55
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA *Trypanosoma cruzi* EN VARIOS GRUPOS CLINICOS DE ENFERMEDAD DE CHAGAS.

T E S I S

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

RAMIRO RAMIREZ HERNANDEZ

U N A M
FES
ZARAGOZA

LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F. SEPTIEMBRE DE 1998.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA *Trypanosoma cruzi* EN VARIOS GRUPOS CLÍNICOS DE ENFERMEDAD DE CHAGAS.

T E S I S

PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

POR

RAMIRO RAMÍREZ HERNÁNDEZ

MÉXICO, D F

SEPTIEMBRE DE 1998

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de todo corazón a
mi familia, padres, esposa, hijos y hermanos,
por tanto amor entregado para lograr esto

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento a mis amigos, por el
apoyo, la motivación y los momentos
compartidos

A mis asesores y a los miembros del jurado,
Por su excelente dirección.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, CON APOYO DEL INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS DE LA SECRETARÍA DE SALUD,

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR RUBEN MARROQUIN SEGURA
DR OSCAR VELASCO CASTREJÓN

Y LA COLABORACIÓN DE:

M. EN C. CARMEN GUZMAN BRACHO.

JURADO

PRESIDENTE :	DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA
VOCAL .	DR OSCAR VELASCO CASTREJÓN
SECRETARIO .	Q.F B. JUAN FCO. SÁNCHEZ RUIZ
SUPLENTE ·	M. EN C CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ
SUPLENTE :	Q F.B YOLANDA FLORES CABRERA

CONTENIDO **paginas**

INTRODUCCIÓN

El curso de la infección con ***Trypanosoma cruzi***, el parásito intracelular que causa la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas), es marcado por severas alteraciones de la respuesta inmune del hospedero, tanto en humanos como en modelos de animales de laboratorio. Así tenemos que en la producción de anticuerpos, la respuesta inmune celular específica y no específica, son suprimidas durantre la fase aguda de la infección[1-4], se observa una tendencia hacia la normalización inmunológica durante el período crónico[13,19] Sin embargo, el diagnóstico en esta fase de la enfermedad, no es fácil de realizarlo, pues la presencia del parásito es muy difícil de ser detectado y la serología determinando IgG en técnicas de HAI e IFI pudieran tener una sensibilidad baja, debido a las alteraciones observadas en la producción de clases y subclases de inmunoglobulinas, durante la infección experimental de ***Trypanosoma cruzi***[20]. Ante la dificultad de aislar el parásito en la infección chagásica crónica, la detección de anticuerpos circulantes es, con frecuencia, el único parámetro que permite realizar el diagnóstico. Por ello y la creciente preocupación acerca de la validez de los resultados, se realizó este trabajo en donde se implementó un método de ELISA usando antígenos solubles de epimastigote de ***Trypanosoma cruzi*** formalinizados para evaluar los niveles de IgM, IgG e IgA, comparándola con las pruebas estándares para la enfermedad de Chagas HAI e IFI, en sueros de individuos chagásicos y no chagásicos El principal propósito de este trabajo es aumentar el número de técnicas serodiagnósticas para seleccionar las que mejor ventajas proporcionen en cuanto a sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, rapidez, facilidad y costo Y con todo esto poder introducir al laboratorio como una prueba de rutina una técnica para detectar individuos infectados, por sobre. todo en donadores sanguíneos que son los responsables de por lo menos el 20% de casos de tripanosomiasis americana Otro objetivo de este trabajo es demostrar que los pacientes cardiópatas han respondido al tratamiento, disminuyendo considerablemente los niveles de anticuerpos en circulación Para desarrollar nuestro trabajo en la técnica de ELISA decidimos determinar anticuerpos de tipo IgG, IgM e IgA, usando antígeno de ***Trypanosoma cruzi*** obtenido de epimastigotes, el cual fue formalinizado al 0.1% y adherido a las placas de poliestireno, previamente irradiadas con UV Para la metodología de HAI se siguió la técnica de Hoshino-Shimizu[24] La técnica de IFI se realizó según el método de Camargo[22] El criterio para establecer los cortes de ELISA en cada grupo se realizó de acuerdo a la eliminación de negativos y positivos que se salieran del rango, propuesto por Organon Teknika[35] Los sueros fueron seleccionados al azar, del banco de sueros de chagásicos del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) de la Secretaría de Salud (SSA) Se compararon los resultados de ELISA modificado con HAI e IFI en pares de grupos clínicos.

RESUMEN

Con el objeto de seleccionar las técnicas más adecuadas, consideramos estudiar estados de epimastigote de ***Trypanosoma cruzi*** como fuente de antígeno para desarrollar pruebas serológicas (ELISA modificado) usadas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Se compararon las pruebas de HAI, IFI y la prueba de ELISA modificada (irradiando las placas, para aumentar su sensibilidad y formalinizando el antígeno para estabilizarlo), determinando IgM, IgG e IgA. Se usaron sueros de tres grupos de pacientes chagásicos. Grupo CCh, clínicamente chagásico, sin tratamiento y sin diagnóstico. Grupo Cht, ya diagnosticado clínicamente y con tratamiento específico y un grupo H: clínicamente sanos, asintomáticos, proveninetes de zonas hiperendémicas de enfermedad de Chagas, todo esto para evaluar la respuesta y el progreso del tratamiento de los pacientes. Para la técnica de HAI se realizó la metodología según Hoshino-Shimizu[24] y para IFI se siguió el método según Camargo[22] Los resultados nos indican que la sensibilidad mayor se encuentra en el isotipo IgM específico, en todos los grupos, determinado por ELISA. Se encontró, aún en el grupo Cht, un porcentaje de positividad para IgM, del 59% comparado, con un 41% y 47% para HAI e IFI respectivamente.

La concordancia entre pares de pruebas, cambia dependiendo del grupo de estudio. Así tenemos que para el grupo CCh en el par IgM-IgG e IgM-IFI es del 83%. Mientras que para el grupo Cht cae la concordancia a 35.5% para IgM-HAI y 41% para IgM-IFI. También podemos observar que para el par IgM-IgG en el grupo CCh la concordancia es del 83%, mientras que para el grupo ChT es del 64.7%. Por otro lado se realizó análisis de varianza, con un sólo criterio de clasificación por rangos, de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de 0 05 y se observó que sólo existe diferencia significastiva en HAI y en ELISA para IgM e IgG Con la prueba de Mann-Whitney se determinó en que pares de grupos clínicos y pares de métodos existe significancia. Se propone la implementación de la técnica de ELISA modificada para la determinación de IgM e IgG como una técnica más en el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas Los resultados demuestran que los niveles de anticuerpos han disminuido en cardiópatas por lo que, los pacientes han respondido al tratamiento

MARCO TEÓRICO

a) GENERALIDADES

El protozoario flagelado ***Trypanosoma cruzi*** es el agente causante de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana en humanos, enfermedad que continua siendo un problema de salud en muchas áreas de Latinoamerica Se estima que aproximadamente 35 millones de personas que viven en áreas rurales de centro y sudamerica se encuentran en riesgo de infección y entre 12 y 14 millones tienen la enfermedad de Chagas, es un tripanosoma que se encuentra en el estiércol a diferencia del tripanosoma africano que se encuentra en la saliva de las chinches. Es transmitido por las heces de los vectores a los huéspedes mamíferos en forma metacíclica [1,2]

Los vectores de ***Trypanosoma cruzi*** son las chinches hematófagas de la subfamilia de los triatóminos. Siguiendo la alimentación del vector, tenemos que los tripanosomas metacíclicos entran al mamífero a través de la herida provocada por la picadura del insecto o por las membranas mucosas cercanas. La infección puede ocurrir también congénitamente y la transmisión durante la transfusión sanguínea es todavía un problema mayor. Una vez dentro del cuerpo los metacíclicos no se dividen extracelularmente, se unen a la superficie de los macrófagos y se introducen por medio del proceso de la fagocitosis o entran en tejido celular cercano y probablemente en una forma activa escapen desde el compartimiento lisosomal dentro del citoplasma y se transforme dentro del contorno en amastigotes redondos. Fuera de los fagolisosomas probablemente lo envuelve una molécula ácido-activa o hemolisina, inmunológicamente relacionada al componente C9 del complemento que tiene una actividad formadora de poros. La actividad intracelular ocurre varias veces por fisión binaria, la ruptura de células infectadas y los parásitos están relacionados como derivados de tripomastigotes y tejidos los cuales son capaces de infectar a las células circundantes o diseminarse a otros tejidos por vía sanguínea Característicamente músculo y tejido nervioso de todos los tipos son altamente parasitados. El ciclo de vida es completado cuando los tripomastigotes son tomados durante la alimentación del triatoma, estos se transforman dentro del intestino del insecto en epimastigotes. Los factores que controlan la diferenciación de formas metacíclicas dentro del intestino del insecto aún no son claros pero el proceso es posiblemente mediado por un enlace lectin de la pared intestinal del insecto a los receptores de superficie de los parásitos. Finalmente los metacíclicos migran hacia la parte posterior de donde son excretados por las heces.

Las diversas cepas de ***Trypanosoma cruzi*** han sido descritas y son generalmente similares con respecto a antigenisidad pero presentan diferencias, particularmente en la susceptibilidad a la respuesta inmune del huésped. Con el advenimiento de la tecnología DNA recombinante ahora es posible comparar las diferencias usando pruebas de clonación génetica. Esta metodología ya ha revelado que hay limitaciones en el extenso polimorfismo entre cepas de ***Trypanosoma cruzi*** y el descubrimiento tecnológico presentado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha

VARIOS O EL GÉNERO

19 DE NOVIEMBRE

[illegible]

permitido la identificación de la prueba específica para el DNA del cinetoplasto, la cual puede diferenciar la principal población clonal de ***Trypanosoma cruzi***.

La estructura fina del parásito ha sido revisado en detalle por Brener[7] ; una importante observación es que ***Trypanosoma cruzi*** no posee cubierto el variante glicoproteico de superficie claramente definido (VSG), característica de formas sanguíneas de tripanosomas africanos y así no puede exponer una forma identica de variación antigénica A diferencia de los tripanosomas africanos puede evadir la respuesta inmune del huésped ocultándose dentro de la célula y dividiéndose allí ilimitadamente. Sin embargo un manejo alternativo es posible controlando la expresión de este antígeno de superficie hasta presentar un cambio constante de imagen al sistema inmune del huésped.

El ciclo de vida completo de ***Trypanosoma cruzi*** puede ser reproducido ***in vitro*** y este tiene absolutamente gran facilidad para el estudio de varios aspectos de la biología del parásito Los epimastigotes crecen rápidamente en medios semidefinidos conteniendo hemina. Como los cultivos de epimastigotes alcanzan su crecimiento en la fase estacionaria, tripomastigotes metacíclicos comienzan a aparecer y estos pueden ser separados de los epimastigotes por métodos de centrifugación. El uso de medios enrriquecidos incrementan el rango de metaciclogenesis Formas sanguíneas de tripomastigotes son cultivados infectando cultivos de células monocapa tales como células vero , permitiendo la multiplicidad de amastigotes intracelulares, finalmente se liberan un gran número de tripomastigotes aproximadamente una semana después de la infección Durante largos períodos el laboratorio mantiene esto rutinariamente necesario hasta pasar periódicamente las formas sanguíneas cultivadas a ratones para asegurar que ellos retengan efectivamente el parásito.

b) ENFERMEDAD DE CHAGAS

Siguiendo la infección inicial, la fase aguda de la enfermedad de Chagas, esta caracterizada por parasitemia elevada y extenso parasitismo en tejido local Normalmente la enfermedad aguda es asintomática en adultos pero no siempre es el caso en los niños, donde se presentan síntomas tales como: fiebre, vómito, aumento de tejido linfoide y miocarditis. Hinchazón y lesión de la piel o "Chagoma" son frecuentemente observados en el sitio de entrada del parásito La parasitemía elevada, baja su nivel después de 1-2 meses coinsidiendo con un fuerte desarrollo en la respuesta inmune y los pacientes entran a una fase latente o indeterminada. Esta fase es característica por bajo nivel de parasitemia y es escencialmente asintomática. Durante el período latente la pérdida de inmunidad guiará a la proliferación del parásito Aproximadamente el 40% de los pacientes ***Trypanosoma cruzi*** infectados pertenecen al grupo latente o indeterminado Algunos de estos pacientes muestran síntomas clínicos menores de la enfermedad de Chagas, inflamación focal y fibrosis en el corazón

Desafortunadamente, algunos pacientes progresan más allá del estado crónico indeterminado y después de una prolongada infección asintomática, desarrollan fibrosis miocardica y son

clasificados como cardiacos basados en electrocardiogramas, datos de rayos X y de tórax. Este extremo opuesto del aspecto clínico de la enfermedad de Chagas ocurre en relativa ausencia de parásitos rutinariamente demostrable en sangre o tejido.

Los mecanismos patogénicos responsables de la transición de estado indeterminado a cardiaco *no son claros. Inducción directa por pocos parásitos y fenómenos de autoinmunidad han sido* propuestos[10]. Hay sugerencias de que la activación policlonal del sistema inmune durante la infección aguda puede liberar anticlones propios que persistirán por largos períodos en el huésped. Existen multiples ejemplos de la presencia de antígenos que son compartidos o que hacen reacción cruzada entre ***Trypanosoma cruzi*** y tejido nervioso y cardiaco del huésped[1,4]

La fase aguda y latente de la enfermedad de Chagas parece ser relativamente asintomática, síntomas clínicos más serios de la infección con ***Trypanosoma cruzi*** solo ocurren más tarde en la progresión de la enfermedad. Sin embargo la fase aguda e indeterminada no son funcionalmente benignas, ocurre desde daño muscular o neuronal durante el período de mejoría gradual de los síntomas caracteristicos de la enfermedad crónica, posiblemente como un resultado directo del desarrollo lento de la autoinmunidad

El corazón y el tracto digestivo son los órganos específicamente afectados por la enfermedad crónica de Chagas. En la enfermedad cardiaca, la más común en Brasil, se ha encontrado crecimiento del corazón, electrocardiogramas anormales, dilatación, aneurismo ventricular apical izquierdo y el síndrome completo es conocido como megacardia La forma digestiva de la enfermedad implica aperistalsis y crecimiento de regiones del canal alimenticio, donde se observa la característica de megaesófago y megacolon. Ambas formas cardiacas y digestivas de la enfermedad parecen tener una causa común asociada con la destrucción específica del abastecimiento de los nervios autonomos a los órganos afectados.

Frecuentemente las células ganglionares son destruidas, por infección con los parásitos o por la acción de autoanticuerpos. El papel de autoanticuerpos en la patogenesis de enfermedad de Chagas permanece controversial[3,4]. Características presentadas en enfermedad de Chagas, tales como reducción del control del latido cardiaco y aperistalsis dan como resultado una reducción en la eficiencia del tono muscular, causado por la pérdida de neuronas. En suma a esto hay parasitación directa de las células cardiacas a otras células musculares y la pérdida de la masa muscular puede contribuir *a la pérdida del control y al crecimiento masivo de estos tejidos.* Repentinamente e inesperadamente la muerte ocurre en un 60 a 70 % de pacientes con enfermedad de Chagas y esto es un resultado directo de la falla del corazón debido a la denervación y bloqueo muscular.

La producción de anticuerpos específicos e incremento de reacciones de hipersensibilidad son evidencia de que la inmunidad se desarrolla rápidamente, cuando los mamíferos son infectados con ***Trypanosoma cruzi***. Esta inmunidad es necesaria para continuar la resistencia a la proliferación del parásito ya que, animales inmunosuprimidos por varios métodos, tales como tratamiento con drogas, irradiación y disminución de las células T muestran marcadamente incremento en la susceptibilidad a la infección por ***Trypanosoma cruzi***. Numerosos estudios han

mostrado que la infección con ***Trypanosoma cruzi*** estimula inmunosupresión inespecífica contra antígenos sin relación, y en esta vía la enfermedad de Chagas aguda es similar a muchas otras infecciones parasitarias. En la enfermedad de Chagas la inmunosupresión puede ser un mecanismo usado por el parásito para establecer una infección inicial y una variedad de mecanismos han sido propuestos para la inducción de la inmunosupresión por ***Trypanosoma cruzi***. Esta supresión también puede estar asociada con la autoinmunidad que caracteriza a la fase crónica de la enfermedad, desde probable supresión de células T y células T cooperadoras hasta estar involucrados en ambos procesos La interacción entre supresión y autoinmunidad es compleja y el posible papel de la respuesta del huésped en estos fenómenos son difíciles de discutir. Sin embargo existe la posibilidad de que la autoinmunidad podría simplemente ser el resultado de ***Trypanosoma cruzi*** y la elección de los tejidos del huésped, teniendo un alcance similar y reacción cruzada con antígenos de superficie y la apariencia de inmunosupresión inducida termina afectando el control de la respuesta autoinmune en esta reacción cruzada con antígenos, podría así abrirse la puerta de un solo golpe en síndrome crónico de Chagas

La reacción física más íntima huésped-parásito en enfermedad de Chagas ocurre por contacto directo del parásito con células del huésped, este contacto lleva a una interiorización más tarde, que es esencial para la supervivencia del parásito Diversos factores del parásito han sido propuestos por estar involucrados en este contacto y un número de antígenos de superficie han sido identificados, lo cual puede tener un papel en el ataque y penetración del parásito.

Diferentes grupos han reportado la identificación de moléculas de superficie, muchas con pesos moleculares de aproximadamente 85 KD, Anticuerpos los cuales provienen de la interiorización del parásito Muchos de estos antígenos pueden ser sólo clasificados como "Penetradores-asociados". Aunque los receptores de superficie enlazan fibronectina y colágeno pueden estar involucrados más específicamente en enlace y reconocimiento celular

Se sugiere que las estructuras tales como filopodia flagelar son utilizadas durante el ataque y a través de proteínas de superficie del flagelo-específico, las proteínas son capaces de actuar como células receptoras que aún no han sido identificadas, la penetración celular, claramente toma lugar en una forma polarizada. Siguiendo el contacto de los receptores mediados por las células huésped con ***Trypanosoma cruzi***, es posible que las enzimas tales como proteasas y glicosidasas pueden jugar un papel importante facilitando la entrada del parásito. En algunas etapas específicas del ciclo de vida, muchas proteasas han sido identificadas con una variedad de sustratos y es evidente que una familia mayor de antígeno de superficie de tripomastigote contiene regiones de homología sialidasa bacteriana, sin embargo no hay evidencias que sugieran que la proteína de las membranas celulares del huésped son dirigidas durante la penetración del parásito y puede ser que estas enzimas de superficie usen sus sitios activos durante enlaces específicos a la superficie celular del huésped Una vez en el interior de la célula hospedera los parásitos ***Trypanosoma cruzi*** salen de las estructuras membranosas dentro del citoplasma, así escapan de la potencia destructiva de las enzimas lisosomales Dentro del citoplasma ***Trypanosoma cruzi*** se transforma rápidamente en forma amastigote y comienza la división El mecanismo por el cual el parásito adquiere este hábito

intracitoplasmático es cuidando en envolver una supuesta hemolisina posiblemente relacionada con el componente C9 del complemento

Muchos tejidos y células han sido reportados por ser sucesivamente parasitadas por ***Trypanosoma cruzi*** Para algunas cepas hay una preferencia por células nerviosas o musculares, en cuanto a otras preferencialmente infectan células del sistema reticulendotelial Estas diferencias son producidas ***in vitro***, pero no es claro si este tipo de células poseen grandes números de receptores parásito-específicos o provee altas concentraciones de enlaces específicos para enlazar a el parásito. El desorden el cual ***Trypanosoma cruzi*** demuestra en una gran variedad de tipos de células del huésped ***in vitro*** podrían reflejar la expresión simultánea de múltiples miembros de una familia multigen de proteínas celulares relacionadas fielmente.

c) INMUNIDAD ADQUIRIDA

Una gran variedad de animales, incluyendo un ciento de especies de mamíferos diferentes, son conocidos por ser capaces de ser infectados por ***Trypanosoma cruzi*** Anfibios y aves sin embargo son resistentes a la infección y la resistencia a la infección de aves correlaciona directamente con efectos líticos de sueros normales a el parásito. La lisis de tripomastigotes en sueros de pollos normales es causado por la acción directa del componente C3 del complemento sobre tripomastigotes. La vía clásica no esta involucrada y tampoco es un anticuerpo, ya que la inmunosupresión de pollos por varias maneras, no influencia en su resistencia a la infección. Las formas epimastigote del parásito, la cual es la replica encontrada en el intestino del triatómino y la forma más fácil de crecimiento en cultivos, es capaz de activar el suero normal del mamífero para obtener lisis La forma tripomastigote no es lisada sin embargo en ausencia del anticuerpo. Esta sensibilidad diferencial ha sido usada para separar selectivamente ***in vitro*** crecimiento de tripomastigotes y epimastigotes de cada uno. La sensibilidad de epimastigotes ha sido demostrada por ser causa de activación de C3 después de enlazarse a una glicoproteína de superficie celular de 72 KD. Aunque esta misma glicoproteína es expresada por tripomastigotes metacíclicos, la lisis no es obtenida; esta resistencia a la lisis ha sido relacionada con la presencia de una glicoproteína de 90 KD, con un factor de disminución de la aceleración (DAF) con actividad en la superficie del parásito. La proteína es enlazada en la membrana del parásito por enlace glicosil-fosfatidil-inositol[1,5]. Esta actividad es vaciada dentro del medio sobre el cultivo ***in vitro*** e inhibe la formación de C3 convertasa, actividad formada por la interacción del factor B y C3b, puede ser que la actividad DAF del parásito no interfiera con la generación o disminución de la aceleración de C3 convertasa en sueros de aves[8].

En un estudio de pacientes chagásicos, Kretti y colaboradores han establecido que la resistencia inmunológica esta asociada con anticuerpos anti-***Trypanosoma cruzi*** que lisan a el parásito por conjunción con el complemento Aunque en la inmunidad los anticuerpos mediados por complemento son requeridos para destruir, la lisis de los tripomastigotes comienza principalmente por la vía alternativa del complemento. Se ha demostrado que aunque sueros de

pacientes con enfermedad crónica de Chagas reconoce a muchos antígenos de ***Trypanosoma cruzi***, anticuerpos correlacionados a una proteína de 160 KD con la capacidad del suero para apoyar la lisis mediada por complemento de tripomastigotes Estos estudios apoyan la observación de la lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos fue antígeno específica e identificaron una proteína de superficie del parásito como un blanco para estos anticuerpos[1-5]

d) INMUNIDAD ASOCIADA A LA INFECCIÓN

La infección con ***Trypanosoma cruzi*** produce un aumento en la respuesta inmune tanto en humanos como en animales, esta respuesta inmune es humoral y celular y es evidente en anticuerpos específicos y reacciones de hipersensibilidad La importancia de los mecanismos de inmunidad en el establecimiento y mantenimiento de la relación huésped-parásito es clara a partir de estudios en los cuales han demostrado la inmunosupresión por drogas, disminución de células T e irradiación han conducido a incrementar las parasitemias y la mortalidad La presencia de la respuesta inmune no garantiza a agresiones posteriores, entonces los ratones infectados con una segunda cepa, aunque adquieren aparente resistencia a las agresiones por la prevención de evidente parasitemia aguda, no obtienen un bloqueo absoluto a la infección y ambas cepas pueden ser aisladas de la sangre del ratón. Además, ratones infectados crónicamente los cuales han sido curados con Nifurtimox pueden aún ser reinfectados con ***Trypanosoma cruzi***. Por lo tanto aunque hay una clara evidencia de una respuesta inmune al parásito, no hay evidencia que la respuesta pueda conducir a una cura; más bien esto mantiene un equilibrio huésped-parásito el cual se mantiene durante el período de vida del paciente

e) BASES GENÉTICAS DE INMUNIDAD

Todos los animales de laboratorio pueden ser infectados con ***Trypanosoma cruzi*** y el curso de la enfermedad es similar al encontrado en humanos, proporcionando una dosis adecuada establecida, en una fase aguda donde las parasitemias son rápidamente detectadas, seguidas por una fase crónica donde las parasitemias no son encotradas, su relativa susceptibilidad varia no sólo entre los animales sino también dentro de las especies por ejemplo, cepas puras de ratones varian en su susceptibilidad La susceptibilidad parece ser compleja e involucra a más de un locus genético, aunque estos no han sido identificados Estudios han sugerido que una disminución o aumento inicial de la respuesta del anticuerpo durante la fase aguda temprana de la infección es indicativa de susceptibilidad; sin embargo estas observaciones no son universalmente reales[31].

f) INMUNIDAD HUMORAL

Pruebas de rutina, por ejemplo, inmunofluorescencia, hemaglutinación y fijación de complemento, detectan fácilmente anticuerpos contra ***Trypanosoma cruzi*** en infecciones

humanas y animales. Después de la infección se desarrollan rápidamente anticuerpos específicos, inicialmente durante la fase aguda como IgM y después como IgG e IgA.

Tripomastigotes abtenidos de sueros de animales infectados son cubiertos con inmunoglobulinas y muchas observaciones sugieren que las inmunoglobulinas podrian tener un papel funcional en la resistencia a la infección La importancia de los anticuerpos ha sido confirmada con experimentos de transferencia celular en bazo; la resistencia puede ser transferida por células, pero los niveles de resistencia son reducidos por disminución de células B antes trasferidas. No todas las clases de anticuerpos son efectivos en transferencia de inmunidad. IgM se produce en una etapa temprana de la infección y no es efectiva en la transferencia de inmunidad; y más tarde durante la infección los isotipos predominantes producidos IgG2a e IgG2b, son efectivos mientras que IgG1 no lo es[1,6]. Significativamente, sueros de humanos crónicos contienen niveles incrementados de IgG1 e IgG3, que son los equivalentes de las clases de anticuerpos IgG2 de los ratones, esto es, ellos funcionan en anticuerpos dependientes de células de citotoxicidad (ADCC) y activación de complemento Esto sugiere que datos derivados de estudios en ratones son relevantes en infecciones humanas.

Los anticuerpos del parásito causaran aglutinación y encapsulación. Estudios de inmunofluorescencia han demostrado que antígenos de superficie son encapsulados dentro del terreno polar en la presencia de anticuerpos La capacidad para encapsular antígenos de superficie, reconocidos por anticuerpos líticos pueden tener un papel importante en la resistencia a la inmunidad también, estudios de isotipos en infecciones humanas han indicado que en la respuesta antiparásito primeramente aparecen isotipos IgG1, IgG2 con algo de IgG3 [6].

El complemento lisara tripomastigotes sanguíneos ***in vitro*** en la presencia de sueros de animales infectados, pero la cepa CL no conforma con estas observaciones. La lisis es el resultado de la activación de las vías alternativa y clásica Observaciones ***in vitro*** que reproducen condiciones ***in vivo*** sugieren por descubrimientos, que ratones inoculados con veneno de cobra producen disminución en la resistencia a la infección. Sin embargo observaciones contradictorias fueron hechas con ratones genéticamente deficientes en C5 (incapaz de aumentar lisis mediada por complemento), y en puercos de Guinea generalmente deficientes en C4 (deficiente en la activación de la vía clásica C124), los cuales presentan disminución en la susceptibilidad a la infección. Evidencia adicional de la ausencia de la función del complemento fue obtenida cuando tripomastigotes fueron implantados dentro de ratones inmunes; los tripomastigotes no fueron afectados, aunque los sueros de los animales protejierán en transferencias pasivas. El papel del complemento es más complicado por la observación de que tripomastigotes expresan una molécula en su superficie celular la cual tiene actividad DAF La actividad DAF-like, que es asociada con una molécula de aproximadamente 90 KD, inhibe la formación de C3 convertasa y lisis mediada por complemento.

Estudios moleculares que conducen a la separación y purificación de membranas glicoproteicas de tripomastigotes de 87-93 KD y 160 KD, los cuales aceleran la caída de C3 convertasa

detenendo la activación de la cascada del complemento. La acción de estas glicoproteínas contribuyen en la evasión de lisis mediada por complemento [1,6].

Significativamente, la lisis de tripomastigotes ***in vitro*** es llevada a cabo por sueros de animales inmunizados con parásitos lisados o antígenos de parásitos Se ha postulado que sueros infectados podrian estar bloqueando la activiad DAF-like, y la sensibilidad a la lisis ha sido asociada con otros antígenos de peso molecular de 160 KD antes mencionados y no de moléculas DAF de 90 KD Además un segundo anticomplemento activo ha sido asociado con el receptor fibronectin-colágeno del parásito, èl cual inhibe la acción de C3 convertasa de una manera claramente diferente de esa determinación de la proteína DAF El papel del complemento es además complicado por observaciones donde fragmentos de anticuerpos promueben completamente la activación en la ausencia de una porción FC de la inmunoglobulina Por lo tanto el papel preciso del complemento en la infección con ***Trypanosoma cruzi*** no es clara, entonces el parásito es capaz de activar la vía del complemento en ausencia de anticuerpos FC y de inhibir activación de complemento.

Sueros de individuos infectados con ***Trypanosoma cruzi*** difiere de sueros de individuos con malaria y tripanosomiasis africana que normalmente no contienen niveles altos de inmunoglobulinas Sin embargo la activación de células B policlonales han sido reportadas después de la infección de ratones con ***Trypanosoma cruzi*** Incrementos en niveles de células formadoras de placas en atígenos heterogéneos y autoantígenos han sido observados, y los isotipos de las células formadoras de placas son predominantemente IgG2a, IgG2b e IgG1 Estos efectos parecen estar relacionados por regulación de células T cooperadoras dependientes y un efecto mitogénico del mismo parásito y son persistentes aun estando presentes 6 meses después de la infección, cuando la distribución del isotipo de las células formadoras de placas no ha cambiado Mutuamente la población cambiante de células de bazo en ratones sobre la infección y particularmente el incremento en células B, ha sido demostrado en modelos de respuesta anticuerpo Estos incrementos en los niveles celulares fueron reclamados para reflejar el alto y sustancioso nivel de anticuerpos presentes en ratones y no en activación exaustiva de células B policlonales

g) INMUNIDAD CELULAR

Estudios ***in vitro*** han demostrado que los anticuerpos pueden estar involucrados en la inmunidad celular Varios tipos de células han demostrado ser efectivos contra anticuerpos cubiertos con tripomastigotes sanguíneos. Cuando recubrimos con anticuerpos de ratón, los tripomastigotes son lisados o inactivados por linfocitos, eosinófilos, neutrófilos, granulocitos, células mononucleares y plaquetas Eosinófilos y neutrófilos humanos son además efectivos en estas pruebas ***in vitro*** y estas células pueden lisar las formas amastigote del parásito dentro de las células del mamífero Los mecanismos para destruir el parásito por estas células parece ser por fagocitosis y por el efecto directo del peróxido de hidrógeno a el parásito, un efecto que puede ser

protegido e inhibido ***in vitro*** por la catalasa. La unión de la proteína básica del eosinófilo a la superficie del parásito después de la fagocitosis también puede ser participe en la destrucción del parásito Un mecanismo lítico adicional ha sido reportado, implicando anticuerpos, complemento y plaquetas; cuando hay deficiencias de C5 en ratones, las plaquetas se adhieren a los tripomastigotes antes de lisar a el parásito. Estudios recientes han demostrado que mientras sueros inmunes aglutinan con tripomastigotes ***in vitro***, en presencia de plaquetas, los parásitos son destruidos; en este fenómeno parecen depender las plaquetas del receptor C3b, entonces la disminución de C3 suprime los efectos líticos.

La relevancia de ADCC en la inmunidad ***in vitro*** faltan en ser determinadas, pero la resistencia a la lisis de tripomastigotes implantada en la cámara dentro del ratón infectado y la aparente opsonización de parásitos radio marcados en el hígado y bazo acompañados por supresores de estos parásitos, sugieren que ADCC puede ser un factor significativo en la inmunidad Esta es una conclusión la cual esta apoyada por el papel dominante del anticuerpo en la protección y la sensibilidad no comprometida de animales genéticamente deficientes en componentes del complemento.

h) INMUNIDAD CELULAR Y RESISTENCIA A LA INFECCIÓN

La correlación de inmunidad celular, hipersensibilidad tipo retardada (DTH), reacción en piel, inhibición de la migración de macrófagos y respuesta blastogénica son encontrados en humanos y animales infectados con ***Trypanosoma cruzi***, hay evidencia clara de la existencia de estos tipos de inmunidad Sin embargo en contraste a la consistente apariencia del anticuerpo después de la infección, la expresión de la inmunidad celular es mucho más variable. En humanos las reacciones en la piel pueden ser débiles o ausentes

Puercos de Guinea, changos y conejos han mostrado reacciones tardías a receptores normales por células linfoides. Los ratones andan bajos en infecciones agudas dando una inmediata y prolongada reacción en la piel la cual puede ser detectada 24 horas más tarde y no disminuye sino hasta 3 horas después de iniciada la reacción.

La debilidad o ausencia de inmunidad celular antiparasitaria observada en humanos y animales podrian tener un mejor significado en el desarrollo de enfermedad de Chagas. La supresión de respuesta DTH por factores esplénicos presentes durante la fase crónica de la enfermedad puede jugar un papel importante en la supresión de la patología crónica, ya que linfocitos del fenotipo apropiado para DTH positivos, son encontrados en el sitio de lesiones crónicas por que es antígeno persistente La supresión de la actividad de estas células podría prevenir o reducir la patología asociada con la enfermedad crónica ya que las células T clonadas estimuladas por ***Trypanosoma cruzi*** y tejido nervioso periférico han sido aisladas de ratones y transferidos de células T deficientes a células Lyt-2 de ratones infectados transfiriendo la respuesta DTH y formando lesiones inflamatorias.

Las células T están involucradas en la resistencia a la infección, ya que los ratones congenitamente o experimentalmente deficientes en células T son más susceptibles a la infección Estos datos no descriminan entre la acción directa de células T o un papel cooperador en la producción de anticuerpos aunque ha sido demostrado que timectomía neonatal en ratones tiene una respuesta anticuerpo retardada. Células de bazo de ratones recuperados de infección transferirán protección a individuos normales pero la disminución de células T solo afecta marginalmente la habilidad para conferir protección y las células T puras no transfieren protección. Estos datos sugieren que la inmunidad es predominantemente dependiente de células B y basado en anticuerpos En un estudio posterior utilizando ratones inmunizados con epimastigotes y enfrentados con tripomastigotes, la protección podría ser transferida con células T enriquecidas y disminución de células B, la disminución de las poblaciones de células T fue más efectiva proporcionando protección. Los datos anteriores no apoyan un papel para la inmunidad en células T, sin embargo dos estudios con células de bazo de ratones infectados y de ratones inmunizados con epimastigotes, demostrarón que la inmunidad puede ser transferida de células T. Tomando juntos estos datos son dificiles en compaginar pero puede relacionarse a diferentes cepas de parásitos o diseños experimentales; a menudo cuando las células T de transferencia han producido según se dice un aumento en la inmunidad, el diseño experimental no permite la descriminación entre funciones cooperadoras y citotóxicas directas Sin embargo tratamientos de ratones con anticuerpos anti-L3T4 han mostrado que la generación celular afectada es predominantemente dependiente de células T cooperadoras Estudios que utilizan marcadores de superficie celular han confirmado que células T cooperadoras son encontradas en el sitio de la lesión en ratones infectados y clones de células T cooperadoras también han sido recuperados de estos ratones.

Animales infectados no tienen células T citotóxicas las cuales actuán directamente sobre el tripomastigote, aunque la respuesta de células T citotóxicas policlonales han sido reportadas en ratones. Células T citotóxicas contra células infectadas están presentes pero estas células probablemente reconocen antígeno del parásito adheridos a la superficie de las células infectadas, no destruye directamente a el parásito, aunque tal destrucción de las células hospederas puede proporcionar a el parásito vulnerable, otras formas de ataque.

i) MACRÓFAGOS

El papel de los macrófagos en la inmunidad a ***Trypanosoma cruzi*** es complicado por el hecho de que estas células pueden destruir y apoyar el crecimiento intracelular del parásito. Algunas cepas de ***Trypanosoma cruzi*** son reticulotrópicas y siempre invaden preferencialmente bazo, hígado y médula espinal (macrófagos ***in vitro***). La cepa Y reticulotrópica es también tomada ***in vitro*** por macrófagos normales para una mayor extención que la cepa CL miotrópica.

Los tripomastigotes pueden entrar normales a los macrófagos por fagocitosis o por penetración activa. La fagocitosis es mediada a través de las proteínas de superficie de los

macrófagos y mientras los anticuerpos bloquean la invasión parasitaria de los fibroblastos. La infección de los macrófagos por anticuerpos potenciales, presumiblemente por interacción con receptores Fc. La interacción es además complicada por la observación de que en orden para ser efectivo el antisuero poliespecífico a ***Trypanosoma cruzi*** necesita estar contenido dentro de un anticuerpo blanco o una glicoproteína específica encontrada en la superficie de los tripomastigotes vivos, aunque es posible que para interpretar este promedio del anticuerpo en la superficie del parásito blanco es esencial para la interacción del receptor Fc.

Aunque el anticuerpo realza el parásito tomado, no es esencial para la fagocitosis Tripomastigotes preparados de ratones irradiados con ninguna evidencia de inmunoglobulinas de superficie son fácilmente tomados por macrófagos y bloqueados desde los receptores Fc por antimacrófagos IgG que no dañan la ingestion. La presencia de anticuerpos no afecta a el último destino del parásito, desde que se levanta es realzado por anticuerpos con macrófagos normales ***in vitro*** y son destruidos con la actividad del macrófago. Después de levantarlo dentro de las 24 horas el parásito escapa del fagosoma dentro del citoplasma y empieza su ciclo replicativo o el parásito es destruido dentro del fagolisosoma, probablemente por mecanismos involucrando un rompimiento oxidativo. Evidencias apoyadas en suposiciones que superóxidos y peróxidos de hidrógeno están involucrados en el proceso de destrucción, estudios en eosinófilos fue demostrado, en donde la peroxidasa de los eosinófilos fue mostrado en el enlace a el parásito a la superficie y generando peróxido de hidrógeno destruyendo tripomastigotes en el proceso Los epimastigotes son destruidos por los macrófagos no obstante por macrófagos inactivados y no sobreviven a la infección, si bien esto no se esperaba entonces este estado del parásito no es adaptable para desarrollarse intracelularmente en mamíferos.

Evidencias disponibles sugieren que la actividad de los macrófagos juegan un papel importante en la inmunidad a ***Trypanosoma cruzi***. La destrucción selectiva de los macrófagos en ratones con tratamiento con silica incrementan la sensibilidad a la infección, en cuanto a la activación de macrófagos por ***Corynebacterium parvum*** incrementa la resistencia en la fase aguda. Además la examinación histológica de lesiones inflamatorias en ratas y ratones han mostrado la presencia durante el curso de la infección de macrófagos conteniendo parásitos digeridos Para destruir el parásito los macrófagos deberán de ser activados. Factores de sensibilidad sacados de las células T de ratones infectados con ***Trypanosoma cruzi*** activaran los macrófagos para destruir el parásito. Las células T implicadas en esta activación son células cooperadoras del tipo helper-inducer y estas podrían estimular la producción de numerosos y diferentes factores los cuales pueden estar involucrados en la activación del macrófago. Interferones activan los macrófagos y el pretratamiento con el interferón induce y eleva la resistencia. Interferón α (INF-α), INF-β e INF-γ todos potencialmente destructores de tripomastigotes por macrófagos ***in vitro***, aunque INF-γ fue el más efectivo en estimular la actividad tripanocidal, otras pequeñas células, tales como colonias de factores de estimulación granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF) también son efectivos en la inducción de la actividad tripanocidal, aunque de nuevo ninguno fue tan efectivo como IFN-γ . Sin embargo solo no es tan efectivo como el

sobrenadante de células T inmunes, y estas observaciones sugieren que más de un factor están involucrados en la penetración o activación de macrófagos para destruir ***Trypanosoma cruzi***. Aunque los factores implicados podrían estar aumentando la aparente actividad destructora por acción de otro tipo de células, por ejemplo en células destructoras naturales, la actividad es impulsada por INF-α e INF-β , estas células destruirán tripomastigotes de ***Trypanosoma cruzi***.

Los mecanismos de activación de macrófagos si bien desencadenados por reacciones inmunes específicas en ellos no son específicas y capaces de ser estimulados por otros agentes tales como ***Corinebacterium parvum***, derivados de proteínas purificadas (PPD) y BCG (Bacillo Calmette-Guerin), todos los cuales pueden inducir la actividad tripanocidal. Si esta actividad tripanocidal tiene un papel directo en la resistencia a la infección, no es clara, ya que en cepas de ratones sensibles a la infección CL del parásito hubo grandes niveles de activación de macrófagos, es evidente como cepas de ratones resisten IFN y liberación de peróxido de hidrógeno

j) INMUNOPATOLOGÍA Y AUTOINMUNIDAD

En el descubrimiento de los autoanticuerpos en endocardio normal, estructuras vascular e intersticial (anticuerpos EVI) en sueros chagásicos crónicos, si bien para actuar como agonistas adrenergicos, llevan a la conclusión de que la autoinmunidad puede estar involucrada en la patología de la enfermedad de Chagas Reportes adicionales han descrito autoanticuerpos contra células Schwann, mielina, músculo estriado y neuronas en sueros chagásicos. Anticuerpos similares pueden también ser detectados en enfermedad de Chagas aguda rápidamente después de la infección inicial En ambos sueros crónicos y agudos la actividad EVI puede ser removida por absorción con ***Trypanosoma cruzi*** lo cual implica que sueros EVI contengan anticuerpos los cuales tienen reacción cruzada en tejidos de mamíferos y ***Trypanosoma cruzi***, anticuerpos EVI también pueden ser inducidos experimentalmente, pero esto es debatible, aunque la presencia de la actividad EVI puede ser directamente correlacionada con la presencia o severidad de lesiones en chagásicos crónicos. Los mecanismos de autoinmunidad mediados por células pueden también estar involucrados en patologias cardiacas en enfermedad de Chagas, ya que conejos infectados o conejos inmunizados con fracciones subcelulares de ***Trypanosoma cruzi***, que comunmente demuestran inmunidad celular a el parásito y antígenos del corazón desarrollan miocarditis crónica. Formas similares son observados en pacientes humanos, donde los leucocitos son reactivos a antígenos del corazón y células humanas ***in vitro***, así como en ***Trypanosoma cruzi*** y en ratones donde las células T han sido mostradas como enlazan tejido cardiaco infectado con el parásito ***in vitro***, células T citotóxicas también han sido detectadas con doble reactividad a ***Trypanosoma cruzi*** y tejido cardiaco.

Los mecanismos autoinmunes son probablemente una mejor función efectora en la generación de enfermedad de Chagas crónica y hay por lo menos 5 posibles rutas para los cuales estos efectos podrían ser desencadenados

1 Reacción cruzada parásito-antígeno de superficie, simulando antígenos huésped.

2. Antígenos del parásito adsorbiendo a células huésped.
3. Antígenos de células huésped adsorbiendo a parásitos.
4. Células huésped infectadas expresando antígeno del parásito sobre su superficie.
5. La apariencia de reacción cruzada de epitopes en antígenos huésped por modificación o alteración durante la lisis de las células infectadas

Estas rutas probablemente no son mutuamente exclusivas y más de una pueden estar involucradas en la estimulación de autoinmunidad

Ha sido demostrado que, antígenos de ***Trypanosoma cruzi*** son adsorbidos en los tejidos y células del huésped y ese material del huésped puede adsorber a el parásito; es posible que antígenos presentados en esta forma pueda aumentar una respuesta autoinmune. Aunado a estas observaciones es posible que las células infectadas puedan expresar activamente antígenos del parásito en la superficie de su membrana, aunque hay controversia a cerca de que si esto ocurre actualmente ya que, es difícil de controlar pasivamente por adsorber los antígenos.

Evidencias disponibles, como vemos sugieren que células infectadas del huésped son capaces de incorporarse a las glicoproteínas del parásito dentro de su membrana superficial Alternativamente la destrucción de neuronas del huésped y otros tejidos celulares así como ser una causa directa de síndrome de enfermedad de Chagas podrían liberar antígenos huésped, algunos de los cuales pueden ser modificados o alterados y su estimulo adicional o autoinmunidad es aumentada. Esta hipótesis será difícil de examinar rigurosamente hasta que un sistema de modelo fiable, ***in vitro*** o ***in vivo*** llegue a ser disponible.

La forma más obvia por la cual un parásito podría inducir autoinmunidad es a través de compartir o por medio de reacción cruzada en antígenos de superficie o epitopes comunes a huésped y parásito. Hay una evidencia considerable de que esto ocurre en enfermedad de Chagas y en reacción cruzada con moléculas de superficie, han sido definidas usando sueros chagásicos, anticuerpos monoclonales y tecnología de recombinación genética. Laminin es el mayor componente no colágeno del músculo conectivo y tejido nervioso y esto ha sido demostrado por ser un blanco para anticuerpos EVI chagásicos de la fase aguda y crónica de la enfermedad. La actividad contenida dentro del suero EVI dirigida hacia el basamento de la membrana que es específica para laminin y no reacciona con ningún otro componente de tejido conectivo, una molécula parecida a laminin ha sido identificada en la superficie de tripomastigotes de ***Trypanosoma cruzi***. Reacción cruzada de anticuerpos con esta molécula específicamente reconocida a los grupos terminales galactosil-α -1,3-galactosa a N-enlaces oligosacáridos, ***Trypanosoma rangeli*** es muy parecido pero no patógeno como el ***Trypanosoma cruzi***, no posee una superficie similar a la molécula parecida a laminin.

La formación de antígenos de superficie a ***Trypanosoma cruzi*** esta llegando a ser mejor caracterizada y como información sobre posible reacción cruzada, moléculas o epitopes llegan a ser disponibles, es claro que tripomastigotes de ***Trypanosoma cruzi*** expresan moléculas de superficie las cuales pueden ser funcionalmente o inmunologicamente similares a sus contrapartes

humanas. Ejemplos son choques de proteínas calientes y los receptores de colágeno y la fibronectina. Un recombinante antigénico de tripomastigote específico de 160 KD ha sido también identificado por reacciones de anticuerpos monoclonales, han sido demostrados por contener epitopes que hacen reacción cruzada con un enlace de tejidos del huésped. Ya que este antígeno fue preparado como una proteína recombinante de ***Escherichia coli***, el compuesto de reacción cruzada puede ser encodificante dentro de la secuencia polipeptídica , el epitope probablemente sea lineal, si bien que conformacional. Muchos otros antígenos de superficie de ***Trypanosoma cruzi*** tienen reacción cruzada con un lípido sulfatado o estructuras de carbohidratos y estas pueden ser las partes más inmunogénicas de estas moléculas. La identidad de los epitopes específicos reconocido por otra reacción con anticuerpo monoclonal (CES) que une a neuronas mamíferas y a numerosos antígenos de ***Trypanosoma cruzi*** en Western-Blots no son conocidos, aunque puede ser una estructura común tal como un carbohidrato ubicuo de cadena lateral sobre glicoproteínas o una estructura glicolipídica tal como la glicosilfosfatidilinositol (GPI) terminal encontrada en diversas proteínas en membranas. Numerosas y diferentes moléculas de superficie de ***Trypanosoma cruzi*** parecen tener reacción cruzada con antígenos huésped, allí no parece ser clara e identificable una estructura única común a estos antígenos, los cuales pueden estar asociados con reacción cruzada Sin embargo una examinación completa de la reacción cruzada con epitopes han sido sólo llevados fuera en los casos de laminin y además rastreando epitopes de otras reacciones cruzadas con antígenos son necesarios antes de las bases moleculares de las reacciones.

La autoinmunidad se piensa que aumenta desde el rompimiento de su tolerancia. Su tolerancia resulta desde la interacción de un rango de supresión o mecanismo de contrasupresión, el regulador involucrado de linfocitos B y T (energía clonal), la supresión clonal de linfocitos no propios y el ideotipo complejo de la red de trabajo. Como un multicomponente finamente balanceado en la red es claramente susceptible a la perturbación y la confusión de algunos de estos mecanismos puede guiar a autoinmunidad o autorespuesta. Puesto que la infección por ***Trypanosoma cruzi*** guía a inmunosupresión, hay una clara posibilidad de que este, puede tener un efecto causal en la autoinmunidad asociada con la enfermedad de Chagas. La fase aguda inicial de la enfermedad de Chagas es invariablemente caracterizada por una respuesta significativamente blastogénica de linfocitos B y T y es acompañada por rigurosa inmunodepresión Esta respuesta policlonal puede también ser la causa de varios fenómenos de autoinmunidad, desde activación de células B policlonales podrian guiar hasta la producción de anticuerpos y autoreactividad citotóxica o células T cooperadoras, pueden ser activadas

k). INMUNOSUPRESIÓN

La inmunosupresión no específica hacia antígenos no relacionados y tumores es un rango característico de muchas enfermedades parasitarias, incluyendo la enfermedad de Chagas. Numerosos estudios han sido realizados por fuera para aclarar la causa de inmunosupresión de

chagásicos y diversos factores han sido implicados[18]. La inmunosupresión en enfermedad de Chagas es evidente por la reducción en la producción de anticuerpos, reduce la secreción de IL-2 por linfocitos T, reduce la proliferación de células T ***in vitro,*** reduce la actividad citotóxicas de linfocitos T, reduce la expresión receptora IL-2 y reduce la reacción DTH a ***Trypanosoma cruzi***. De estos datos no es posible atribuir inmunosupresión chagásica en una simple causa o efecto, aunque el uso de diferentes criterios para evaluar la inmunosupresión ha generado resultados conflictivos. Por lo tanto, hay evidencias de estudios ***in vitro*** en donde células de bazo infectadas a partir de ***Trypanosoma cruzi***, ratones inmunosuprimidos tienen gran actividad celular T cooperadoras y producen altos niveles de más interleucina que células de bazo de ratones normales. Adicionalmente la presencia de antígenos específicos principalmente células T cooperadoras pueden producir un aumento en la respuesta inmune humoral sostenida sobre antígenos adicionales desafiantes, igual durante la inmunosupresión inducida por ***Trypanosoma cruzi***, aunque en la supresión alta, durante la cumbre de la infección en la fase aguda los macrófagos supresores podrían igualmente bloquear esta principal respuesta T cooperadora.

Parece que si bien macrófagos han sido mostrados para ser involucrados en inmunosupresión , siguiendo la infección inicial de ***Trypanopsoma cruzi***, esto no es debido a un proceso defectivo antigénico por los macrófagos. Reportes han implicado L3,T4^{+} Ly-2^{-} de células T cooperadoras en la inmunosupresión y sugieren su modo de acción sobre células efectoras, parece ser por secreción de una substancia supresora. Significativamente la estimulación antigénica repetida puede vencer la inmunosupresión en la respuesta de los anticuerpos a los antígenos no relacionados, esto ha sido sugerido para ser por activación de pequeños números de células T cooperadoras, suficientes para inducir respuesta específica a células B Hay evidencias de dos posibles rutas de supresión, estas rutas involucran la producción de substancias supresoras, una sintesis reducida y respuesta a IL-2. Estos mecanismos no son reciprocamente exclusivos y elementos de ambos están probablemente involucrados en la inmunosupresión encontrada después de la infección con ***Trypanosoma cruzi***.

Substancias supresoras de huéspedes de peso molécular entre 14-15 KD, 30-60 KD y 196-210 KD han sido identificados como derivados de parásitos de factor supresor encontrados en sobrenadantes de cultivos de epimastigotes La actividad huésped de 30-60 KD, la cual esta desprovista de interleucina o actividad IFN-γ es un componente menor heterogéneo de células esplénicas T cooperadoras en sobrenadantes de cultivos y no han sido purificados El factor supresor de 14-15 KD es encontrado en esplenocítos sobrenadantes y sueros de ratones infectados y este pensamiento es para ejercer esta acción a través de la interacción con macrófagos normales .

Una observación común es de que la producción de IL-2 ***in vitro*** es suprimida con células de animales infectados con ***Trypanosoma cruzi*** y la restauración de funciones de linfocitos puede ser adquirida por el uso de sobrenadantes conteniendo actividad IL-2. Es posible que otros factores aún no sean identificados, las moléculas en estos sobrenadantes de cultivos crudos son también responsables para su función de restauración y la purificación de estos es necesaria para determinar si envolvimiento sinergistico de más de un factor es necesario para traer

inmunosupresión al rededor. El nivel reducido de la producción de IL-2 en células de ratones parece ser ocasionado por una población de células supresoras que son también capaces de suprimir producción de IL-2 en células de ratones no infectados En humanos la inmunosupresión también ha sido relacionada a una reducción independiente IL-l de receptores de la expresión IL-2 en células T guiando a la deficiencia en la proliferación de linfocitos.

Interferón γ tiene un efecto incrementador en la destrucción de ***Trypanosoma cruzi*** por macrófagos de ratón , e IFN-γ recombinante reduce la inmunosupresión en enfermedad aguda de Chagas murino Estas observaciones sugieren que IFN-γ puede ser útil como parte de un régimen terapéutico para infección aguda; sin embargo ha sido sugerido que la inmunosupresión puede ser un mecanismo de defensa del huésped para prevenir autoinmunidad en la fase crónica de la enfermedad el uso en estados tardíos de la enfermedad puede aumentar la patología.

I) ANTÍGENOS

El ***Trypanosoma cruzi*** tiene una superficie celular compleja compuesta principalmente de glicoproteínas y componentes glicolípidos y esta complejidad estructural refleja los diversos rangos de funciones realizados por la membrana del parásito.

Los varios estados del ciclo de vida de ***Trypanosoma cruzi***,cada expresión común y única molécula de superficie, y el rango de moléculas de superficie específicas a un particular estado del ciclo de vida debe reflejar una adaptación por existencia en un medio particular del huésped. Numerosos métodos han sido empleados para estudiar el antígeno de superficie de ***Trypanosoma cruzi***.

Estos métodos usados para purificar componentes membranosos han contribuido en nuestro conocimiento sobre varias moléculas de superficie de ***Trypanosoma cruzi*** sin embargo el alcance de diferentes metodologías usadas han llevado también a algunas variaciones método dependiente en la identificación de ciertos componentes membranosos. Recientemente el uso de métodos DNA-recombinante han contribuido a una gran comprensión del control de la expresión de algunos genes de antígenos de superficie y esto permitirá la preparación de cantidades reales de algún polipéptido recombinante que pueda resultar en ser candidato para una vacuna potencial

Todos los estados de ***Trypanosoma cruzi*** están rodeados por la típica membrana bilaminar; en la forma epimastigote esta comprende 31% de proteínas, 34% de lípidos, 16% de carbohidratos y 9% de esteroles, con un alto nivel de ésteres de esterol y bajo contenido de fosfolípidos La mayoría de los antígenos de superficie celular caracterizados tan lejanos han sido mostrados por ser glicoconjugados y los componentes carbohidratos de algunas moléculas de superficie de ***Trypanosoma cruzi*** pueden ser usados en su purificación por cromatografía de afinidad a la lectina. Algunos de los glicoconjugados ***Trypanosoma cruzi*** contienen azúcar inusualmente, por instancia un antígeno de superficie en estado específico del insecto con un peso molecular de 72 KD no contiene sólo xilosa y ramosa sino también azúcares fosforilados normalmente no encontrados asociados con glicoproteínas eucariotas. La posibilidad por lo tanto existe de que la

ruta de glicosilación en ***Trypanosoma cruzi*** y por cierto en otro protozoario patógeno semejante podría contener algún paso único que pueda ser blanco potencial para quimioterapia Por ejemplo en ***Trypanosoma cruzi*** a diferencia de mamíferos, aves y sistemas de levaduras, los oligosacáridos no son glicosilados y la glicosilación toma lugar sólo después de los oligosacaridos también transferidos a proteínas. El dolicol es el único que contiene 13 isopropenos unidos a diferencia del más usual de 18. Igualmente ***Trypanosoma cruzi*** es incapaz en incorporarse de nuevo al ácido siálico sintetizado y aunque para utilizar una trans-sialidasa para incorporar ácido siálico de fuentes exógenas. Aunque ***Trypanosoma cruzi*** contiene residuos glicosil, autoinmunidad e inmunopatología del parásito ha sido propuesta para ser intimamente asociada con el parásito, carbohidratos epitopes parecidos son comunes con moléculas del huésped. Existe reacción cruzada con autoanticuerpos de sueros chagásicos específicamente reconociendo epitopes galactosil-α 1,3-galactosa presentes en laminin del huésped y un antígeno de superficie del parásito. También ha sido demostrada reacción cruzada por ser dirigida hacia los componentes lipidicos sulfatados de la membrana de ***Trypanosoma cruzi*** y hacia el componente polipeptídico de una proteína flagelar de 160 KD. Es posible que además exista reacción cruzada parásito epitopes pero tienen que ser aún identificados

Seis glicoconjugados mayores han sido parcialmente caracterizados y estos tienen peso molecular aparente de 90, 85, 72, 25, 37-24 y 8-9 KD por electroforesis en gel de sulfato de dodecil poliacrilamida de sodio (SDS-PAGE). Cuando el antígeno de superficie de ***Trypanosoma cruzi*** esta sujeto a dos dimensiones PAGE Estas bandas individuales, cada una separada dentro de más de una mancha y pudiera representar cualquier glicoproteína discreta. En el caso de la banda de 85 KD, este compuesto de más de una glicoproteína discreta [9].

Una mayor glicoproteína celular de superficie que ha sido identificada por sueros chagásicos humanos es la molécula de 90 KD presente en todos los estados del ciclo de vida del parásito. Esta glicoproteína tiene una estructura relativamente simple conteniendo solo 19 % de carbohidratos (manosa) no fosfatada y ha sido purificada por cromatografía de afinidad a la lecitina. GP90 no tiene reacción cruzada determinante y es así un posible candidato para vacunas. Inmunización con GP90 y adyuvantes confieren alguna protección a ratones, la protección no fue absoluta pero disminuyó, parasitemias detectables fueron observadas GP90 puede tener algún grado de actividad antifagocítica ya que el tratamiento de tripomastigotes con tripsina grado GP90 al mismo tiempo incrementa el rango fagocítico tomado y la lisis mediada por complemento de los parásitos. Un antígeno específico metacíclico de 90 KD ha sido identificado por un anticuerpo monoclonal pero no es claro, si esta molécula es idéntica o relacionada a el GP90 original, aunque tripomastigotes metacíclicos premezclados con anticuerpos monoclonales a esta glicoproteína metacíclica específica también da protección parcial. El gen para la porción polipéptidica de una glicoproteína de 90 KD ha sido clonada desde una expresión usando pruebas de anticuerpos monoclonales El gen es parte de una familia multicopia organizada en formación uno delante de otro, de cerca de 20 copias La proteína para este gen aparece un tripomastigote específico y no esta presente en todas las cepas de los parásitos.

Varias glicoproteínas con aparente peso molecular de 85 KD por SDS-PAGE han sido identificadas y las funciones propuestas para un número de ellas La interacción de los anticuerpos con moléculas de estos tamaños reduce la extensión de la invasión celular ***in vitro*** y guía a la hipótesis de que algunas de estas moléculas pudieran estar envueltas en el ataque y/o penetración de células del huésped por el parásito. Uno de los GP85 es conocido por ser un receptor fibronectín y la incubación de parásitos con el receptor fibronectín de enlace peptídico RGDS reduce la penetración del parásito a células huésped ***in vitro***. La molécula de 85-90 KD reportada por Joiner et al en un tripomastigote específico es un DAF C3 convertasa y como tal confiere alguna protección al parásito contra lisis mediada por complemento. Un gen para un antígeno de superficie adicional de 85 KD ha sido clonado y con secuencia de DNA ha demostrado tener homología con choque de proteínas calientes Hsp-90 de Sacharomyces y Hsp-83 de Drosophila.

Genes codificados de antígenos de superficie de tripomastigotes específicos de 85 KD han sido identificados en tres grupos Cada una ha reportado que en el antígeno de 85 KD, los genes son presentados como múltiples, copias variables localizadas por todas partes del genoma y esto ha sido recientemente demostrado por comparación de secuencias de DNA donde estos genes son de la misma familia multigen. El arreglo genómico de esta multicopia de familia variable es similar a la del gen de la familia VSG del tripanosoma africano y por analogía adicional se ha demostrado que un miembro transcrito preferencialmente de la familia es localizado en un telomero Sin embargo la variación antigénica no ha sido descrita En ***Trypanosoma cruzi*** muchas de las copias de los genes GP95 son simultáneamente transcritos y algunos de estos no son teloméricos. Estudios de IF en superficie celular usando antisueros a péptidos específicos diseñados de secuencias cDNA han demostrado que mínimo en tres de los genes GP85 son expresados simultáneamente y análisis de PCR de los 5 últimos genes GP85 del mRNA confirman que multicopias (en por lo menos 10) son simultáneamente transcritos. Esto resultará en una superficie celular heterogénea compuesta de muchas diferencias pero relacionados con GP85. Muchas observaciones han demostrado que las moléculas de superficie de 85 KD de tripomastigotes son instrumentos en el ataque del parásito, sin embargo los mecanismos específicos por los cuales GP85 de tripomastigotes es involucrado en el enlace celular no es conocido.

Análisis adicionales del GP85 deduce la secuencia de aminoácidos revelando la presencia de regiones de homología con sialidasas bacterianas y la presencia en el GP85 de por lo menos dos diferencias de los 8 aminoácidos "Asp boxes" (S-X-D-X-G-X-T-W) características de las enzimas bacterianas son impresionantes. En las enzimas bacterianas los temas asp están separados por aminoácidos extendidos, las longitudes de las cuales son conservadas entre cajas particulares y el tamaño de estas extensiones son mantenidas en la secuencia de GP85. Esto sugiere que ellos pueden estar involucrados en correctas hojas plegables de la proteína permitiendo conservar importantes regiones de aminoácidos, siendo orientados efectivamente.

m). VACUNAS

Estudios de vacunación han sido realizados en diferentes especies de animales, usando una variedad de diferentes antígenos incluyendo fracciones subcelulares, células totales y preparaciones de células de superficie glicoproteica Los resultados en general muestran que estas preparaciones antigénicas reducen todas las parasitemias durante la fase aguda de la enfermedad, y en ratones se convierten en infecciones letales a no letales. Sin embargo ningún estudio de vacunación ha dado protección completa y todos los animales vacunados llegan a ser infectados, incluyendo dentro de estos estudios están experimentos análogos a estos, con los esporozoitos en estados de malaria, cuando fue inducida la inmunidad bloqueo al estado infectivo del esporozoito, en donde la inmunización de ratones con un antígeno presente en la superficie del tripomastigote metacíclico permitió contener y establecer una infección, pero igual la parasitemia reducida en sangre sugirió que la respuesta inmune fue parcialmente efectiva. La cuestión crítica por ser respondida es si la reducción de la parasitemia en la fase aguda y en la cantidad total del parásito, reduce la insidencia y severidad de la fase crónica de la enfermedad. El incremento del entendimiento de la base molecular de la respuesta inflamatoria y autoinmunidad junto a la feasibilidad de medir ECG y los cambios histológicos en grupos de roedores permitirán estudios futuros para encontrar el posible papel de la vacunación en el control de la enfermedad crónica en una fase más racional. Estudios con ratones ya han mostrado que la reducción en la cantidad de parásitos es reflejada en la reducción de la carga del parásito en tejido y en la reducción del daño tisular.

FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad predominantemente rural y continúa siendo un problema de salud en áreas de América Latina afectando a millones de personas. El curso de la infección con ***Trypanosoma cruzi***, el parásito intracelular que causa la enfermedad, es marcado por severas alteraciones de la respuesta inmune del hospedero, tanto en humanos como en modelo de animales de laboratorio Así tenemos que en la producción de anticuerpos, la respuesta inmune celular específica y la no específica, son suprimidas durante la fase aguda de la infección[11-13]; se observa una tendencia hacia la normalización inmunológica durante el período crónico Sin embargo, el diagnóstico en esta fase de la enfermedad, no es fácil de realizarlo, pues la presencia del parásito es muy difícil de ser detectada y la serología determinando IgG en técnicas de HAI e IFI pudieran tener una sensibilidad baja, debido a las alteraciones observadas en la producción de clases y subclases de inmunoglobulinas, durante la infección experimental de ***Trypanosoma cruzi*** [20].

La enfermedad presenta un estadio inicial agudo que evoluciona hacia una etapa crónica en la cual puede observarse una determinada sintomatología. Desarrollándose en la mayoría de los casos como una fase asintomática [31].

Durante la fase aguda es posible certificar la presencia del parásito en el huésped infectado, ya que los elevados niveles de parasitemia característicos de este estadío permiten visualizar al ***Trypanosoma cruzi***, de manera relativamente fácil. Utilizando frotis de gota gruesa teñidos con Giemsa o realizando un método de mayor sensibilidad como QBC (Quantitative Buffy Coat) que es una técnica de concentración tipo microhematocrito en donde se observa a el parásito en movimiento y teñido, además de que se puede cuantificar [32] Los bajos niveles del parásito en sangre durante la fase crónica de la enfermedad hacen la determinación directa del parásito más difícil De aquí surge la necesidad de contar con metodologías que permitan determinar la enfermedad en esta fase.

La fase aguda es caracterizada por fiebre y miocarditis relacionada con parasitosis intracelular, usualmente estos síntomas desaparecen espontáneamente. Muchos pacientes continúan serológicamente positivos pero asintomáticos por el resto de sus vidas. Tales pacientes son llamados casos indeterminados.

Desafortunadamente algunos pacientes progresan más allá del estado indeterminado crónico y después de una prolongada infección asintomática desarrollan miocarditis fibrosa crónica y son clasificados como pacientes cardiacos basados en datos de electrocardiogramas y radiografías de tórax Por lo que en la aparente recuperación de la fase aguda se deduce que muchos casos de enfermedad de Chagas aguda pasan inadvertidos o se diagnostican erróneamente

En la etapa crónica el número de parásitos circulantes disminuye marcadamente, y aún los métodos directos de alta sensibilidad como QBC resultan poco eficaces para la demostración de ***Trypanosoma cruzi***. Se cree que el daño tisular en cardiopatía crónica de Chagas es debido a un ataque autoinmune en el corazón por lo que las formas intracelulares del parásito son raramente encontradas en la sangre y lesiones cardiacas [1,33].

Frente a la dificultad para evidenciar la presencia del agente etiológico en pacientes chagásicos crónicos, la detección de anticuerpos específicos contra ***Trypanosoma cruzi*** surge como una valiosa alternativa para el diagnóstico directo de estas parasitosis [33].

Existen varias pruebas serológicas pero el uso de técnicas sensibles y específicas como hemaglutinación (HAI) e inmunofluorescencia indirecta (IFI) pueden alcanzar una confiabilidad superior al 95% Utilizando además una técnica inmunoenzimática (ELISA) permite evidenciar la infección por ***Trypanosoma cruzi*** de manera más directa, midiendo la respuesta inmune humoral en el huésped presentando mayor sensibilidad [29]

El tratamiento etiológico se considera apropiado durante la etapa aguda, cuando las formas sanguíneas y tisulares de ***Trypanosoma cruzi*** son causantes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y mucho menos en la etapa crónica, causada al parecer por mecanismos de depresión inmunitaria y/o fenómenos de autoinmunidad. No obstante los pacientes crónicos con xenodiagnóstico positivo y títulos elevados de anticuerpos tratados médicamente se negativizan [17].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tripanosomiasis americana es desafortunadamente una enfermedad que afecta a una parte considerable de la humanidad, encontrándose catalogada por la Organización Mundial de la Salud entre las parasitosis más importantes que existen actualmente en centro y sudamerica En México se presenta irregularmente en todo el territorio y representa un riesgo por transmisión. Su presentación es el resultado de un proceso dinámico que involucra complejas interacciones entre agente infeccioso, el huésped, los reservorios, el vector y su medio ambiente. La infección se da habitualmente por la picadura de los triatóminos vectores infectados y la ulterior contaminación de piel y mucosas con las deyecciones del insecto o por la hemotransfusión proveniente de individuos infectados con ***Trypanosoma cruzi***, responsable de alrededor del 20 % de los casos de tripanosomiasis americana La transmisión por hemotransfusión en zonas aparentemente libres de la infección es debido a la migración de individuos infectados a estas zonas y por eso es importante detectarlos [28]

Este trabajo difunde bibliográficamente los avances registrados en el campo de la tripanosomiasis con especial enfoque en los mecanismos de escape que emplea el parásito así como las estrategias de defensa por el hospedero infectado El trabajo aborda aspectos importantes en los mecanismos que intervienen en la interacción de los parásitos con el sistema inmunológico.

Aunque la enfermedad de Chagas no tiene ningún tratamiento satisfactorio, los fármacos deben seguir evaluándose hasta encontrar el tratamiento efectivo. Debido a que no hay registro de casos de infección que hallan desaparecido por si solos.

La presencia de anticuerpos es evidencia de una infección continua. ¿ En los pacientes con infección tratados, que tanto han disminuido estos anticuerpos ? En este trabajo además se implementará un método de ELISA[10], usando antígenos solubles de epimastigotes de ***Trypanosoma cruzi*** formalinizados, para evaluar los niveles de IgM, IgG e IgA en enfermos tratados y no tratados, comparándolos con las pruebas estándares HAI e IFI para enfermedad de Chagas

OBJETIVOS

1. Determinación de anticuerpos IgG, IgA e IgM contra ***Trypanosoma cruzi*** por los métodos de ELISA modificado, HAI e IFI en sueros de varios grupos clínicos de enfermedad de Chagas·

   a) Chagásicos crónicos con tratamiento (Cht)

   b) Chagásicos clínicos sin tratamiento (CCh)

   c) Individuos asintomáticos de una área hiperendémica (H)

   d) Testigos negativos (NC)

2. Comparar sensibilidad y especificidad de ELISA modificado con IFI y HAI.

Criterios de inclusión

a) Chagásicos crónicos con tratamiento (Cht) Son aquellos enfermos crónicos con diagnóstico y de laboratorio confirmado y con tratamiento

b) Chagásicos clínicos sin tratamiento (Cch) Son aquellos pacientes con diagnóstico clínico y de laboratorio positivo para HAI e IFI.

c) Individuos asintomáticos de una área hiperendémica (H). Son individuos clínicamente sanos con diagnóstico de laboratorio positivo a HAI e IFI.

d) Testigos negativos (NC). Son individuos que provienen de zonas no endémicas que no han recibido transfusiones sanguíneas.

Criterios de exclusión:

Aquellos individuos que tengan asociada alguna otra enfermedad infecciosa o degenerativa.

HIPÓTESIS

Considerando que el isotipo de inmunoglobulina debe indicar el estadío de la enfermedad, los niveles de inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA deberán ser mayores en chagásicos clínicos sin tratamiento que en chagásicos crónicos con tratamiento

MATERIAL

I. Biológico: 12 cepas de ***Trypanosoma cruzi*** aisladas de pacientes mexicanos
Antígeno de ***Trypanosoma cruzi***
409 sueros de individuos clínicamente chagásicos.
17 sueros de chagásicos crónicos con tratamiento.
13 sueros de individuos asintomáticos de una área hiperendémica de enfermedad de Chagas.
12 sueros de individuos sanos.

II Reactivos
Amortiguador de salina fosfato (PBS).
Formaldehído al 1% v/v en PBS.
Amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.6.
Sangre de carnero.
Leche semidescremada (Nestle).
Agua bidestilada.
Albúmina bovina al 1% en PBS.
Tween.
Inmunoglobulinas de cabra anti IgM humano unido a peroxidasa de rábano (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA.).
H_2O_2
Orto-fenilendiamina.
Amortiguador de citratos.
H_2SO_4 12N. (Merck)
Solución salina (SSI) al 0.85%

III. Equipo
Balanza granataria (Ohaus).
Balanza analítica (Mettler H-80)
Centrífuga (SOL-BAT).
Baño María (Lab-Line).
Incubadora (MAPSA).
Espectrofotómetro para ELISA (Dynatech)

Micropipeta de 20-100 µL (Brand)
Micropipeta de 20-1000 µL (Brand)

IV Material de vidrio.

Vasos de precipitados de 50, 100, 500 y 1000 mL
Matraces aforados de 50, 100, 1000 y 2000 mL.
Pipetas graduados de 1, 2, 3, 5 y 10 mL.
Probetas de 25, 50, 100 y 1000 mL.
Celdas para espectrofotómetro (Bauch & Lomb).
Tubos de ensaye

V Material vario

Piseta de 250 mL
Soporte universal
Papel parafilm.
Tijeras
Gradilla
Gasas
Jeringas estériles desechables de 3 mL.
Placas de poliestireno (Nunc Laboratories, Denmark).
Bulbos para pipetas Pasteur

MÉTODO

Se usaron 12 cepas de ***Trypanosoma cruzi*** aisladas de pacientes mexicanos y fueron cultivadas en medio de LIT modificado[21]. Los epimastigotes de cada cultivo se cosecharon en la fase exponencial de crecimiento y se realizaron observaciones microscópicas, en preparaciones frescas y teñidas en las que solamente se observó la presencia de epimastigotes. Cada suspensión se lavó, por centrifugación, con amortiguador de fosfato salina (PBS) dos veces, después del último lavado los sedimentos fueron mezclados y procesados para formalinización o para extracción de antígenos solubles. Para la formalinización el paquete de epimastigotes fue resuspendido en formaldehído al 1% v/v en PBS y mantenido a 4°C toda la noche, después se lavó 2 veces en PBS a temperatura ambiente y se resuspendieron en PBS para preparar las laminillas usadas en la prueba de IFI[22] Para obtener el antígeno soluble, los epimastigotes fueron lisados en un proceso de congelación en nitrógeno líquido y descongelación en un baño a 37°C, siete veces. Los microorganismos lisados se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos, a 4°C. La concentración de proteínas en el sobrenadante en PBS se determinó para pegarla a glóbulos rojos de carnero , para la técnica de HAI[24]. Para el ELISA, el antígeno soluble se trató con formaldehído a una concentración final del 0.1% como lo describió Araujo[25] y diluido con amortiguador de carbonatos 0 1M, pH 9 6 para pegarlo a las placas

Para la inmunofluorescencia indirecta IFI Se siguió el método descrito por Camargo[22] sin modificaciones y se consideró una prueba positiva cuando una fuerte inmunofluorescencia se observó a una dilución 1:16 o más alta

Para la hemaglutinación indirecta, se siguió el método de Hoshino-Shimizu[24] en donde se usan glóbulos rojos de pollo recubiertos con antígeno soluble de ***Trypanosoma cruzi*** Se consideró positiva la prueba cuando la aglutinación se presentó a una dilución 1.16 o mayor.

Para ELISA se usaron placas de poliestireno (Nunc Laboratories,Denmark) que fueron irradiadas con luz UV de acuerdo al método de Boudet[26] La concentación óptima de antígeno soluble formalinizado, fue de 2 µg para esta técnica y una dilución de los sueros de 1:50 fue *adecuada. Esto se determinó, previamente usando una concentración de antígeno de 32 µg/mL* y sueros positivos con títulos altos y bajos, obtenidos por las pruebas estándares de HAI e IFI. 100 µL de volumen, conteniendo 2 µg del antígeno soluble formalinizado diluido en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6 se adicionó a cada pozo de la placa y se incubó toda la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con 300 µL de leche descremada al 5% y albúmina bovina al 1% en PBS después de una hora de incubación a 37°C, las placas se lavaron 4 veces con PBS-tween Posteriormente se adicionaron a cada pozo 100 µL de conjugados previamente titulados. Anticuerpo de cabra anti IgM humano marcado con peroxidasa en un título de 1:800 en PBS (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA), anticuerpo de cabra anti IgM humano unida a peroxidasa diluida 1:1000 en PBS (Cappel Labs. Westchester, Pa, USA). Las placas fueron

incubadas una hora a 37°C, después de esta incubación se lavaron 4 veces con PBS-tween y se adicionó H_2O_2 como substrato de la enzima y orto-fenilendiamina como cromógeno en amortiguador de citratos y se incubó por 15 minutos a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 12N. Las lecturas se realizaron en un lector de ELISA (Dynatech Instrumen, Inc. Santa Mónica, California, USA). A 495 nm para establecer el valor de corte, se calculó la medida de la absorbancia de los controles negativos más dos desviaciones estándar[35]. Calculándose para cada inmunoglobulina. Para la IgM el valor de corte fue de 0.481, para la IgG el corte fue de 0 442 y para la IgA el valor de corte fue de 0.209.

SUEROS

Las muestras de sueros, fueron obtenidos de pacientes que acuden al Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la Secretaría de Salud. México Un total de 409 muestras de sueros que se distribuyeron como clínicamente chagásicos (CCh), con base al examen físico, radiografías de tórax y electrocardiogramas, sin tratamiento específico. 17 sueros de pacientes con miocarditis fibrosante activa crónica, basados en datos de electrocardiogramas y de rayos X, con diagnóstico serológico positivo previo con tratamiento específico, chagásico crónico con tratamiento (Cht). 13 sueros de individuos asintomáticos de un área hiperendémica de enfermedad de Chagas (grupo H). Y 12 sueros de individuos sanos sin antecedentes de tranfusiones y provenientes de áreas no endémicas de enfermedad de Chagas, que son nuestros testigos negativos (NC).

RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan los resultados totales de las tres pruebas. La positividad más alta se encuentra con anticuerpos específicos de tipo IgM determinados por ELISA, en el grupo ChC (100%) seguidos por HAI e IFI (83%). En el grupo ChT se observa una disminución en el número de sueros positivos para todas las pruebas, alcanzándose la mayor sensibilidad para IgM e IgG (59%), mientras que para HAI e IFI 41% y 47% respectivamente. En el grupo H llama la atención la positividad alta para IgM e IgG determinada por ELISA (66.6%), mientras que para HAI e IFI son de (25%). No se detectaron positivos en el grupo testigo.

En la tabla 2 se puede observar que la concordancia, entre los pares de pruebas, cambian de acuerdo al grupo donde se realice el análisis. Así tenemos que la mejor concordancia, esta dentro del grupo chagásicos crónicos sin tratamiento (Chst) y es de 83% para los binomios IgM-IgG, IgM-HAI, IgG-HAI, HAI-IFI de 94% También se encontró, en este grupo una mejor concordancia entre IgG-HAI (58.8%) que entre IgM-HAI (35 3%) Para el grupo de sueros de zonas hiperendémicas (H), la concordancia mejor seguimos encontrándola en el binomio HAI-IFI (83%), seguida del binomio IgM-IgG (66.6%).

En la tabla 3 se muestra resumido el análisis de varianza, con un sólo criterio de clasificación por rangos de Kruskal-Wallis a un nivel de significancia de 0 05, en las técnicas de HAI, IFI y ELISA (IgG, IgM e IgA) Observándose diferencia significativa en IgM, IgG y HAI y no encontrándose diferencia significativa en IgA e IFI. Con la prueba de Mann-Whitney se determinó en que pares de grupos existía diferencia significativa, encontrándose lo siguiente: Diferencia significativa en los pares cardiópatas tratados-clínicamente chagásicos, cardiópatas tratados-seropositivos, clínicamente chagásicos-seropositivos, seropositivos-testigos negativos e individuos sanos-testigos negativos para IgM. Diferencia significativa en los pares cardiópatas tratados-clínicamente chagásicos, cardiópatas tratados-seropositivos, cardiópatas tratados-individuos sanos, cardiópatas tratados-testigos negativos, clínicamente chagásicos-testigos negativos, seropositivos-testigos negativos e individuos sanos-testigos negativos para IgG. Y diferencia significativa en los pares cardiópatas tratados-testigos negativos, clínicamente chágasicos-individuos sanos, seropositivos-individuos sanos y seropositivos-testigos negativos para HAI.

En la tabla 4 se observa diferencia significativa en todos los grupos clínicos para los pares de inmunoglobulinas y no encontrándose significancia en el par de métodos HAI-IFI para todos los grupos clínicos.

TABLAS DE RESULTADOS

CARDIÓPATAS TRATADOS

ELISA			HAI	IFI
IgM	IgG	IgA		
1 - 0.853	0 706	0 201	3.0102	2 7092
6.- 0.747	0.667	0 376	3.6123	3.3113
7 - 0 820	0.598	0 411	0 9030	1.5051
8 - 0.543	0 610	0.210	3 6123	2 7092
15 -0 702	0 610	0 245	2 1072	2.1072
19 -0 750	0.670	0 228	2 7092	2.4082
21 -0.881	0 591	0.114	0 0000	0 0000
22.-0.838	0 644	0.376	0.0000	0.0000
27.-0 883	0 477	0 345	0.0000	0.0000
28.-0 782	0.628	0 306	0.0000	0 0000
29 -0 703	0 386	0 220	0.0000	0.0000
39 -0.747	0 555	0 440	0 0000	0.0000
40 -0.732	0 619	0 256	0.0000	0 0000
41.-0.788	0 539	0.210	0 0000	0 0000
42 -0.502	0 543	0.212	0 0000	0 0000
44 -0.499	0.558	0.222	2.4082	2 1072
45 -0.601	0.335	0.185	3.0102	2 4082

INDIVIDUOS SANOS (DE UNA ÁREA HIPERENDÉMICA)

ELISA			HAI	IFI
IgM	IgG	IgA		
9 - 0 906	0 683	0 346	1 8062	2.1072
10 -0.872	0 711	0.449	1 2041	0.0000
14.-0 929	0 670	0 238	0.0000	1 5051
16.-0 871	0.557	0 276	0 9030	1 5051
26.-0.840	0 625	0 190	0 0000	0.0000
30.-0 887	0 546	0 250	0 0000	0 0000
31 -0 661	0.390	0 175	0 0000	0 0000
32.-0 704	0 503	0 195	0.0000	0 0000
33.-0.797	0 660	0 245	0.0000	0 0000
36.-0.585	0 653	0.472	0 0000	0.0000
37.-0.748	0.655	0.338	0 0000	0 0000
38.-0.748	0 686	0 343	0.0000	0 0000
47 -0.668	0 724	0 412	2 4082	2.7094

CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS

ELISA			HAI	IFI
IgM	IgG	IgA		
2 - 0 829	0 7282	0.333	3 0102	2.7092
4 - 0.883	0 661	0.479	2.1072	2 4082
5.- 0.841	0 669	0.227	1 5051	1 5051
11 -0 879	0.672	0.178	2 1072	1.5051
12 -0.857	0 594	0.201	2.4082	1 5051
13 -0.823	0 596	0.342	1.5051	1 8062
18.-0.903	0 762	0 404	0.9030	0.0000

SEROPOSITIVOS

ELISA			HAI	IFI
IgM	IgG	IgA		
9.- 0 906	0.683	0.346	1.8062	2 1072
10.-0 872	0 711	0.449	1.2041	0 0000
14.-0.929	0.670	0.238	1.2041	1 5051
16.-0 871	0.557	0 276	0.903	1 5051
47.-0 868	0.724	0 412	2.4082	2 7092

CONTROLES NEGATIVOS

ELISA			HAI	IFI
IgM	IgG	IgA		
29 - 0 703	0.386	0.220	0.000	0.000
31 - 0.661	0 390	0 175	0 000	0.000
32 - 0 704	0 503	0 195	0.000	0.000
40 - 0 732	0.619	0 256	0 000	0.000
41 - 0 788	0 539	0 210	0 000	0 000
42.- 0.502	0 543	0.212	0.000	0.000
43 - 0 667	0 589	0.178	0.000	0.000

GRUPOS	ELISA			HAI	IFI
	IgM	IgG	IgA		
Cht	10/17 (59%)	10/17 (59%)	8/17 (47%)	717 (47%)	8/12 (66.6%)
CCh	12/12 (100%)	10/12 (83%)	7/12 (58 3%)	10/12 (83%)	10/12 (83%)
H	8/12 (66.6%)	8/12 (66 6%)	5/12 (41.6)	3/12 (25%)	3/12 (25%)
NC	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12

Tabla 1. Porcentajes de positividad de distintos métodos serológicos, en diferentes grupos.

CONCORDANCIAS	GRUPOS		
	CHT	CCH	H
IgM-IgG	11/17 (64.7%)	10/12 (83%)	8/12 (66.6%)
IgM-HAI	6/17 (35.5%)	10/12 (83%)	7/12 (58.3%)
IgG-HAI	10/17 (58.8%)	10/12 (83%)	7/12 (58.3%)
IgA-HAI	4/17 (23.5%)	7/17 (58%)	6/12 (50%)
HAI-IFI	16/17 (94%9	10/12 (83%)	10/12 (83%)
IgM-IFI	7/17 (41%)	10/12 (83%)	7/12 (58.3%)
IgG-IFI	11/17 (64.7%)	8/12 (66.6%)	5/12 (41.6%)
IgA-IFI	5/17 (29%)	5/12 (41.6%)	6/12 (50%)

Tabla 2. Porciento de concordancia entre pares de pruebas en los diferentes grupos

	ELISA			HAI	IFI
	IgM	IgG	IgA		
CARDIOPATAS TRATADOS-CLINICAMENTE CHAGASICOS	U_1=102.5 U_2=16.5	U_1=105 U_2=24			
CARDIOPATAS TRATADOS-SEROPOSITIVOS	U_1=79 U_2=6	U_1=71.5 U_2=13.5			
CARDIOPATAS TRATADOS-INDIVIDUOS SANOS	U_1=153 U_2=68	U_1=151.5 U_2=69.5			
CARDIOPATAS TRATADOS-TESTIGOS NEG.		U_1=33 U_2=86		U_1=31.5 U_2=87.5	
CLINICAMENTE CHAGASICOS-SEROPOSITIVOS					
CLINICAMENTE CHAGASICOS-INDIVIDUOS SANOS				U_1=11 U_2=80	
CLINICAMENTE CHAGASICOS-TESTIGOS NEG.	U_1=0 U_2=49	U_1=2 U_2=47		U_1=0 U_2=49	
SEROPOSITIVOS-INDIVIDUOS SANOS				U_1=12 5 U_2=52 5	
SEROPOSITIVOS-TESTIGOS NEG	U_1=0 U_2=35	U_1=2 U_2=33		U_1=0 U_2=35	
INDIVIDUOS SANOS-TESTIGOS NEG.	U_1=16 U_2=75	U_1=14 U_2=77			

Tabla 3 Pares de grupos clínicos con diferencias significativas.

	CARDIOPATAS TRATADOS	CLINICAMENTE CHAGASICOS	SEROPOSITIVOS	INDIVIDUOS SANOS	TESTIGOS NEGATIVOS
IgM-IgG	U_1=50.5 U_2=238.5	U_1=0 U_2=49	U_1=0 U_2=25	U_1=16 U_2=153	U_1=5 U_2=44
IgM-IgA	U_1=0 U_2=289	U_1=0 U_2=49	U_1=0 U_2=25	U_1=0 U_2=169	U_1=0 U_2=49
IgG-IgA	U_1=7 U_2=282	U_1=0 U_2=49	U_1=0 U_2=25	U_1=3 U_2=166	U_1=0 U_2=49
HAI-IFI					

Tabla 4 Pares de métodos con diferencias significativas.

ANÁLISIS DE VARIANCIA, CON UN SÓLO CRITERIO DE CLASIFICACIÓN POR RANGOS, DE KRUSKAL-WALLIS.
DATOS PARA IgM

FACTOR	N	SUMA DE CUADRADOS
CARDIOPATAS TRATADOS	17	321 5
CLINICAMENTE CHAGASICOS	7	246.5
SEROPOSITIVOS	5	204 5
INDIVIDUOS SANOS	13	369.5
TESTIGOS NEGATIVOS	7	83 0

Prueba de Kruskal-Wallis (Aproximación de Ji cuadrada)
H = 19.1
Grados de liberdad= 4
Nivel de significancia= 0 05
Ji cuadrada de tablas= 9.488
Conclusión H > 9 488 por lo que existe diferencia significativa en por lo menos un par de grupos clínicos para IgM.

DATOS PARA IgG

FACTOR	N	SUMA DE CUADRADOS
CARDIOPATAS TRATADOS	17	346
CLINICAMENTE CHAGASICOS	7	245
SEROPOSITIVOS	5	184
INDIVIDUOS SANOS	13	371
TESTIGOS NEGATIVOS	7	79

Prueba de Kruskal-Wallis (Aproximación de Ji cuadrada)
H = 15.6
Grados de libertad = 4
Nivel de significancia = 0.05
Ji cuadrada de tablas= 9.488
Conclusión H > 9 488 Por lo que existe diferencia significativa en por lo menos un par de grupos clínicos para IgG

DATOS PARA IgA

FACTOR	N	SUMA DE CUADRADOS
CARDIOPATAS TRATADOS	17	400.5
CLINICAMENTE CHAGASICOS	7	191.0
SEROPOSITIVOS	5	179 5
INDIVIDUOS SANOS	13	364 0
TESTIGOS NEGATIVOS	7	90 0

Prueba de Kruskal-Wallis (Aproximación de Ji cuadrada)
H = 8 89
Grados de liberdad = 4
Nivel de significancia = 0.05
Ji cuadrada de tablas= 9.488
Conclusión: H < 9.488 Por lo que no existe diferencia significativa entre grupos clínicos para IgA

DATOS PARA HAI

FACTOR	N	SUMA DE CUADRADOS
CARDIOPATAS TRATADOS	17	451 5
CLINICAMENTE CHAGASICOS	7	257 0
SEROPOSITIVOS	5	164 5
INDIVIDUOS SANOS	13	264 5
TESTIGOS NEGATIVOS	7	87.5

Prueba de Krustal-Wallis (Aproximación de Ji cuadrada)
H = 13.17
Grados de libertad = 4
Nivel de significancia = 0.05
Ji cuadrada de tablas= 9.488
Conclusión: H > 9.488 Por lo que existe diferencia significativa en por lo menos un par de grupos clínicos para HAI

DATOS PARA IFI

FACTOR	N	SUMA DE CUADRADOS
CARDIPATAS TRATADOS	17	459.5
CLINICAMENTE CHAGASICOS	7	232.5
SEROPOSITIVOS	5	161.5
INDIVIDUOS SANOS	13	273.5
TESTIGOS NEGATIVOS	7	98 0

Prueba de Kruskal-Wallis (Aproximación de Ji cuadrada)
H = 9 10
Grados de libertad = 4
Nivel de significancia = 0 05
Ji cuadrada de tablas = 9.488
Conclusión: H < 9.488 por lo que no existe diferencia significativa entre grupos clínicos para IFI

DATOS PARA CARDIÓPATAS TRATADOS

FACTOR	N	SUMA DE CUADRADOS
IgM	17	680 5
IgG	17	485 5
IgA	17	160 0

Prueba de Kruskal-Wallis (Aproximación de Ji cuadrada)
H = 36 8
Grados de libertad = 2
Nivel de significancia = 0.05
Ji cuadrada de tablas = 5.991
Conclusión: H > 5 991 por lo que existe diferencia sifnificativa en por lo menos un par de métodos para el grupo cardiópatas tratados.

DATOS PARA CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS

FACTOR	N	SUMA DE CUADRADOS
IgM	7	126
IgG	7	77
IgA	7	28

Prueba de Kruskal-Wallis (Aproximación de Ji cuadrada)
H = 17.8
Grados de libertad = 2
Nivel de significancia = 0.05
Ji cuadrada de tablas = 5 991
Conclusión: H > 5 991 por lo que existe diferencia significativa en por lo menos un par de métodos para el grupo clínicamente chagásicos.

DATOS PARA SEROPOSITIVOS

FACTOR	N	SUMA DE CUADRADOS
IgM	5	65
IgG	5	40
IgA	5	15

Prueba de Kruskal-Wallis (Aproximación de Ji cuadrada)
H = 12 5
Grados de libertad = 2
Nivel de significancia = 0.05
Ji cuadrada de tablas = 5.991
Conclusión H > 5.991 Por lo que existe diferencia significativa en por lo menos un par de métodos para seropositivos.

DATOS PARA INDIVIDUOS SANOS

FACTOR	N	SUMA DE CUADRADOS
IgM	13	413
IgG	13	273
IgA	13	94

Prueba de Kruskal-Wallis (Aproximación de Ji cuadrada)
H = 30.2
Grados de libertad = 2
Nivel de significancia = 0 05
Ji cuadrada de tablas = 5.991
Conclusión: H > 5.991 por lo que existe diferencia significativa en por lo menos un par de métodos para individuos sanos.

DATOS PARA TESTIGOS NEGATIVOS

FACTOR	N	SUMA DE CUADRADOS
IgM	7	121
IgG	7	82
IgA	7	28

Prueba de Kruskal-Wallis (Aproximación de Ji cuadrada)
H = 16 18
Grados de libertad = 2
Nivel de significancia = 0.05
Ji cuadrada de tablas = 5 991
Conclusión. H >Por lo que existe diferencia significativa en por lo menos un par de métodos para testigos negativos

PRUEBA DE U DE MANN-WHITNEY PARA DETERMINAR LOS PARES DE GRUPOS CLÍNICOS Y PARES DE MÉTODOS CON DIFRENCIAS SIGNIFICARIVAS.

DATOS DE IgM EN CARDIÓPATAS TRATADOS Y CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS

FACTOR	n	R
1. CARDIOPATAS TRATADOS	17	169.5
2. CLINICAMENTE CHAGASICOS	7	130.5

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 102.5
U_2 = 16.5
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba U = 33
Conclusión· U_2 < Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre el grupo cardiópatas tratados y el de clínicamente chagásicos para IgM.

DATOS DE IgM EN CARDIÓPATAS TRATADOS Y SEROPOSITIVOS

FACTOR	n	R
1. CARDIOPATAS TRATADOS	17	159
2. SEROPOSITIVOS	5	94

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 79
U_2= 6
Nivel de significancia = 0 05
Valor crítico para la prueba de U = 21
Conclusión: U_2 < Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre el grupo cardiópatas tratados y el de seropositivos para IgM.

DATOS DE IgM EN CARDIÓPATAS TRATADOS E INDIVIDUOS SANOS

FACTOR	n	R
1. CARDIOPATAS TRATADOS	17	221
2. INDIVIDUOS SANOS	13	244

Prueba de Mann-Whitney
U_1 =153
U_2 = 68
Nivel de significancia = 0 05
Valor crítico para la prueba de U = 71
Conclusión U_2 < Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre el grupo de cardiópatas tratados y el de individuos sanos para IgM.

DATOS DE IgM EN CARDIÓPATAS TRATADOS Y TESTIGOS NEGATIVOS

FACTOR	n	R
1. CARDIOPATAS TRATADOS	17	233
2. INDIVIDUOS SANOS	7	67

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 39
U_2= 80
Nivel de significancia = 0,05
Valor crítico para la prueba de U = 34
Conclusión: U_1 > Valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre el grupo de cardiópatas tratados y testigos negativos para IgM

DATOS DE IgM EN CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS Y SEROPOSITIVOS

FACTOR	N	R
1. CLINICAMENTE CHAGASICOS	7	37
2. SEROPOSITIVOS	5	41

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 26
U_2= 9
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 7
Conclusión U_2 > Valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre el grupo clínicamente chagásicos y el de seropositivos para IgM.

DATOS DE IgM EN CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS E INDIVIDUOS SANOS

FACTOR	n	R
1. CLINICAMENTE CHAGASICOS	7	85
2. INDIVIDUOS SANOS	13	125

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 34
U_2= 57
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 25
Conclusión. U_1> Valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre el grupo clínicamente chagásico y el de individuos sanos para IgM

DATOS DE IgM EN CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS Y TESTIGOS NEGATIVOS

FACTOR	n	R
1. CLINICAMENTE CHAGASICOS	7	77
2. TESTIGOS NEGATIVOS	7	28

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 0
U_2= 49
Nivel de significancia =0 05
Valor crítico para la prueba de U = 12
Conclusión: U_1 < Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre el grupo clínicamente chagásico y el de testigos negativos para IgM.

DATOS DE IgM EN SEROPOSITIVOS E INDIVIDUOS SANOS

FACTOR	n	R
1. SEROPOSITIVOS	5	64.5
2. INDIVIDUOS SANOS	13	106

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 15 5
U_2= 50
Nivel de significancia = 0 05
Valor crítico para la prueba de U = 16
Conclusión: U_1< Valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre el grupo seropositivo y el de individuos sanos para IgM

DATOS DE IgM EN SEROPOSITIVOS Y TESTIGOS NEGATIVOS

FACTOR	n	R
1. SEROPOSITIVOS	5	50
2. TESTIGOS NEGATIVOS	7	28

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 0
U_2= 35
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 7
Conclusión: U_1 < Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre el grupo seropositivos y el de testigos negativos para IgM

DATOS DE IgM EN INDIVIDUOS SANOS Y TESTIGOS NEGATIVOS

FACTOR	n	R
1. INDIVIDUOS SANOS	13	166
2. TESTIGOS NEGATIVOS	7	44

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 16
U_2= 75
Nivel de significancia = 0 05
Valor crítico para la prueba de U = 25
Conclusión: U_1 < Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre el grupo de individuos sanos y el de testigos negativos para IgM.

DATOS DE IgG EN CARDIÓPATAS TRATADOS Y CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS

FACTOR	n	R
1. CARDIOPATAS TRATADOS	17	167
2. CLINICAMENTE CHAGAS.	7	123

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 105
U_2= 24
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 34
Conclusión U_2 < Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre el grupo de cardiópatas tratados y el de clínicamente chagásicos para IgG

DATOS DE IgG EN CARDIÓPATAS TRATADOS Y SEROPOSITIVOS

FACTOR	n	R
1. CARDIOPATAS TRATADOS	17	166.5
2. SEROPOSITIVOS	5	86.5

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 71 5
U_2= 13 5
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 21
Conclusión U_2 < Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre el grupo de cardiópatas tratados y el de seropositivos para IgG

DATOS DE IgG EN CARDIÓPATAS TRATADOS E INDIVIDUOS SANOS

FACTOR	n	R
1. CARDIOPATAS TRATADOS	17	222 5
2. INDIVIDUOS SANOS	13	242 5

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 151 5
U_2= 69.5
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 71 .
Conclusión. U_2 < Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre el grupo de cardiópatas tratados y el de individuos sanos para IgG

DATOS DE IgG EN CARDIÓPATAS TRATADOS Y TESTIGOS NEGATIVOS

FACTOR	n	R
1. CARDIOPATAS TRATADOS	17	239
2. TESTIGOS NEGATIVOS	7	61

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 33
U_2= 86
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 34
Conclusión U_1 < Valor critico por lo que existe diferencia significativa entre el grupo de cardiópatas tratados y el de testigos negativos para IgG

DATOS DE IgG EN CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS Y SEROPOSITIVOS

FACTOR	n	R
1. CLINICAMENTE CHAGAS.	7	44
2. SEROPOSITIVOS	5	34

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 19
U_2= 16
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 7
Conclusión. U_2 > Valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre el grupo de clínicamente chagásico y el de seropositivos para IgG

DATOS DE IgG EN CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS E INDIVIDUOS SANOS

FACTOR	n	R
1. CLINICAMENTE CHAGAS.	7	67
2. INDIVIDUOS SANOS	13	123

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 32
U_2= 59
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 25
Conclusión U_1 > Valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre el grupo de clínicamente chagásicos y el de individuos sanos para IgG

DATOS DE IgG EN CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS Y TESTIGOS NEGATIVOS

FACTOR	n	R
1. CLINICAMENTE CHAGAS.	7	75
2. TESTIGOS NEGATIVOS	7	30

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 2
U_2= 47
Nivel de significancia = 0 05
Valor crítico para la prueba de U = 12
Conclusión: U_1 < Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre el grupo de clínicamente chagásicos y el de testigos negativos para IgG

DATOS DE IgG EN SEROPOSITIVOS E INDIVIDUOS SANOS

FACTOR	N	R
1. SEROPOSITIVOS	5	60.5
2. INDIVIDUOS SANOS	13	110.5

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 19.5
U_2= 45.5
Nivel de significancia = 0 05
Valor crítico para la prueba deU = 16
Conclusión: U_1 > Valor crítico por lo que no existe diferencia significatriva entre el grupo seropositivos e individuos sanos para IgG

DATOS DE IgG EN SEROPOSITIVOS Y TESTIGOS NEGATIVOS

FACTOR	N	R
1. SEROPOSITIVOS	5	48
2. TESTIGOS NEGATIVOS	7	30

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 2
U_2= 33
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba deU = 7
Conclusión: U_1 < Valor crítico por lo que existe diferencia significatriva entre el grupo seropositivos y testigos negativos para IgG.

DATOS DE IgG EN INDIVIDUOS SANOS Y TESTIGOS NEGATIVOS

FACTOR	n	R
1. INDIVIDUOS SANOS	13	168
2. TESTIGOS NEGATIVOS	7	42

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 14
U_2= 77
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba deU = 25
Conclusión: U_1 < Valor crítico por lo que existe diferencia significatriva entre el grupo de individuos sanos y testigos negativos para IgG.

DATOS DE HAI EN CARDIÓPATAS TRATADOS Y CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS

FACTOR	n	R
1. CARDIÓPATAS TRATADOS	17	196.0
2. CLINICAMENTE CHAGASICOS	7	104 0

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 76
U_2= 43
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba deU = 34
Conclusión: U_2 > Valor crítico por lo que no existe diferencia significatriva entre el grupo cardiópatas tratados y clinicamente chagásicos para HAI.

DATOS DE HAI EN CARDIÓPATAS TRATADOS Y SEROPOSITIVOS

FACTOR	n	R
1. CARDIOPATAS TRATADOS	17	187.0
2. SEROPOSITIVOS	5	66 0

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 51
U_2= 34
Nivel de significancia = 0 05
Valor crítico para la prueba de U = 21
Conclusión: U_2> Valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre el grupo de cardiópatas tratados y el de seropositivos.

DATOS DE HAI EN CARDIÓPATAS TRATADOS E INDIVIDUOS SANOS

FACTOR	n	R
1. CARDIOPATAS TRATADOS	17	287
2. INDIVIDUOS SANOS	13	178

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 87
U_2= 134
Nivel de significancia = 0 05
Valor crítico para la lrueba de U = 71
Conclusión: U_1> Valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre el grupo de cardiópatas tratados y de individuos sanos para HAI

DATOS DE HAI EN CARDIÓPATAS TRATADOS Y TESTIGOS NEGATIVOS

FACTOR	n	R
1. CARDIOPATAS TRATADOS	17	240.5
2. TESTIGOS NEGATIVOS	7	59.5

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 31 5
U_2= 87.5
Nivel de significancia = 0 05
Valor crítico para la prueba de U = 34
Conclusión. U_1< Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre el grupo de cardiópatas tratados y el de testigos negativos para HAI

DATOS DE HAI EN CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS Y SEROPOSITIVOS

FACTOR	n	R
1. CLINICAMENTE CHAGASICOS	7	52
2. SEROPOSITIVOS	5	26

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 11
U_2= 24
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 7
Conclusión U_1> Valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre el grupo clínicamente chagásicos y seropositivos para HAI

DATOS DE HAI EN CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS E INDIVIDUOS SANOS

FACTOR	n	R
1. CLINICAMENTE CHAGASICOS	7	108
2. INDIVIDUOS SANOS	13	102

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 11
U_2= 80
Nivel de significancia = 0.05
Valor critico para la prueba de U = 25
Conclusión: U_1< Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre el grupo clínicamente chagásicos e individuos sanos para HAI

DATOS DE HAI EN CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS Y TESTIGOS NEGATIVOS

FACTOR	n	R
1. CLINICAMENTE CHAGASICOS	7	77
2. TESTIGOS NEGATIVOS	7	28

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 0
U_2= 49
Nivel de significancia = 0 05
Valor crítico para la prueba de U = 12
Conclusión: U_1 < Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre el grupo clínicamente chagásicos y testigos negativos para HAI.

DATOS DE HAI EN SEROPOSITIVOS E INDIVIDUOS SANOS

FACTOR	n	R
1. SEROPOSITIVOS	5	67.5
2. INDIVIDUOS SANOS	13	103.5

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 12.5
U_2= 52.5
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 16
Conclusión U_1< Valor crítico por lo que si existe diferencia significativa entre el grupo seropositivos e individuos sanos para HAI

DATOS DE HAI EN SEROPOSITIVOS Y TESTIGOS NEGATIVOS

FACTOR	n	R
1. SEROPOSITIVOS	5	50
2. TESTIGOS NEGATIVOS	7	28

Prueba de Mann-Whitney
$U_1 = 0$
$U_2 = 35$
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 7
Conclusión: $U_1 <$ Valor crítico por lo que existe difgerencia significativa entre el grupo seropositivo y el de testigos negativos para HAI.

DATOS DE HAI EN INDIVIDUOS SANOS Y TESTIGOS NEGATIVOS

FACTOR	n	R
1. INDIVIDUOS SANOS	13	154
2. TESTIGOS NEGATIVOS	7	56

Prueba de Mann-Whitney
$U_1 = 28$
$U_2 = 63$
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 25
Conclusión: $U_1 >$ Valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre el grupo individuos sanos y el de testigos negativos para HAI.

DATOS DE CARDIÓPATAS TRATADOS POR IgM E IgG

FACTOR	N	R
1. IgM	17	391 5
2. IgG	17	203 5

Prueba de Mann-Whitney
$U_1 = 50.5$
$U_2 = 238.5$
Nivel de significancia = 0 05
Valor crítico para la prueba de U = 97
Conclusión: $U_1 <$ Valor crítico por lo que existe una diferencia significativa entre IgM e IgG en cardiópatas tratados.

DATOS DE CARDIÓPATAS TRATADOS POR IgM E IgA

FACTOR	N	R
1. IgM	17	442
2. IgA	17	153

Prueba de Mann-Whitney
$U_1 = 0$
$U_2 = 289$
Nivel de significancia =0.05
Valor crítico para la prueba de U = 97
Conclusión $U_1 <$ Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre IgM e IgA en cardiópatas tratados.

DATOS DE CARDIÓPATAS TRATADOS POR IgG E IgA

FACTOR	N	R
1. IgG	17	435
2. IgA	17	160

Prueba de Mann-Whitney
$U_1 = 7$
$U_2 = 282$
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 97
Conclusión: $U_1 <$ Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre IgG e IgA en cardiópatas tratados.

DATOS DE CARDIÓPATAS TRATADOS POR HAI E IFI

FACTOR	N	R
1. HAI	17	307.5
2. IFI	17	287.5

Prueba de Mann-Whitney
$U_1 = 134.5$
$U_2 = 154.5$
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 97
Conclusión: $U_1 >$ Valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre HAI e IFI en cardiópatas tratados

DATOS DE CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS POR IgM E IgG

FACTOR	N	R
1. IgM	7	77
2. IgG	7	28

Prueba de Mann-Whitney
$U_1 = 0$
$U_2 = 49$
Nivel de significancia = 0 05
Valor crítico para la prueba de U = 12
Conclusión: $U_1 <$ Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre IgM e IgG en clínicamente chagásicos.

DATOS DE CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS POR IgM E IgA

FACTOR	N	R
1. IgM	7	77
2. IgA	7	28

Prueba de Mann-Whitney
$U_1 = 0$
$U_2 = 49$
Nivel de significancia = 0 05
Valor crítico para la prueba de U = 12
Conclusión· $U_1 <$ Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre IgM e IgA en clínicamnete chagásicos.

DATOS DE CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS PARA IgG E IgA

FACTOR	N	R
1. IgG	7	77
2. IgA	7	28

Prueba de Mann-Whitney
$U_1 = 0$
$U_2 = 49$
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 12
Conclusión· $U_1 <$ Valor crítico por lo que existe difrencia significativa entre IgG e IgA en clínicamente chagásicos.

DATOS DE CLÍNICAMENTE CHAGÁSICOS PARA HAI E IFI

FACTOR	N	R
1. HAI	7	56 5
2. IFI	7	48 5

Prueba de Mann-Whitney
U_1 = 20 5
U_2 = 28 5
Nivel de significancia = 0 05
Valor crítico para la prueba de U = 12
Conclusión. U_1 > Valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre HAI e IFI en clínicamente chagásicos

DATOS DE SEROPOSITIVOS PARA IgM E IgG

FACTOR	N	R
1. IgM	5	40
2. IgG	5	15

Prueba de Mann-Whitnet
U_1= 0
U_2= 25
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 5
Conclusión. U_1< Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre IgM e IgG en seropositivos.

DATOS DE SEROPOSITIVOS PARA IgM E IgA

FACTOR	N	R
1. IgM	5	40
2. IgA	5	15

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 0
U_2= 25
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 5
Conclusión: U_1< Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre IgM e IgA en seropositivos.

DATOS DE SEROPOSITIVOS PARA IgG E IgA

FACTOR	N	R
1. IgG	5	40
2. IgA	5	15

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 0
U_2= 25
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 5
Conclusión: U_1= < Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre IgG e IgA en seropositivos.

DATOS DE SEROPOSITIVOS PARA HAI E IFI

FACTOR	N	R
1. HAI	5	25
2. IFI	5	30

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 15
U_2= 10
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 5
Conclusión: U_2> Valor crítico por lo que no existe diferencia entre HAI e IFI en seropositivos.

DATOS DE INDIVIDUOS SANOS PARA IgM E IgG

FACTOR	N	R
1. IgM	13	244
2. IgG	13	107

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 16
U_2= 153
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 51
Conclusión: U_1< Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre IgM e IgG en individuos sanos

DATOS DE INDIVIDUOS SANOS PARA IgM E IgA

FACTOR	N	R
1. IgM	13	260
2. IgA	13	91

Prueba de Mann-Whitney
$U_1 = 0$
$U_2 = 169$
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 51
Conclusión: $U_1 <$ Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre IgM e IgA en individuos sanos.

DATOS DE INDIVIDUOS SANOS PARA IgG E IgA

FACTOR	N	R
1. IgG	13	257
2. IgA	13	94

Prueba de Mann-Whitney
$U_1 = 3$
$U_2 = 166$
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 51
Conclusión: $U_1 <$ Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre IgG e IgA en individuos sanos.

DATOS DE INDIVIDUOS SANOS PARA HAI E IFI

FACTOR	N	R
1. HAI	13	172.5
2. IFI	13	178.5

Prueba de Mann-Whitney
$U_1 = 87.5$
$U_2 = 81\ 5$
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 52
Conclusión: $U_2 >$ Valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre HAI e IFI en individuos sanos.

DATOS DE TESTIGOS NEGATIVOS PARA IgM E IgG

FACTOR	N	R
1. IgM	7	72
2. IgG	7	33

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 5
U_2= 44
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 12
Conclusión: U_1< Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre IgM e IgG en testigos negativos.

DATOS DE TESTIGOS NEGATIVOS PARA IgM E IgA

FACTOR	N	R
1. IgM	7	77
2. IgA	7	28

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 0
U_2= 49
Nivel de significancia= 0 05
Valor crítico para la prueba de U = 12
Conclusión: U_1 < Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre IgM e IgA en testigos negativos.

DATOS DE TESTIGOS NEGATIVOS PARA IgG E IgA

FACTOR	N	R
1. IgG	7	77
2. IgA	7	28

Prueba de Mann-Whitney
U_1= 0
U_2= 49
Nivel de significancia = 0.05
Valor crítico para la prueba de U = 12
Conclusión. U_1< Valor crítico por lo que existe diferencia significativa entre IgG e IgA en testigos negativos.

DATOS DE TESTIGOS NEGATIVOS PARA HAI E IFI

FACTOR	N	R
1. HAI	7	52.5
2. IFI	7	52.5

Prueba de Mann-Whitney

$U_1 = 24.5$

$U_2 = 24.5$

Nivel de significancia = 0 05

Valor crítico para la prueba de U = 12

Conclusión· U_1 *o* U_2 > Valor crítico por lo que no existe diferencia significativa entre HAI e IFI en testigos negativos.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo al Comité de Expertos de la OMS en enfermedad de Chagas, un serodiagnóstico positivo solamente se establece cuando las pruebas de HAI e IFI son positivas. La primera es fácil de realizar en cualquier laboratorio; pero la prueba de IFI requiere de equipo caro y de personal entrenado con experiencia para ejecutar la prueba e interpretar los resultados. Por otro lado ELISA tiene características óptimas que la hacen un candidato a ser incluido en la batería de pruebas serodiagnósticas, para la enfermedad de Chagas y podría sustituir a alguna de las antes mencionadas.

ELISA modificado, descrito aquí, es similar al que han estandarizado para diagnóstico de la enfermedad de Chagas[22,28]. Las modificaciones incorporadas al ELISA original, incluyen el pretratamiento con luz UV de las placas de poliestireno, procedimiento que mejora la unión del antígeno a la fase sólida, con lo cual se logra una mayor sensibilidad Otra modificación fue la formalinización del antígeno soluble, con bajas concentraciones del reactivo, con el propósito de estabilizar los antígenos, sin modificar su antigenicidad y permitiendo además conservarlos por un tiempo mayor, que en las condiciones sin tratamiento. Además en la estandarización de ésta técnica, se usaron antígenos obtenidos de cepas prevalentes mexicanas y sueros de pacientes de enfermedad de Chagas y de individuos sanos de zonas hiperendémicas, eliminando de esta forma diferencias en cepas locales y variaciones en la respuesta inmune, asociada a antecedentes étnicos de los habitantes de áreas endémicas. Como se puede observar en la tabla 1, la sensibilidad mayor en el grupo chagásicos clínicos sin tratamiento (CCh) lo encontramos en la IgM, determinada por ELISA 100%, la presencia de IgM, probablemente se deba a que son pacientes con infecciones recientes. Para el grupo de cardiópatas tratados crónicos (Cht) el porcentaje de positividad es bajo en todas las pruebas, a pesar de esto, pacientes en un principio tenían un serodiagnóstico positivo (HAI e IFI), una explicación a la baja positividad, pudiera ser el resultado del tratamiento específico y efectivo al que están sometidos, logrando con ello la eliminación del parásito, y al no haber estímulo antigénico la respuesta inmune baja. Sin embargo llama la atención en este grupo el porcentaje de positividad tan alto, la concordancia entre IgM-IgG en este mismo grupo fue del 83%. Una explicación a la presencia de IgM en estos enfermos crónicos, pudiera extrapolarse a lo que Tarlenton *et al* [30] y Rowland [6], encontraron al medir la respuesta específica de anticuerpos al parásito, en un modelo murino. Sus resultados indican que en los ratones C57BL/6 infectados con ***Trypanosoma cruzi***, la respuesta específica de IgM anti-***Trypanosoma cruzi*** alcanza niveles altos y estos permanecen así por un período de tiempo largo, 180 días (Tarlenton) y de hasta 300 días después de la infección (Rowland), cuando lo que normalmente se espera observar, es que la respuesta de IgM antígeno específica, durante un simple estímulo antigénico, genera un pico dentro de la primera semana después de la exposición para después descender. En las infecciones crónicas de algunos pacientes con enfermedad de Chagas, pudieran conducir el comportamiento de tolerancia y autoinmunidad. En tal situación nuevos autoanticuerpos del tipo IgM pudieran desarrollarse en el paciente con cardiopatía crónica y presentarían nuevos idiotipos, expresados en

los autoanticuerpos que pudieran tener especificidad tanto para antígenos del parásito como para ciertos antígenos del huésped Como ocurrió en el trabajo de Avila Reis *et al*[4], quienes obtuvieron anticuerpos anti-idiotipo, inmunizando un conejo con anticuerpos anti-epimastigotes obtenidos de dos fuentes de pacientes cardiópatas crónicos (IdCp) y de pacientes asintomáticos con enfermedad de Chagas indeterminado (IdIp). Sus resultados nos muestran, que los anticuerpos anti-idiotipo IdIp y el IdCp no reaccionaron con tejidos cardíacos ni humanos ni de ratón, pero ambas preparaciones de anticuerpos fueron positivas contra el parásito ***Trypanosoma cruzi*** observado en corazón murino.

La positividad alta observada, en el grupo de sueros de individuos de áreas hiperendémicas (H), es de un 66.6% para los isotipos IgM e IgG y pudiera explicarse por la presencia de pacientes asintomáticos indeterminados de enfermedad de Chagas.

En la tabla 2 se observa que las concordancias entre los pares de pruebas cambian de acuerdo al grupo donde se presentan. Por ejemplo, el par IgM-IgG en el grupo chagásicos crónicos sin tratamiento (Chst) es del 83%. Mientras que en los grupos chagásicos crónicos con tratamiento (Cht) e individuos asintomáticos de áreas hiperendémicas (H) es de 64 7% y 66.6% respectivamente, esto probablemente se deba a que en el grupo Chst, estos individuos sufren infecciones recientes, no tratados y en esta situación los niveles de IgM e IgG, en el humano, se eleven simultáneamente. Israelsky *et al*[31]. Mientras que en el grupo Cht tenemos a los sujetos con cardiopatías crónicas, en el grupo H con seropositividad, seguramente están los asintomáticos crónicos con enfermedad de Chagas indeterminada y en ambos estados de cronicidad tenemos que se presentan alteraciones de las clases y subclases de inmunoglobulinas.

En la tabla 3 tenemos en todos los pares de grupos clínicos para IgA e IFI que no existe diferencia significativa debido a que los niveles de anticuerpos son muy bajos para IgA y en IFI por ser una técnica poco sensible y no detectar anticuerpos en algunos casos donde si esta presente la infección. En el caso de la comparación de individuos sanos y testigos negativos esperabamos que no existiera diferencia en ninguno de los casos pero dentro de los individuos sanos se encontró que en tres casos existían individuos infectados con ***Trypanosoma cruzi*** , causando diferencia en IgG e IgM Hay que recordar que estos individuos viven en áreas endémicas.

En cardiopatías tratados-clínicamente chagásico y cardiópatas tratados-seropositivos se encontró diferencia en IgM e IgG por el estado de desarrollo de la enfermedad en clínicamente chagásicos y seropositivos que va en aumento contrastando con el tratamiento de los cardiópatas en donde en la mayoría de los casos van disminuyendo los anticuerpos. En HAI, IFI e IgA para estos dos pares no existe significancia por que para IgA los niveles son bajos para los tres grupos clínicos y en el caso de HAI e IFI los nivesles de anticuerpos son altos, donde se encuentra positividad para los tres métodos.

En el par de grupos cardiópatas tratados- individuos sanos, existe diferencia significativa de IgM e IgG, por la sensibilidad de los métodos y no existe diferencia en IgA, HAI e IFI por que en individuos sanos existen individuos infectados con ***Trypanosoma cruzi***. En cardiópatas

tratados-testigos negativos existe diferencia en IgG y HAI y esto es por que los cardiópatas no se han negativizado del todo y los niveles de anticuerpos para IgG y HAI en cardiópatas son mayores.

Para *clínicamente chagásicos*- seropositivos no existe significancia en ninguno por que los niveles de anticuerpos son altos para todos los métodos.

En clínicamente chagásicos-individuos sanos sólo existe diferencia en HAI por que, el número de individuos sanos en el que no se detectan anticuerpos es alto y en los clínicamente chágasicos los anticuerpos con HAI se encuentran elevados en todos los casos.

En clínicamente chágasicos-testigos negativos existe diferencia en IgM, IgG y HAI Esta diferencia se esperaba que ocurriera en todos los métodos pero, no se dá por que, la sensibilidad de ELISA es muy alta pero no específica.

Para seropositivos-individuos sanos existe diferencia significativa sólo en HAI por que, en individuos sanos sólo se detectan anticuerpos en cuatro casos y en seropositivos se detectan en todos los casos siendo un grupo más pequeño que el de individuos sanos

En seropositivos-testigos negativos ocurre lo mismo que en clínicamente chagásicos-testigos negativos

En individuos sanos-testigos negativos existe significancia en IgM, IgG y HAI y no existe diferencia en IgA e IFI por que en IFI para individuos sanos no se detectan anticuerpos en la mayoría de ellos. Y en IgA los niveles de anticuerpos son bajos para ambos por la sensibilidad que se observa en los testigos negativos en ELISA

Evaluando los métodos observamos que entre HAI-IFI no existe diferencia significativa para todos los grupos Y si existe diferencia entre los pares de inmunoglobulinas para ELISA en todos los grupos clínicos, confirmándose que las inmunoglobulinas aparecen en diferentes momentos de la enfermedad y en catidades diferentes.

CONCLUSIONES

La infección en humanos no esta resuelta y en la ausencia de terapia con fármacos, la presencia de anticuerpos contra el parásito es evidencia de una infección en marcha. Como no existen registros de casos de infecciones resueltas por sí mismos, deben seguirse evaluando los medicamentos empleados mediante la cuantificación de inmunoglobulinas. Con los resultados obtenidos, mostrados en tablas, podemos concluir que la cura con fármacos es posible. Debido a que en cardiópatas tratados el nivel de inmunoglobulinas se negativizó en la mayoría de los casos a diferencia de los clínicamente chagásicos en donde los niveles de inmunoglobulinas fueron altos según HAI e IFI. En los casos cuando los fármacos no conducen a una cura por no presentarse serología negativa, esto nos lleva a una pérdida de anticuerpos reactivos a un antígeno de superficie de la célula del tripomastigote. Estos anticuerpos destructores mediados por complemento-dependiente, dan inmunofluorescencia con tripomastigotes viables y esta presencia correlaciona con la infección a tal grado que ha sido propuesto para ser utilizado como un marcador para confirmar la efectividad de la terapia con fármacos.

En la infección con ***Trypanosoma cruzi*** entre 20 y 40 días después del ataque se produce un aumento en la respuesta inicialmente como IgM y más tarde como IgG Un número de diferentes ensayos han sido utilizados para detectar estos anticuerpos en este caso inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta y ELISA (Enzime-Linked inmunosorbent). Estas pruebas tienen varias ventajas y desventajas basadas, entre otras cosas en, tiempo, sensibilidad y situaciones apropiadas de terreno, pero todas ellas sufren de la misma desventaja de ser incapaz de detectar la infección en los primeros días cuando la respuesta inmune humoral no ha sido todavía aumentada Otra gran desventaja son los falsos positivos causados por la reacción cruzada con otros parásitos, particularmente ***Leishmania sp***. Por lo que se debe investigar más sobre pruebas de clonación genética para aumentar la especificidad, ampliar los limites de detección y discriminar otros agentes infecciosos.

Los resultados de ELISA encontrados nos demostraron que es muy sensible pero poco especifica por que determinó anticuerpos inclusive en testigos negativos. Esta sensibilidad es de gran utilidad por que nos permite detectar un mayor número de pacientes con infecciones y después las técnicas de HAI e IFI confirmarán la presencia o ausencia de la enfermedad de Chagas Solucionando el problema de diagnosticar la enfermedad en la fase aguda en los casos asintomáticos en áreas hiperendémicas o en sospecha de individuos de alto riesgo. Con las modificaciones realizadas en el método para fijar y estabilizar el antígeno se aumentó la sensibilidad como se observa en la tabla de resultados de controles negativos. Se sugiere que se evalúe este parámetro, determinando con estas mismas metodologías un grupo de pacientes con leishmaniasis o de tripanosomiasis africana para analizar la especificidad

RECOMENDACIONES

La detección directa del parásito en sangre es posible en la fase aguda de la enfermedad, por examinación de gotas de sangre. La sensibilidad de este método puede ser incrementada por concentración del parásito a lo largo con la lisis de células rojas y blancas o por enriquecimiento usando un gradiente de densidad por centrifugación. Niveles inferiores del parásito en la sangre durante la fase crónica de la enfermedad hace la detección directa del parásito más difícil y alternativas tales como xenodiagnóstico y hemocultivo son necesarios El xenodiagnóstico es efectuado por alimentación natural del vector triatómino en humanos y examinando al insecto más tarde por la presencia de los parásitos en la parte posterior del intestino Claramente este proceso tiene la desventaja del tiempo y toma de 20 a 60 días, el suceso probable puede también ser bajo. Igualmente seguido por las dificultades asociadas con estas pruebas, la identificación definitiva por criterios morfológicos de ***Trypanosoma cruzi*** puede ser una ventaja La sensibilidad también pude ser incrementada con el uso de insectos más grandes, tales como ***Dipetalogaster maximus***, el cual puede tomar hasta 5 mL de sangre en una sola picadura.

Una alternativa para el xenodiagnóstico es el hemocultivo, donde la sangre para la prueba es incubada en un medio apropiado y el crecimiento potencial del parásito en la forma epimastigote es monitoreado. En el período de incubación el tiempo medio es otra vez necesario para alcanzar un resultado y la contaminación puede ser un problema. Técnicas modernas usando pruebas de DNA deben permitir la detección de parásitos rápida y directa en la sangre. Reportes de detección de parásitos usando DNA total han sido realizados y el más prometedor acceso usando pruebas clonadas a partir de secuencias repetidas de DNA, en el cinetoplasto aumentan los límites de detección, grado de especificidad y discriminación de otros agentes infecciosos.

Anticuerpos monoclonales pueden ser usados como las bases en pruebas serológicas, para proporcionar especificidad y discriminar entre ***Trypanosoma cruzi***, ***Leishmania sp*** y ***Trypanosoma rangeli*** Alternativamente proteínas purificadas de ***Trypanosoma cruzi*** pueden ser utilizadas para proporcionar más pruebas específicas

REFERENCIAS

1. Kenneth S Inmunology and Molecular Biology of Parasitic Infections. 1993; 213-228.
2. Kym C. Jacobs, Ronald G.Binding of complement to trypomastigotes of a Brazil strain of ***Trypanosom cruzi***. J.Parasitol 1992; 78: 697-704.
3 Eloisa B, Vilma S.T. Autoantibodies in Chagas disease.The Journal of.Inmunology 1993, 150: 3917-3923.
4. d'Avila Reis D, Gazzinelli RT, Gazzinelli G, Colley DG Antibodies to ***Trypanosoma cruzi*** express idiotypic Patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas disease The Journal of Inmunology 1993, 150: 1611-1618
5 Norris KA, Bradt B, Cooper NR. Characterization of a ***Trypanosoma cruzi*** and genetic similarities to the human complement regulatory protein, Decay-Accelerating Factor. The Journal of Inmunology 1989; 91. 2240-2247.
6. Rowland EC, Mikhail KS, and McCormick TS. Isotype determination of anti- ***Trypanosoma cruzi*** antibody in murine Chagas disease. J Parasitol 1992; 78: 557-561.
7 Brener Z Biology of ***Trypanosoma cruzi***. Ann Rev Microbiol 1973, 27: 347.
8. Almeida IC, Milani SR, Gorin PAJ and Travassos LR. Complement-mediated lysis of ***Trypanosoma cruzi*** trypomastigotes by human anti-α-galactosyl antibodies. The Journal of Inmunology 1991, 1467: 2394-2340.
9 Mikhail KS, Rowland EC. ***Trypanosoma cruzi*** antigen-specific antibody response in immunized mice during acute and chronic infection. J. Parasitol 1990; 76. 690-697.
10. Dimock KA, Davis CD and Raymond EK. Changes in humoral responses to ***Trypanosoma cruzi*** during the course of infection in mice held at elevated temperature. J. Parasitol 1992; 78: 687-696
11 Clinton B, Ortiz-Ortiz L, Garcia W, Martínez T, Capin R. ***Trypanosoma cruzi***: early immune response in infected mice. Exp. Parasitol 1975, 37: 417-425
12. Cuunningham DS, Kuhn RE, Rowland EC Suppressión of humoral responses during ***Trypanosoma cruzi*** infections in mice. Infect. Immun 1978; 22: 155-160.
13. Hayes MM, Kierszenbaum F. Experimental Chagas disease: Kinetics of lymphocytes responses and immunological control of the transition from acute to chronic ***Trypanosoma cruzi*** infection. Infect. Immun. 1981; 31· 1117-1124.
14. Kierszenbaum F, Hayes MM. Evaluation of lymphocyte responsiveness to polyclonal activator during acute and chronic experimental ***Trypanosoma cruzi*** infection Am. J. Trop. Med. Hyg 1979, 29. 708-710.
15 Montafar OMB. Musatti CC, Mendes E, Mendes NF. Cellular immunity in chronic Chagas disease J Clin Microbiol. 1977; 5: 401-404.

16. Ramos C, Schadtler-Siwon, Ortiz-Ortiz L. Suppressor cells present in the spleen of ***Trypanosoma cruzi*** infected mice. J. Immunol. 1979; 122: 1243-1247.
17. Reed SG, Inverso JA, Roters SB. Heterologous antibody responses in mice with chronic ***Trypanosoma cruzi*** *infection: Depressed T. helper function restores with supernatants* containing interleukin 2. J. Immunol. 1984; 133: 1558.
18. Teixeira ARL, Teixeira G, Macedo V, Prata A Acquired cellmediate immunodeppressión in acute Chagas disease. J. Clin. Invest. 1978; 62: 1132-1141.
19. Piuvezam MR, Russo DM, Burns JM, Skeiky YA,Grabstein KH, Reed SG. Characterization of responses of normal human T cell to ***Trypanosoma cruzi*** antigens. J Immunol. 1993; 150: 916-924.
20. Jeng GCK, Kierszenbaum F. Alteratios in production of inmunoglobulin classes and subclasses during experimental ***Trypanosoma cruzi*** infection. Infect. Immun. 1984; 43. 768-770
21 Castellani O, et al. Differentiation of ***Trypanosoma cruzi*** in culture. J Of Protozoology 1967; 14. 447-451.
22 Camargo ME. *Fluorescent antibody test for the serodisgnosis of American* trypanosomiasis, technical modification employing preserved culture forms of ***Trypanosoma cruzi*** in a slide test. Rev. Inst. Med Trop. Sao Paulo 1966; 8: 227-234.
23. Lowry OH. Protein measurement with the folin phenol reagent J Biol. Chem. 1951; 193: 265-275.
24 Hoshino-Shimizu S. et al. A study on the reproductibility of stable lyophilized reagent for the Chagas disease hemagglutination test: Proposals for quality control analysis. Rev. Ins. Med. Trop Sao Paulo 1982; 24: 63-68.
25 Araujo FG, Guptill D. Use of antigen preparation of the amastigote stage of ***Trypanosoma cruzi*** in the serology of Chagas disease. Am. J. Trop. Med. Hyg 1984; 33: 362-371.
26. Boudet F. et al. UV treated polystyrene microtitre for use in an ELISA to measure antibodies *against synthetic peptides. J Immunol. Methos.* 1991, 142: 73-82.
27. Voller A et al. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas disease. Lancet 1975; 1· 426-428.
28. Antony RL. et al. Use of micro-ELISA for cuantitating antibody to ***Trypanosoma cruzi*** and ***Trypanosoma rangeli*** . Am. J. Trop. Med. Hyg. 1979; 28: 969-973.
29. Magnaval JF. et al Screening for Chagas disease by immunoenzymology: Comparison of ELISA with immunofluorescence and indirect hemagglutination in 976 blood donors. Rev Fr. Transf. Immunohematol. 1985; 201: 33.
30. Tarlenton RL, Kuhn RE. Chagas in cell population and immunoglobulin producing cell in the spleens of mice infected with ***Trypanosoma cruzi***: Correlations with parasite-specific antibody response Cell. Immunol. 1983; 80: 392-404.
31 Israelsky DM, Sadler R, Araujo FG. Antibody responses and antigen recognition in human infection with ***Trypanosoma cruzi***. Am J. Trop. Med Hyg. 1988; 39: 445-455.

32 Levine RA, Vardlaw SC Detection of haemoparasites using Quantitative Buffy Coat Análisis Tubes. Parasitology Today 1989; 5(4): 133-138.
33 Petray P, Bornadello N. Evaluación del método de ELISA para detección de antígenos y complejos inmunes circulantes de ***Trypanosoma cruzi*** a través de un estudio de campo en una zona endémica de Argentina Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 1992: 141-147.
34. Velasco CA. et al. La enfermedad de Chagas: una revisión historica suscita y parcial de lo que ocurre en México y en el mundo. Salud Pública Méxicana 1991; 8: 20-50
35. Data on file (1988) Organon Teknika B.V. Boxtel, Holland
36 Breniere SF, Carrasco R. Comparison of immunological test for serodiagnosis of Chagas disease in Bolivian patients Trop Geogr. Med. Sao Paulo 1985: 37(3):231-8.