los sueros policlonales de conejo contra el parásito completo de *T. cruzi* y *C. luciliae*, mientras con el suero contra la zona de 30kDa la reacción fue negativa, lo cual nos indica que si estuviera esta glicoproteína en la superficie del parásito, ésta no tiene sus epítomos expuestos, por lo que no se observó reacción antígeno-anticuerpo, o bien, que probablemente su antigenicidad se pierde después de fijar los parásitos con formaldehído

Para corroborar lo anterior, se realizó la técnica de marcaje con ^{125}I de las proteínas de superficie de *C. luciliae* y al realizar la Inmunoprecipitación de estas proteínas, la reacción fue negativa. Por todo esto se concluye que si la gp de 30kDa se encuentra en la superficie, no tiene sus epítomos expuestos, lo que se apoya con los resultados de inmunofluorescencia, o no posee residuos de Tirosina, ya que no logra marcarse con ^{125}I .

Con la finalidad de conocer si los carbohidratos tienen importancia antigénica durante la infección chagásica crónica, se realizaron ensayos de W. blot y ELISA con extractos de *T. cruzi* y *C. luciliae*, los que fueron tratados con peryodato a pH ácido. Se realizó mediante la técnica previamente descrita^{66,137}. Con este tratamiento se rompen los grupos hidroxilo vecinales de los Carbohidratos, sin alterar las cadenas polipeptídicas, convirtiéndolos en grupos aldehídos, que con el subsiguiente tratamiento con Borohidruro de Sodio se reducen a alcoholes, alterando la estructura glicosídica¹⁴

Utilizando la técnica de ELISA, con un "pool" de sueros positivos, se obtuvo una disminución en la reactividad para ambos antígenos, de 29% y 21% para *Crithidia* y *Trypanosoma* respectivamente, al usar concentraciones de 20mM de peryodato de sodio. Al realizar la técnica de Western blot, se observó una pequeña pérdida de reactividad para las bandas menos inmunogénicas, sin embargo la banda de 30kDa de *C. luciliae* que es la de nuestro interés, no disminuyó su reactividad, lo que sugiere que los

carbohidratos no están involucrados como epitopos importantes reconocidos por los sueros de pacientes chagásicos crónicos hacia la banda de 30kDa.

Para corroborar lo anterior se aplicó un método más específico para eliminar los grupos carbohidratos de las glicoproteínas, que consiste en utilizar glicosidasas y se observó que con el uso de estas enzimas tampoco se afectó el reconocimiento por los anticuerpos contra la gp de 30kDa, lo que nuevamente confirma que los carbohidratos pudieran estar pobremente o no involucrados en los sitios de reconocimiento de los anticuerpos

Lo que nos sugiere que el papel de los carbohidratos como antígenos relevantes en la etapa crónica de la enfermedad, no son importantes y nuestros resultados son compatibles con datos recientemente publicados, donde demuestran que los carbohidratos como antígenos son más importantes en la fase aguda que en la crónica¹⁷⁰

Finalmente, la búsqueda de una clona en la genoteca de *T. cruzi* que codifica para la proteína homóloga a la gp de 30kDa de *C. luciliae* no fué exitosa, ya que después de varios intentos con el uso de anticuerpos policlonales no se logró encontrar ninguna clona. Quizá debido a que el gen que codifica para esta gp es un gen único y se requiera más tiempo para su búsqueda, o bien utilizar distintas estrategias de clonación génica, o bien, tratar de buscar minuciosamente la clona en una genoteca de cDNA de *T. cruzi* o de *C. luciliae*, que no pudimos identificar con técnicas de tamizaje con anticuerpos, para así producir un antígeno recombinante más específico y sin la necesidad de trabajar con un parásito altamente patógeno como lo es *T. cruzi*

Los valores aceptables de sensibilidad y especificidad, obtenidos en este trabajo, utilizando antígeno de *C. luciliae*, para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, lo hace un antígeno confiable y de gran utilidad para este fin, además de no ser patógeno, disminuye el riesgo de contaminación del personal de laboratorio, haciéndolo más fácil de manejar y con la capacidad de obtener mayor rendimiento del antígeno. Estudios posteriores sobre esta proteína deberán estar encaminados a su optimización en los ensayos para probar los límites de detección efectiva de la enfermedad. Podría utilizarse el extracto de *C. luciliae* en ensayos de ELISA, sabiendo que su especificidad es de 83.4% y que las reacciones cruzadas serán con individuos que padezcan Leishmaniosis, lo que clínicamente no representa problema diagnóstico, o bien, utilizando la proteína de *C. luciliae* de 30 kDa purificada en este mismo ensayo.

En un futuro, lo ideal sería generar un antígeno recombinante utilizando otras estrategias para la obtención del gene que codifica para la gp30 kDa, en una genoteca de *T. cruzi* o de *C. luciliae*, en virtud de que esta proteína, no requiere de los carbohidratos para ser reconocida por los anticuerpos y eso la hace candidata para ser producida en grandes cantidades por técnicas de biotecnología, en sistemas de procariontes. Para así poderla usar principalmente en el tamizaje en bancos de sangre y en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, sobre todo en pacientes con cardiopatía de origen desconocido que ingresen a diversos servicios de Cardiología en el país.

9 BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abrahamsohn, I A. & Kloetzel, J.K 1980. Presence of *Trypanosoma cruzi* antigen on the surface of both infect and uninfected cell in tissue culture. Parasitol.80 147-150
- 2.- Afchain, D , Le Ray, D., Fruit, J. & Capron, A 1979. Antigenic make up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of specific component. J. of Parasitol.65:507-514.
- 3 - Affrachino, J.L., Pollevick, G D & Fraschi, A.C.C 1991. The expression of the major shed *Trypanosoma cruzi* antigen results from the developmentally-regulated transcription of a small gene family. FEBS. Letters 280:316-320
- 4.- Almeida, E., Krieger, M A., Carvalho, M R., Oelemann, W. & Goldenberg, S. 1990 Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas Disease and blood bank screening Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 8:513-517.
- 5.- Andrade, Z. & Andrade, S. 1979. Patología en *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas Brener. Z and Andrade, Z. De Guanabara Koogan Rio de Janeiro. Cap 6 pp199-248.
- 6.- Araujo, F.G. 1985. *Trypanosoma cruzi* expression of antigen on the membrane surface of parasitized cells J. Immunol. 135: 4149-4154
- 7 - Araujo, F.G. 1985. A method for demonstration of antibodies to *Trypanosoma cruzi* by using antigens coated nitrocellulose papers strips. Am J Trop. Med. 34:242-245.
- 8.- Araujo F.G. 1986. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related Trypanosomatids. Infect. Immun 53.179-185
- 9 - Ashall, F., Yip-Chuck. D.A , Luquetti, A.A & Miles, M.A. 1988. Radiolabelled total parasite DNA probe specifically detects *Trypanosoma cruzi* in mammalian blood J Clin Microbiol 26: 576-578
- 10 .- Avila, M.A., Thiemann, O & Degrave, W. 1992. PCR amplification of *Trypanosoma cruzi* minicircus DNA from wild lysates: Diagnosis of chronic Chagas's disease Mem. Inst Oswaldo Cruz 87:23-28.
- 11 - Beltz, A. & Kierszenbaum, F. 1988. Novel Mechanism for *T. cruzi* induced supression of human lymphocytes. J. Immunol. 141:289-294.
- 12 - Biagi, F.F., & Arce, G.E. 1965. Los dos primeros casos de Miocarditis Chagásica comprobados en México. Arch. Inst Cardiol. Mex. 35:611-619
- 13.- Biological research products (Protocols and Aplications). Committed to Science Worldwide PROMEGA Corporations USA. 1990.

- 14.- Boveris, A., Sies, H., Martino, E.E., Docampo, R., Torrens, J.F. & Stoppani, A.O.M 1980 Deficient metabolic utilization of H₂O₂ in *Trypanosoma cruzi*. Biochem. J 188:643-648
- 15 - Boyden, S.V. 1951. The adsorption of protein on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera J. Exp Med. 93:107-111.
- 16.- Brener, Z. 1973. Biology of *T. cruzi*. Ann Rev Microbiol. 27:347-532.
- 17 - Brener, Z.1987. Pathogenesis and Immunopathology of Chronic Chagas's Disease Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro Suppl p205-213.
- 18.- Brener, Z., Chiari, E. & Alvarega, M.J. 1974 Observations on *T. cruzi* strains maintained over 8 years period in experimentally inoculated mice Rev Inst. Med. Trop. Sao Paulo 16:32-40
- 19.- Brumpt, E O 1914. O xenodiagnóstico. Aplicacao do diagnostico de algunas infecciones parasitarias en particular a tripanosomiasis de Chagas. Ann Paul. Med Cir 3:97-100
- 20.- Bubbitt, J.M. 1956. Adv. Carbohydrate. Chem. Biochem 11.1-14
- 21.- Burleigh, B & Andrews, N.1995 The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells Annu Rev. Microbiol. 49 .175-200.
- 22.- Camargo, E.P 1964. Origen dos Trypanosomas metaciclicos em meio de cultivo liquido Rev Med. Trop. Sao Paulo 6:93-96
- 23.- Carboneto, C.H & Malchiodi, E.L, Chiamonte, M. Durante de Isola, E., Fossati, C A & Magni, R.A. 1990 Isolation of a *Trypanosoma cruzi* antigen by affinity chromatography with a monoclonal antibody. Preliminary evaluation of its possible applications in serological tests. Cli. Exp Immunol. 82:93-96
- 24.- Casali, P & Nortkins, A.L 1989. CD5+ B lymphocytes. polyreactive antibodies and the human B-cell repertory Immunol Today 10:364-368.
- 25 - Cerisola, J A., Rabinovich, A., Alvarez, M., De Caletto, C.H & Pioneda, J 1972. Enfermedad de Chagas y la Transfusión de Sangre Bol. of Sanit Panam. 73:203-221.
- 26.- Cerisola, J.A., Russo, M C., Del Prado,C.E., Lazani, L B. & Rohwedder, R.W. 1972 Estudio comparativo de diversos métodos parasitológicos en la enfermedad de Chagas aguda. Simposium Internacional de la enfermedad de Chagas Soc. Argen. de Parasitol p97-105
- 27.- Cerisola, J A., Rohwedder, R., Segura, E., Alvarez, M & Wynne, J. 1974 Xenodiagnóstico. Normalización-utilidad. Ministerio de Bienestar Social, Buenos Aires, Argentina, pp 17-20.
- 28 - Cerisola, J.A. 1977. Chemoterapy of Chagas' infection in man. PHAO Sc Publications 347:35-41

- 29 - Cerisola, J.A., Alvares, M. & De Rissio, A.M. 1970. Immunological diagnosis of Chagas disease serological development of patients with Chagas disease. Rev. Inst. Med Trop. Sao Paulo 12:403-411.
- 30.- Cerrone, C. 1991. Macrophage regulation of Immune responses of spleen cells from mice infected with *T. cruzi* Cell. Immunol.138:423-436.
- 31 - Chagas, C. 1909. Nova Tripanosomiase Humana Estudos sobre e morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* N.GEN.SP. Agente etiologico de nova entidade morbida do homen. Mem. Inst O Cruz 1.159-170.
- 32 - Chagas, C 1911. Nova entidade morbida do homen. Resumo geral dos estudos etiologicos e clinicos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 3:219-222.
- 33.- Chiaramonte, M.G., Taranton, N.J., Zwirner, N.W. & Margni, R.A 1994 Cross reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen. Clin. Exp Immunol 3.417-423
- 34.- Chiller, J.M., Samudio, M.A. & Zouleck, G. 1990. IgG antibody reactivity with *T. cruzi* and Leishmania antigens in sera of patients with Chagas disease and Leishmaniasis. Am J Trop. Med Hyg 43:650-656.
- 35 - Cohen. C.M., Kalish, D., Jacobson. B.S , & Branton, D. 1977. Membrane isolation on poly-lysine coated beats J. Cell Biol. 75:119-134
- 36 - Corral, R., Freilij, H & Grinstein, S 1987. Specific circulating immune complexes in acute Chagas' disease Rev. Inst. Med Trop. Sao Paulo 29.26-32.
- 37.- Corral, R.S., Orn, A., Freilij, H.L., Bergman, T. & Grinstein, S 1989. Purification and Charaterization of an 80 kDa *Trypanosoma cruzi* urinary antigen J Clin. Microbiol 27:145-151
- 38 - Cossio, P.M., Diez, C., Szarfman, A., Kreutzen, E., Candiolo, B and Arana, R.M 1974 Chagasic cardiopathy. Demostration of an serum gamma globulin factor wich reacts with endocardium and vascular structures. Circulation 49:13-21
- 39.- Cotrim, P.C., Paranhos, G.S., Montara, R.A., Wanderley, J., Rassi, A., Camargo, M.E & Franco da Silveira, J. 1990. Expression in *Escherichia coli* of a dominant immunogen of *T. cruzi* recognized by human Chagasic sera. J Clin. Microbiol 28 519-524
- 40.- Da Silveira, F.J., Paranhos, G.S., Cotrim, P.C., Montana, R.A., Camargo, M.E., Rassi, A., Wanderley, J., Corral, R., Frieji, H.L., Grinstein, S. & Degrave, W. 1990. Antigens of *Trypanosoma cruzi* with clinical interest cloned and expressed in *E. coli*. Mem. Inst O Cruz, Rio de Janeiro 85 507-511.

- 41.- De Almeida, R.W & Chiari, E. 1987 Avaliacao de antígenos do *Trypanosoma cruzi* para a reacao de hemaglutinacao indirecta 1- Diferentes extractos antigénicos. Rev. Inst. Med Trop. Sao Paulo 29:178-182
- 42.- De Almeida, R.W. & Chiari, E. 1987. Avaliacao de antígenos do *Trypanosoma cruzi* para a reacao de hemaglutinacao indirecta 2 Antígenos de diferentes amostras e formas evolutivas. Rev. Med Trop Sao Paulo 29:183-188
- 43.- De Paolasso, R.W & Basso, B. 1979. Hemocultivos en la enfermedad de Chagas-Mazza neonatal Prens. Med. Arg. 66:594-598
- 44.- De Hubsch, R.M , Chiechie, N., Comach, G , Rangel-Aldao, R. & Gusmao, R.D 1988. El ensayo inmunoenzimático en micrigotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) en el diagnostico de la enfermedad de Chagas I Estudio comparativo de dos preparaciones antigénicas de *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst. Oswaldo Cruz 83:277-285
- 45.- Dias, E. 1934. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro. 26:83-84
- 46 - Dias, J.C.P. 1979. Mecanismo de Transmisao In *Trypanosoma cruzi* and Doensa de Chagas, Z. Brener and Andrade (eds), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brazil.
- 47.- Diaz, C., Nussenzweig, V. & Gonzáles, A. 1992 An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood Am J Trop Med Hyg. 46:616-623
- 48.- Dirección General de Epidemiología 1989 No. 1
- 49.- Dos Santos, R.R & Hudson, L. 1980. *Trypanosoma cruzi*: Binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. Parasite Immunol 2 1
- 50 - Engman, D.M., Dragon, E.A. & Donelson, J.E. 1990 Human humoral immunity to hsp70 during *Trypanosoma cruzi* infection J. Immunol. 144:10. 3987-3991.
- 51 - Factor, S.M., Cho, S., Wittner, M & Tanowitz, H 1985. Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease. Am. J Trop Med Hyg. 34:246-250
- 52.- Franco, J. & Colli, W. 1981 Chemical composition of the plasma membrane from epimastigotes forms of *T. cruzi*. Biochem. et Biophys Acta 644:341-350
- 53 - Frasc, A.C.C., Sanchez, O.D. & Cazzulo, J.J. 1990 Prospects of defined proteins for vaccine development. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 85:523-529.
- 54 - Frasc, A.C.C. 1994. Trans-sialidase, SAPA aminoacid repeats and the relationship between *T. cruzi* and the mammalian host. Parasitol. 108:537-544

- 55 - Freilij, H., Müller L. & González-Cappa, S.M. 1983. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas's disease. *J. Clin. Microbiol* 18:327-332
- 56.- Gloss, G., Barrera, M., Monteón, V.M. & Reyes, P.A. 1990. Tripanosomiasis Americana y Cardiopatía Chagásica Crónica en el INC "Ignacio Chavez" *Arch. Inst. Cardiol Mex* 60:261-266.
- 57.- Guerreiro, C. & Machado, A. 1913. Da resao de Bordete Gengou na molestia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil. Med.* 27:225-226.
- 58.- Guhl, D., Hudson, L., Marinquelle, C. J., Morgan, S. J. & Jaramillo, C. 1985. Antibodies response to experimental *Trypanosoma rangeli* infection and its applications for immunodiagnosis of South American Trypanosomiasis. *Acta Tropica* 42:311-318.
- 59.- Guhl, F., Hudson, L., Marinkelle, C. J., Jaramillo, C.A. & Brige. 1987. Clinical T. Rangeli infection as a complication of Chagas disease. *Parasitol.* 94:485-484
- 60.- Hall, F.B., & Joiner, K.A. 1991. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defenses. *Immunol Today.* 1:A22-A27.
- 61 - Hanson, W.L. 1976. *Immunology of American Trypanosomiasis* Blackwell Scientific Publication London, England. 17:222-233
- 62 - Hanson, W.L. 1977. Immune response and mechanism of resistance in *Trypanosoma cruzi* PAHO Sc Publications 347:22-25
- 63.- Hatcher, F.M., Kuhn, R.E., Cerrone, M.C. & Burton, R.C. 1981. Increased natural killer cell activity in American Trypanosomiasis. *J. Immunol.* 127:1126-1129
- 64.- Hernandez, C., De Diego, J.L., Alcina, A. & Fresno, M. 1992. A *T. cruzi* membrane protein shares an epitope with a lymphocyte activation antigen and induces crossreactive antibodies. *J. Exp Med* 175:1473-1482
- 65.- Hoffman, C. 1928. Nota acerca de un probable transmisor de Tripanosomiasis Humana en el estado de Veracruz. *Rev. Med Biol.* 8:12-18.
- 66 - Hudson, L. & Hay, F.C. *Practical Immunology* Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1980 p203.
- 67.- Hulsebos, L.H., Choromanski, L. & Kuhn, R.E. 1989. The effect of interleukin 2 on parasitemia and myocarditis in experimental Chagas' disease. *J. Protozool.* 36:293-298
- 68.- *Immunoscreening of Lambda Expression Libraries with the Protoblot Immunoscreening system* Promega Protocols and applications Guide. 1992. pp 90-95.

- 69.- Jaffi, R., Jaffe, W.G. & Kozina, C. 1959. Experimentelle herzeränderungen durch organ-spezifische autoantikörper, Frankfurtz Pathol. 70:235-240.
- 70.- Jörg, M.E. 1974. *Trypanosoma cruzi*, anarquía angiotopográfica por descapilarización mesenquimorreactiva, cofactor patogénico de la miocardiopatía crónica Prens. Med. Arg 61: 94-101
- 71.- Katzin, A., Alves, M.J., Abuin, G. & Colli, W. 1989. Antigenuria in chronic chagasic patients detected by monoclonal antibody raised against *Trypanosoma cruzi*. Trans Roy. Soc. Trop Med. Hyg 83:341-343.
- 72.- Khoury, E.L., Diez, C., Cossio, P.M. & Arana, R.M. 1983. Heterophilnature of EVI antibody in *T. cruzi* Infection. Clin. Immunol and Immunophatol. 27:283-288.
- 73.- Kierszenbaum, F. & Sonnenfeld, G. 1982. Characterization of the antiviral activity produced during *Trypanosoma cruzi* infections and protective effects of exogenous interferon against experimental Chagas' disease. J. Parasitol 68:194-200.
- 74.- Kierszenbaum, F. 1986. Autoimmunity in Chagas disease. J Parasitol. 72:201-211
- 75.- Kierszenbaum, F. & Beltz, L. 1989. Selective Suppressive effects of *T. cruzi* on activated human lymphocytes Infec and Immun. 57:2301-2305
- 76.- Kierszenbaum, F. & Cuna R. 1989. *T. cruzi* reduces the number of high affinity IL-2 receptors on activated lymphocytes by supressing the expression of the pss and p70 receptor components J Immunol. 143:275-279.
- 77.- Kierszenbaum, F., Mejía-López, H. & Szein, M.B. 1994. Inhibition of *T. cruzi* specific immune response by a protein produced by *Trypanosoma cruzi* in the course of Chagas's disease Immunol 81:462-467.
- 78.- Kobata, A. 1979. Use of Endo and Exoglicosidasas for structural studies of glycoconjugates Anal Biochem. 100:1-14.
- 79.- Köberle, F. 1956. Patogenese dos megas. Rev. Goiana de Medicina 2:101-110
- 80.- Köberle, F. & Alcantara, F.G. 1960. Mecanismo da destrusao neuronal do sistema nervioso periferico na molestia de Chagas. Hospital Rio. 57:1057-1060.
- 81.- Koide, N. & Muramatsu, T. 1974. Endo-beta- N acetylglucosaminidase acting on carbohydrate moieties of glycoproteins purification and properties of the enzyme from *Diplococcus pneumoniae* J Biol Chem. 249:4897-4904.
- 82.- Kozma, C. And Drayer, B. 1961. Estudios inmunopatológicos en diversas cardiopatías Gaz Med. Caracas. 70:251-254.

- 83 - Krieger, A.M. Almeida, E., Oelemann, W., Lafarle, J.J., Pereira, B.J., Krieger, H., Carvalho, M.R. & Goldenberg, S. 1992 Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas Disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 46:427-434.
- 84 - Laemmli, U.K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 *Nature*. 227:680-685.
- 85 - Laguers, R.P., Cabeza Meckert, P. & Chambó, J. 1991 Origin and significance of anti-heart and anti-skeletal muscle antibodies in Chagas disease. *Research Immunol.* 142:160-165.
- 86.- Lane, D. 1988. *Antibodies a Laboratory Manual*. De. Halow. Cold Spring Harbor Laboratory p553-555.
- 87.- Laranja, F., Diaz, E., Nobrega, G. & Miranda, A. 1956 Chagas' Disease. a clinical, epidemiologic and pathology study. *Circ.* 14:1035-1060.
- 88.- Lennarz, W.J. & Gerald, W.H. 1994 *Methods in Enzymology Vol 230* Academic Press San Diego California. Pp 390-417 y 445-446
- 89.- Levy-Yeyati, P., Bonnefoy, S., Mirkin, G., Debrabant, A., Lafon, S., Panebra, A., Gonzales - Cappor E., Debdet, J.P., Hontebeyrie-Joskowisz M. & Levin M.J. 1992 The 70kDa heat shock protein is a major antigenic determinant in human *Trypanosoma cruzi* *Leishmania braziliensis brasiliensis* mixed infection *Immunol. Lett.* 31.1, 27-33
- 90 - Lopes, J.D., Caulada, Z., Barbieri, C. & Camargo, P. 1981. Cross reactivity between *T. cruzi* and Insect Trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas Disease *Am. J. Trop Med Hyg* 30:1183-1188.
- 91 - Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Rondall, R.J. 1951 Protein measurement with folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 92.- *Lucha contra las Enfermedades Tropicales. Segundo Informe Anual. Folleto del Programa Especial. PNUD/Banco Mundial/OMS Ginebra 1979.*
- 93.- Lugones, H. 1978. Actualización terapéutica. Tratamiento de la enfermedad de Chagas aguda en niños. *Pediatría.* 2:103-105.
- 94 - Magarinos-Torres, C. 1929 Patogenia de la miocarditis crónica en la enfermedad de Chagas V Reunión de la Soc. Arg. de Patología Reg. del Norte 2:902-908.
- 95.- Magarinos-Torres, C. 1958. Arteriosclerosis das finas ramificacoes arteriais do miocardio (coronarite chagásica) e miocitólise focal do miocardio na cardiopatia chagásica crónica. *Hospital.* 54:597-602.

- 96.- Manual de técnicas de laboratorio. INDIECH, Ministerio de Salud y Medio Ambiente. Argentina 1984.
- 97.- Martínez-Silva R., López, U A , Colón J.I. & Chiriboya, J. 1969. Isolation of *Trypanosoma cruzi* from blood of acutely and chronically infected mice in tissue culture Am J Trop. Med. Hyg 18:878-884.
- 98 - Maslov, D.A., & Simpson, L. 1995. Evolution of Parasitism in Kinetoplastid Protozoa. Parasitol Today. 11:30-32.
- 99 - Matsumoto, A., Yoshima, H & Kobata, A 1983. Carbohydrates of Influenza virus Hemagglutinin: Structures of the whole neutral sugars chains Biochem. 22:188-196
- 100 - Mazza, S. 1940. Investigación sobre la enfermedad de Chagas Estudios sobre patología regional Jujuy Argentina I-X Publicaciones Mision No 55 pp152-160.
- 101.- Mazza, S. & Júrg, M.E.1936. Consideraciones sobre la patogenia de la enfermedad de Chagas Los periodos autonomoclinicos de la Tripanosomosis. Actas 9a Reunión de la Sociedad Argentina de Patología Regional, Mendoza Ed UMBA 1:221-238.
- 102.- Mazza, S., Montana, A , Benitez, C & Janzi, E 1936. Transmisión del *Schyzotrypanum cruzi* al niño por leche de madre con enfermedad de Chagas. Publicación de la M E P.R A 28:41-50
- 103.- Mazza, S & Jörg, M.E.. 1939. Anatomía patológica de enfermedad de Chagas y de animales patológicamente infectados por S cruzi. Actas y trabajos VI Congreso Nacional de Medicina, Córdoba 3:168 Id. Res. Actualidad Médica Mundial (Bs As) 10:277-281
- 104.- Mazzotti, L 1940. Dos casos de la enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca. Gac Med Mex. 70:417-420.
- 105 - Milani, S.R. & Travassos, L.R 1988. Anti- α galactosyl antibodies in Chagasic patients Possible biological significance Brazilian J. Med. Biol Res.21:1275-1278
- 106.- Minoprio, P., Itahara, S , Heusser, C., Tonegawa, S & Cotinha, A 1989 Immunology of murine *T. cruzi* infection.The predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCR T cells Immunol. Rev. 112.183-207.
- 107.- Moncayo, A & Luquetti, A.O. 1990. Multicentre double blind study for evaluation of *T. cruzi* defined antigens as a diagnostic reagents. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 85 489-495
- 108.- Moncayo, A. 1993 Rev. Soc. Bras Med Trop.3:65-71.
- 109 - Monteón, V.M. & Reyes, P.A. 1989 Mecanismos de resistencia innata y adquirida al *T. cruzi*. Arch. Inst. Cardiol. Mex. 59:529-535.

- 110 - Monteón, V.M., Reyes L.P.A. & Rosales, E.J.L. 1994. Detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras experimentales por el método de reacción en cadena de la ADN Polimerasa Arch Inst Cardiol. Mex. 64:135-143
- 111 - Morel, C.M. 1984 Genes and Antigens of Parasites (A Laboratory Manual) Segunda De Fundacao Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.
- 112.- Morris, S.A., Tanowitz, H.B., Wittner, M. & Bilezikian, J.P. 1990 Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas disease Circul.. 82:1900-1905.
- 113.- Moser, D.R., Kirchhoff, L.V. & Donelson, J.E. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J. Clin Microbiol. 27:1477-1481.
- 114.- Moya, P.K., Paolasso, R.D., Blancos-Lapasset, M., Santamartino, C. & Baso, B. 1985. Tratamiento de la enfermedad de Chagas con Nifurtimox durante los primeros meses de vida Medicina. 45:553-558.
- 115.- Nickerson, P., Orr, P. & Schoeder, M. 1989. Transfusion associated to *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area Ann Int. Med 111:851-853.
- 116.- Nabors, G.S. & Tarleton, R.L. 1991 Differential control of interferon gamma and IL-12 production during *Trypanosoma cruzi* infection J. Immunol. 146:3591-3595.
- 117 - Neal, R.A. 1973. Superiority of the culture technique over xenodiagnosis for detection of Tripanosomes in Chagas disease International Congress of Medicine and Malaria Atenas p.56-59
- 118 - Nogueira, N., Chapman, S., Tidigs, J.D., Unkeless, J. & Cohn, Z. 1981 *Trypanosoma cruzi*. surface antigens of blood and culture forms. J. Exp Med. 153:629-639
- 119.- Ouaisi, M.A., Taibi, A., Cornette, J., Velge, P., Marty, B., Loyens, M., Esteva, M., Rizvi, F.S. & Capron, A. 1990. Characterization of a major surface and secretory-excretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes and identification of potential protective antigen Parasitol 100:115-124.
- 120.- Paranhos, G.S., Cotrim, P.C., Montara, R.A., Rassi, A., Corral, R., Frieji, H.L., Grinstein, S., Wanderley J., Camargo, M.E. & Franco da Silveira, J. 1990. *Trypanosoma cruzi* cloning and expression of an antigen recognized by acute and chronic human Chagasic sera. Exp. Parasitol. 71:284-293.
- 121.- Parodi, A., Pollevick, G.D., Mautner, M., Buschiazzo, A., Sanchez, D.O. & Frasch, A.C.C. 1992 Identification of the gene(s) encoding the Trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. EMBO 11:1705-1710.

- 122 - Paulone, Y., Chuit, R., Pérez, A. C., & Segura, E.L. 1987 Field research on an epidemiological surveillance alternative of Chagas disease transmission: the primary health care (PHO) strategy in rural areas. *Red. Soc. Arg. Microbiol.* 40 (Suppl) 83-87.
- 123.- Pereira, M.E.A., Mejia, S.J., Ortega, B.E., Matzilevich, D & Prioli, C E.1991 The *Trypanosoma cruzi* neuraminidasa contains sequences similar to bacterial neuraminidases to YWTD repeats of the LDL receptor and to type III modules of fibronectin *J Exp Med* 174:179-192
- 124.- Perrin, T., Diaz, & Brener, M. Nota previa sobre las primeras comprobaciones serológicas.
- 125.- Peterson, D.S., Wrightsman, R.A. & Manning, J.E. 1986. Cloning of a major surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat. *Nature.* 322 566-568
- 126.- Pifano, F.C. 1954. EL diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase crónica Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles *Arch Venez Patol. Trop.* 2 89-120
- 127.- Pinto, D.C. & Brener, S. 1984 Chagas Disease and blood transfusion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.* 79:139-147
- 128 - Pizzi, T.P., Acosta de Croizet, V., Smok, G & Diaz, M A 1982 Enfermedad de Chagas en un paciente con trasplante renal y tratamiento inmunosupresor. *Rev. Med. Chil* 110:1207-1210.
- 129.- Prata, A 1968. Formas clínicas da doença de Chagas, Concado De Ofna. del Edo. Minas Gerais. Bello Horizonte, Brasil. 344-347
- 130.- Raaflaub, J. & Ziegler, W.H. 1976. Information of Pharma research department of clinical investigation and developmente. Basilea Hoffmann, F Roche & Co
- 131.- Rangel-Aldao, R., Comach, G., Allende, O., Cayama, E., & Delgado, V. 1986. *Trypanosoma cruzi* polypeptide markers of epimastigotes and tripomastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 20:25-32
- 132.- Reyes, L P A., & Monteón, P V M. 1994 Algunos aspectos de la patología de la Tripanosomiasis Americana a la luz de la Biología Molecular. *Arch. Inst. Cardiol. Mex* 64:431-432
- 133.- Reyes, M.B., Lorca, M, Munoz, P. & Fransch, A.C.C. 1990 Fetal IgG specification against *Trypanosoma cruzi* antigens in infect newborns *Proc. Nat. Acad of Sci , USA* 87.2846-2850.
- 134.- Ribeiro Dos Santos, R & Hudson, L. 1980 *Trypanosoma cruzi* Immunological consequences of parasite modifications of host cells *Clin. Exp. Immunol* 40.36-41.
- 135.- Ritter, D.M. & Kuhn, R.E.1990. Antigen specific T-helper cells abrogate suppression in *Trypanosoma cruzi* infected mice *Infec Immun.* 58.3248.

- 136 - Rohwedder, R.W. 1968. Nuevo método de concentración de hemoparásitos extraeritrocíticos método de silicones. Bol. Chil. Parasitol. 23:42-45.
- 137 - Robinson P.A., Anderston, B.H. & Lovini T.L.F. 1988. Nitrocellulose-bound antigen repeatedly used for the affinity purification of specific polyclonal antibodies for screening DNA expression libraries. J. of Immunol. methods 108:115-122.
- 138.- Rosales E.J.L. Aislamiento y caracterización de tres componentes de *Entamoeba histolytica*: Colagenasa, Lectina y Hemolisina. Tesis de Doctorado Departamento de Bioquímica, CINVESTAV. México. Mayo 1987.
- 139.- Rossi, M.A., Concalvez, S. & Ribeiro Dos Santos, R. 1984. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in Balb/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis Am. J. Pathol. 114:209-216.
- 140.- Rossi M.A. 1990. Myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* myocarditis a role of macrophages Can J. Cardiol. 293:298.
- 141.- Sadigursky, M., Acosta, A.M. & Santos-Buch, C.A. 1982. Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by *Trypanosoma cruzi* clone. Am. J. Trop. Med. Hyg. 31:394-398.
- 142.- Salazar, P.M., Haro, Y., Jiménez, J.M. & García, C.E. 1983. Dos nuevas localizaciones de transmisores de la enfermedad de Chagas en la república Mexicana. Salud Pública Mex. 77-82.
- 143.- Schaper, J., Froedi, R., Hein, S.T., Buck, A., Hashizume, H., Spersei, B., Friedl, A. & Bleese, N. 1991. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in delayed cardiomyopathy. Circul. 83:504.
- 144.- Scharfstein, J., Luqueti, A., Murta, C.M.A., Senna, M., Rezende, J.M., Rassi, A. & Mendosa, P.L. 1985. Chagas Disease: Serodiagnosis with purified Gp 25 antigens J. Trop. Med. Hyg. 34:1153-1160.
- 145.- Schechter, M., Voller, A., Marinkelle, C.J., Flint, J.E., Guhl, F. & Miles, M.A. 1983. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American Trypanosomiasis. Lancet. 2:939-941.
- 146.- Schmidt, G.B. & Robert, L.S. Fundamentos de Parasitología. Interamericana. Primera Edición De CECSA México D.F. 1984. pp94-96.
- 147.- Schmuñis, G.A., Cossio, P.M., Sarfman, A., Coaraza, L. & Arana, R.M. 1978. Tissue reacting antibodies (EVI antibodies) in Nifurtimox-Treated patients with Chagas disease. J. of Infec. Disease 138:401-404.
- 148 - Schmuñis, G.A. 1991. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease. Status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. Transfusion. 31: 547-557.

- 149.- Schofield C.J. 1994. Triatominae Biología y Control Eurocomunica Publications pag 17-19. 49-54.
- 150.- Scott, M.T. & Snary, D 1982. American Trypanosomiasis (Chagas's Disease) In Immunology of parasitic infections, S. Cohen & K.s. Warren, Ed.. Blackwell Sc Pub. 261-275.
- 151.- Segura, L.E., Carlomagno, M., Titto, E., Lansetti, C.J. & Pérez, A. 1989. Compendio de parasitosis humanas producidas por protozoos. Enfermedad de Chagas, Leishmaniasis, Malaria, Toxoplasmosis. Inst. Nac. de Diagnóstico e Investigacione de la Enfermedad de Chagas. "Dr. Mario Fatała Chavén".
- 152.- Skeiky, Y.A W., Benson, D R., Elwasila, M, Badaro, R, Burns, J.M. & Reed, S.G 1994 Antigens shared by Leishmania species and Trypanosoma cruzi Immunological comparison of the acidic ribosomal PO proteins Infect. and Immun. 62:1643-1651.
- 153.- Soon, L & Tarleton, R L. 1994 *Trypanosoma cruzi* infections suppreses nuclear factors than bind to specific sites on the interleukin-2 enhancer. Eur. J. Immunol. 24 16-23.
- 154.- Souto R P. & Zingales, B. 1992. Ribosomal RNA as a target for the detection of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst. Oswaldo Cruz. 87:54-59.
- 155.- Spiro, R G. 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins Meth. Enzymol 8:3-6.
- 156.- Stafany, M.M., Takehara, H A & Muta, Y. 1983. Isotype of antibodies responsible for immunolysis in *T. cruzi* infected mice. Immunol 7 91-97.
- 157 - Storino, R A., Milej, J., Beigelman, R & Ferrans, V. J. 1992. Enfermedad de Chagas 12 años de seguimiento en área urbana. Rev. Arg Cardiol 60:205-208.
- 158.- Storino, R. & Milej, J. 1994. Enfermedad de Chagas. Ed. DOYMA Argentina, p87-102, 185-208.
- 159.- Strout, R.G. 1962. A method for concentrating hemoflagelates. J. Parasitol 48:100-104.
- 160.- Sturm, N.R., Degrave, C. & Simpson, L. 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *T. cruzi* cells and amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences. Use in diagnosis of Chagas disease. Mol Biochem. Parasitol 33 205-214
- 161.- Szarfman, A., Terranova, V.P., Rennard, S.I, Fordart, J M; Lima, M.F; Scheinman, J I. & Martin, G.R. 1982. Antibodies to laminin in Chagas disease. J. of Exp. Med. 155: 1161-1171
- 162.- Sztejn, M., Cuna,W. & Kierszenbaum, F.1990. *T. cruzi* inhibits the expression of CD2, CD4, CD8 and IL2R by mytogen-activated helper and citotoxic human lymphocytes J. of Immunol 116:355-362.

- 163.- Tachibana, H., Kawabata, M., Mimori, T., Hashiguchi, Y., Nagakura, K & Kaneda, Y 1991 The validity of serodiagnosis using a monoclonal antibody against *T. cruzi* specific Mr 25000 antigen for Chagasic patients without cardiomyopathy. *Ann. of Tropical Med. and Parasitol* 85:275-276
- 164.- Tafuri, W.L. 1992. Patogenese. VIII Reunao Anual de Pesquisa Aplicada em doenca de Chagas *Rev. Soc. Bras. Med Trop.* 25 3:19-21.
- 165 - Tarleton, R L 1988. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-12 production. I Evidence for the presence of IL-12 producing cells. *J. Immunol.* 140 2763-2767
- 166 - Tarleton, R. L. & De Andrade, C.R. 1988. Interleukin 2 production in patients with Chagas disease: Correlation with antiparasite antibody response *Immunol Lett.* 17:229-234.
- 167.- Tarleton, R L , Sun, J., Zhang, L. & Postan, M. 1994 Depletion of T cell subpopulation result in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas's disease *Infect Immun* 62 1820-1823.
- 168.- Towbin H, Stachelin, T. & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications *Proc. Nat Acad Sci* 75 4350-4354.
- 169.- Travassos, L R & Almeida, I.C 1993. Carbohydrate immunity in American Tripanosomiasis *Springer Semin. In Immunopathol* 15 183-204
- 170.- Umezawa, E.S , Shikanai-Yasuda, M.A. & Stolf A M S 1996 Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas disease *J Clin Lab Analysis.* 10:407-413
- 171.- Velasco-Castrejón, O., Guzman-Bracho, C., Cruz-Rodriguez, J La enfermedad de Chagas. Publicación técnica del INDRE No. 8 Dirección General de Epidemiología Secretaría de Salud México.
- 172 - Vermelho, A.B., & Mireles, L.M.N 1994 Sialoglycoconjugates in *Trypanosoma cruzi*- Host cell interaction: possible biological mode- a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 89 69-79
- 173.- Vianna, C. 1991. Contribusao para o estudo da anatomia patológica da a molestia de Carlos Chagas *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 3:276-280
- 174.- Voller, A. 1975 Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas disease. *Lancet* 1 426-428.
- 175 - Wendel, S., Brener, Z, Camargo, M.E. & Rassi, A 1992. Chagas disease: its impact on transfusion and clinical medicine I.S.B T Sao Paulo Brasil. Cap 4 pag 58-62.

176.- W.H.O. 1991. Control of Chagas Disease. Technical reports series 811.

177.- Wood, J.N., Hudson, L., Jessell, T.M. & Yamamoto, M. 1982 A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulation of mammalian neurones and *T. cruzi* parasites. Nature 296:34-38.

178.- Woodward, M.P., Young, W.W. & Bloodgood, R.A. 1985. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. J. of Immunol. Methods 78 143-153

179.- Xu, B. & Powell, M.R. 1991. Carbohydrate epitopes are responsible for antibody cross-reactivity in *T. cruzi* infected mice. Y Parasitol. 77:808-810.

180 - Yoshida, N., Montara, R.A., Araguth, M.F., Gonzales, J.C & Russo, M. 1989 Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35-50 kDa surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 57 1663-1667

181.- Zeledon, R. 1974. Epidemiology modes of transmission and reservoir host Chagas disease in *Trypanosoma* and *Leishmania* with special reference to Chagas disease. CIBA Foundation Symp 20 Elsevier, Amsterdam.

182.- Zingales, B., Gruber, A., Ramalho, C B., Umezawa, E S & Colli, W. 1990 Use of two recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas disease Mem. Inst O. Cruz, Rio de Janeiro 85:519-522.

10 A P E N D I C E

Serodiagnosis of American Trypanosomosis by Using Nonpathogenic Trypanosomatid Antigen

VICTOR M. MONTEÓN,¹ LILIANA GUZMÁN-ROJAS,¹ CRISTINA NEGRETE-GARCÍA,²
JOSÉ LUIS ROSALES-ENCINA,³ AND PEDRO A. REYES LOPEZ^{1*}

*División Auxiliar de Diagnóstico y Tratamiento, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez,"¹
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias,² and Departamento de Patología Experimental,
Centro de Investigación y Estudios Avanzados,³ 14080 Mexico D.F., Mexico*

Received 1 May 1997/Returned for modification 5 June 1997/Accepted 14 August 1997

Crithidia luciliae, a nonpathogenic trypanosomatid, could provide a good alternative source of antigen for serodiagnosis of Chagas' disease. An enzyme-linked immunosorbent assay showed 100% sensitivity and 83% specificity when 91 human serum samples from Chagas' disease patients and 127 human serum samples from people suffering from toxoplasmosis (21 samples), leishmaniasis (32 samples), systemic rheumatic diseases (33 samples), and heart diseases (41 samples) were tested simultaneously with *Trypanosoma cruzi* and *C. luciliae* crude extracts. By Western blotting, an immunodominant band (30 kDa) was recognized by chagasic sera on the *C. luciliae* crude extract; specificity reached 97% with respect to this protein band. The carbohydrate moieties were not antigenic.

Seroimmunologic tests are paramount for the diagnosis of chronic Chagas' disease, when parasitemia is low and sporadic parasitism and tissue parasitism are almost impossible to demonstrate. Current serologic assays have limited value, and because of problems with low specificity and two different assays with a single sample, increasing the diagnostic yield has been recommended (18). The cultured form of *Trypanosoma cruzi* (epimastigote) is generally used as a source of antigen, because it is cultured easily and a fairly good amount of antigen is obtained. Although the trypomastigote or amastigote parasite phase produces antigens with better sensitivity and specificity in clinical tests, there are difficulties linked to infectiousness and low yield (5, 6). Purified or recombinant moieties have also been used for diagnostic purposes; however, either these products are not available in most clinical diagnostic laboratories, or their performance has not fulfilled expectations (10). Therefore, crude extracts of cultured epimastigotes are the current source of antigen for seroimmunologic assays in the clinical laboratory (13, 16).

Over the course of many years, a search for an alternate source of antigen has been undertaken. During the 1970s, insect trypanomatid parasites, which are not pathogenic to human beings, were assayed, and a very high sensitivity (up to 98% by indirect immunofluorescence was reported) (9, 17).

In this study, we report the use of chaoanastigote or semiamastigote (1) forms of *Crithidia luciliae*, a monoxenous trypanosomatid parasite of insects of various orders (Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, and Lepidoptera), as an alternative source for antigen in clinical studies aimed at recognizing human serum antibodies specific for *T. cruzi*.

We compared results with *T. cruzi* antigen used as a reference to results with *C. luciliae* crude antigen. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and immunoelectric transference (Western blotting [WB]) (14) were applied to sera from people with or without chronic Chagas' disease.

Parasites (either *T. cruzi* or *C. luciliae*) were cultured in a brain heart infusion medium with 10% fetal calf serum, harvested at the log phase of growth, centrifuged at $1,800 \times g$ 4°C,

extensively washed with phosphate-buffered saline (PBS), and sonicated at maximum output (100 W) under protease inhibition. After centrifugation at $12,000 \times g$ for 30 min at 4°C, the clear supernatant was collected, the protein concentration was adjusted to 1 mg/ml, and the samples were aliquoted and frozen until used (12).

For ELISA, polystyrene wells (Dynatech) were sensitized with antigen (1 µg/well) in carbonate buffer and blocked with PBS-Tween 20 (0.01%) containing bovine serum albumin (1%). Human serum diluted to 1:400 was incubated and washed; a second antibody, peroxidase-labeled antihuman immunoglobulin G (IgG), was added. Color was developed by orthophenylenediamine and H₂O₂. A micro-ELISA reader at 490 nm was used to quantify results (11).

A WB assay was performed by electrophoresis of extracts on a polyacrylamide gel (10%). Total protein (150 µg) was run and transferred to nitrocellulose paper sheets, blocked with PBS-Tween 20 (0.1%) containing 3% bovine serum albumin; human serum diluted to 1:1,000 in the same buffer was added to react. Finally, antihuman IgG (Fc specific) peroxidase conjugate reacted, and the color reaction was developed with 4-chloronaphthol and H₂O₂ (14).

We tested 39 Brazilian serum samples and 52 Mexican serum samples from patients with a definitive diagnosis of chronic Chagas' disease on epidemiologic, clinical, and serologic bases (a total of 91 positive serum samples) (7, 8). A total of 127 serum samples from subjects with a clinical diagnosis of toxoplasmosis, leishmaniasis, systemic rheumatic disease, or heart disease were included as a comparative group.

The ELISA was always positive when the chagasic sera were assayed. In contrast, only 3 of 127 serum samples from the comparative group gave a positive result when *T. cruzi* antigen was used for plate sensitization. When *Crithidia* antigen was used instead, complete concordance was observed with respect to the chagasic sera, but as many as 21 of 127 (17%) of the nonchagasic serum samples became positive. False positives were observed in patients with either cutaneous or visceral leishmaniasis. Higher ELISA values corresponded to the latter form, while cutaneous disease presented lower absorbance.

A test was considered positive when the optical density was above the median plus 5 standard deviations obtained from

* Corresponding author.

TABLE 1. Correlation between sensitivity and specificity of *T. cruzi* and *C. luciliae* extracts with serum from Chagas' disease patients and controls

Response to <i>C. luciliae</i> extract	No. of serum samples with response to <i>T. cruzi</i> extract ^a		Total no. of responses
	Positive	Negative	
Positive	91 (a)	21 (b)	112 (a + b)
Negative	0 (c)	106 (d)	
Total	91 (a + c)	127 (b + d)	218 (n)

^a Sensitivity, $(a/a + c)(100) = (91/91)(100) = 100\%$; specificity, $(d/b + d)(100) = (106/127) = 83.46\%$.

blood donor samples and the coefficient of variation was 9%. The sensitivity and specificity were 100 and 83.4%, respectively (Table 1).

On WB, the *C. luciliae* extract reacted with chagasic sera, and a 30-kDa band was dominant; 100% of the chagasic sera recognized it (Fig. 1). In the nonchagasic comparative group (WB profile not shown), a few of the serum samples from patients with visceral leishmaniasis showed a faint reaction. Specificity, with respect to the 30-kDa band, reached 96.8%.

Antibodies eluted by HCl-glycine buffer (pH 2.8) (20) were able to recognize a 30-kDa band in a second WB with either *T. cruzi* or *C. luciliae* antigens, although they recognized some other peptide bands as well. When *T. cruzi* extract was used in the second WB, bands with sizes of 30, 33, and 35 kDa were recognized. When *C. luciliae* was the protein source, two bands with sizes of 31 and 35 kDa reacted (Fig. 2 and 3). These results confirm that both extracts share epitopes recognized by IgG anti-*T. cruzi* antibodies.

To explore the role of carbohydrate compounds as antibody targets, we performed an oxidative reaction with sodium periodate, which attacks periodic structures with a repeating unit on extended linear molecules and no substituent at position 3' in the pyranoside form (2, 21). This experiment was performed according to the method of Woodward et al. (20). A sensitized patient was treated with sodium acetate (50 mM [pH 4.5]) and

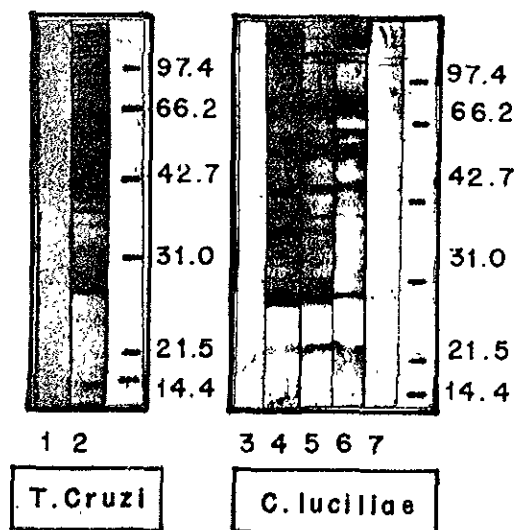


FIG. 1. Representative antigenic profile of *T. cruzi* (lanes 1 and 2) and *C. luciliae* (lanes 3 to 7) extracts reacted with chagasic sera. Lanes: 1 and 3, blanks; 2, 4, 5, 6, and 7, chagasic sera. Molecular masses are shown to the right of each panel in kilodaltons.

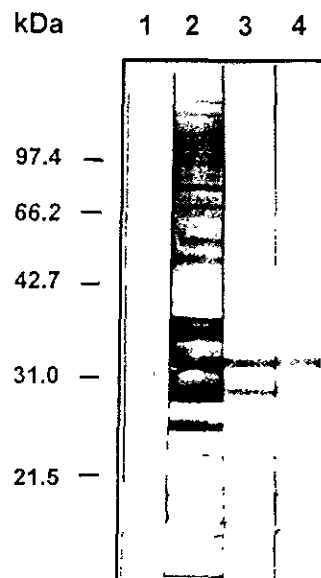


FIG. 2. WB assay of *T. cruzi* extract reacted with antibodies eluted from the 30-kDa region of *C. luciliae* with HCl-glycine (pH 2.8). Lanes: 1, blank; 2, positive; 3 and 4, eluted.

0.1, 5, and 20 mM sodium periodate in acetate buffer for 60 min at 4°C in complete darkness, and this was then reduced by 50 mM sodium borohydride in PBS for 20 min at 4°C in complete darkness. A conventional ELISA was run after treatment. Results showed a diminished reactivity, 21 and 29%, respectively, against both *T. cruzi* and *C. luciliae* antigenic extracts at a periodate concentration of 5 mM or higher. Periodate oxidation also produced a reduction of some polypeptide bands when WB was used instead of ELISA; however, the 30-kDa band was spared (Fig. 4 and 5). Enzymatic treatment of transferred total extracts, whether from *T. cruzi* or *C. luciliae*, with endoglycosidase F does not modify the antibody recognition pattern (data not shown). Therefore, there is evidence for

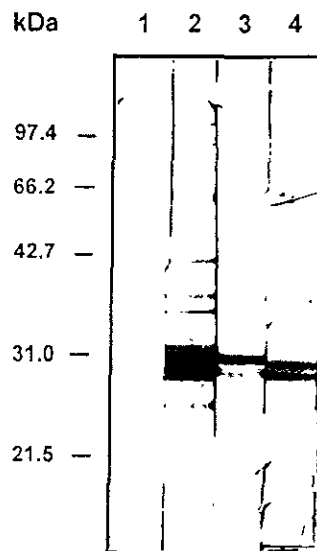


FIG. 3. WB assay of *C. luciliae* extract reacted with antibodies eluted from the 30-kDa region of *C. luciliae* by HCl-glycine (pH 2.8). Lanes: 1, blank; 2, positive; 3 and 4, eluted.

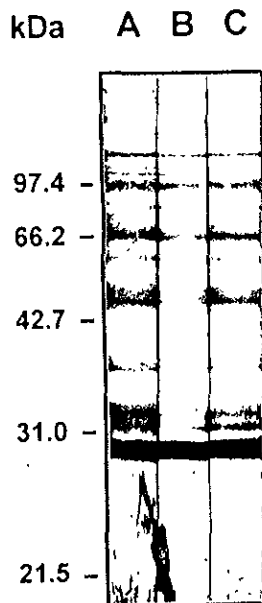


FIG. 4. WB assay of *C. luciliae* extract treated with 0.1, 5, and 20 mM periodate (lanes A, B, and C, respectively).

a major protein epitope on the dominant 30-kDa band, with a minor role for carbohydrate moieties in the reactivity disclosed by ELISA, in concordance with recent data by Umezawa et al. (19). Carbohydrate moieties are important for the antigenicity of *T. cruzi*, especially during acute infection, but not in the chronic phase.

The variability among *T. cruzi* strains isolated from reservoirs, triatomine vectors, or human patients is well known. In addition, there are clone-specific components (3) which contribute to the heterogeneity of the immune response. However, certain highly conserved epitopes have been recognized (13, 15) which are considered useful targets for improving diagnostic assays. Unfortunately, such moieties exist only in small amounts, making it difficult to use them for clinical testing (4).

Alternatively, recombinant proteins represent an interest-

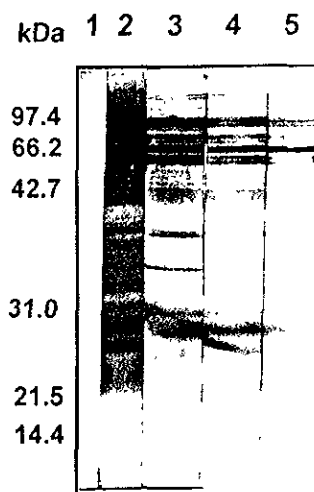


FIG. 5. WB assay of *T. cruzi* extract treated with 0.5, 5, and 20 mM periodate (lanes 3, 4, and 5, respectively). Lane 1, blank; lane 2, nontreated

ing possibility for the development of clinical diagnostic assays. Recently, 11 proteins, of both purified and recombinant moieties, were evaluated, with some of them reaching a high correlation (kappa index, ≥ 0.8) (10).

However, serodiagnosis of *T. cruzi* infections is still difficult, because no purified or recombinant proteins used as antigens in diagnostic tests are free of pitfalls and limitations, and they are expensive or not readily available in less-developed settings where the disease is an important public health issue, especially when urban Chagas' disease seems to menace blood supplies and as screening of blood donors becomes mandatory in most countries through the South American continent. In this sense, *Crithidia*-derived antigens, which are easily produced and contain significant moieties recognized by human antibodies, represent an interesting subject for studying the humoral immune response and, perhaps, an alternative diagnostic method with minimal expense and no risk.

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 212220-5-0533 PM.

We thank Marilú Hernández for secretarial assistance.

REFERENCES

- Barclay, R. B., and W. B. Cosgrove. 1980. Biology and physiology of the lower trypanosomatidae. *Microbiol. Rev.* 44:140-173.
- Beefy, J. B. (ed.). 1985. *Glycoprotein and proteoglycan techniques*, p. 279-288. Elsevier Science Publishers, New York, N.Y.
- Bongerts, V., and J. A. Dvorak. 1993. *Trypanosoma cruzi* antigenic analysis of cloned stocks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:716-722.
- Camargo, M. (ed.). 1992. Chagas disease (American trypanosomiasis) its impact on transfusion and clinical medicine, p. 165-178. ISBT Brazil, Sao Paulo, Brazil.
- De Almeida, R. W., and E. Chiari. 1987. Avaliacao de antígenos de *Trypanosoma cruzi* para a reacao de hemaglutinacao indirecta I. Diferente extractos antigénicos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 29:165-182.
- De Almeida, R. W., and E. Chiari. 1987. Avaliacao de antígenos de *Trypanosoma cruzi* para a reacao de hemaglutinacao indirecta II. Antígenos de diferentes mostras eformas avaliativas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 29:183-188.
- Gloss, G., M. R. Barrera, V. M. Monteón, and P. A. Reyes. 1990. *Trypanosomiasis americana* y cardiopatía crónica en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 60:261-266.
- Kirchhoff, L. V. 1993. Trypanosomiasis (Chagas' disease) a tropical disease now in the United States. *N. Engl. J. Med.* 329:639-644.
- Lopes, J. D., Z. Caulada, C. Barbieri, and P. Camargo. 1981. Cross reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insects trypanosomatids as a basis for the diagnosis of chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30:1103-1188.
- Moncayo, A., and A. O. Luqueti. 1990. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85:489-495.
- Monteón, V. M., A. Ramos, and P. A. Reyes. 1993. Reactividad de sueros de pacientes chagásicos crónicos con extractos de aislamientos mexicanos de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Biol. Trop.* 41:861-865.
- Monteón, V. M., T. Sosa, and P. A. Reyes. 1989. Serodiagnostical test for American trypanosomiasis. A comparative study. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 31:35-38.
- Nagasse-Sugahara, T. K., S. Hoshino-Shimizu, R. Paglia Rini, and B. Celeste. 1996. Improvement of the slide hemagglutination test for rapid Chagas' disease screening in epidemiological surveys. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:623-628.
- Ramos, A., V. M. Monteón, and P. A. Reyes. 1993. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre. *Salud Publica Mex.* 35:56-64.
- Rangel-Aldao, R., G. Gomach, O. Allende, E. Camaya, and V. Delgado. 1989. *Trypanosoma cruzi*: polypeptide markers of epimastigotes and trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20:25-32.
- Reiche, E. M., M. M. Inouye, R. Pontello, H. Morimoto, S. Itow, T. Matsuo, and J. Jankevicius. 1996. Seropositivity for anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies among blood donors of the "Hospital Universitario regional do Norte do Parana" Londrina Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 38:233-240.
- Santos, R., V. Amato-Neto, and Y. Gioia. 1975. Positividade de reacoes de fixacao do complemento, hemaglutinacao e imunofluorescencia indirecta, efectuada com antigena de *Leotomonas pessoai* e soros de pacientes com doenca de chagas. *Rev. Goiana Med.* 21:23-27.
- Solana, M., A. M. Katzin, E. S. Umezawa, and C. Sosa-Miatello. 1995. High specificity of *Trypanosoma cruzi* epimastigote ribonucleoprotein as

- antigen in serodiagnosis of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1456-1460.
19. Umezawa, E., M. A. Shikanai-Ysuda, and A. M. Stoff. 1996. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic chagas disease. *J. Clin. Lab. Anal.* **10**:407-413.
20. Woodward, M. P., W. Young, and R. A. Bloodgood. 1985. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitop₂ using periodate oxidation. *J. Immunol. Methods* **78**:143-153.
21. Xu, B., and M. R. Powell. 1991. Carbohydrate epitopes are responsible for antibody cross-reactivity in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *J. Parasitol.* **77**:800-810.