

2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA



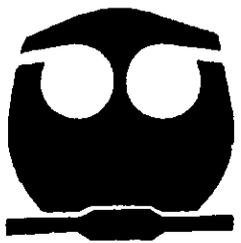
EXAMENES GENERALES
FACULTAD DE QUIMICA

**PAPEL DE LAS DISTINTAS SUBCLASES DE
ANTICUERPOS EN LA INFECCION A MACROFAGOS
POR *Trypanosoma cruzi* in vitro.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
DOLORES AGUILAR CAZARES

24343



MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

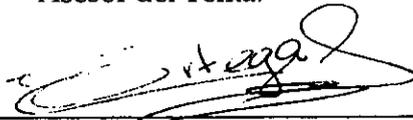
Jurado asignado:

Presidente	Prof. Saturnino de Leon Chapa
Secretario	Prof. Abel Gutierrez Ramos
Vocal	Prof. Enrique Ortega Soto
1 er Suplente	Prof. Rosana Pelayo Camacho
2o Suplente	Prof. Jorge Fernando Paniagua Solís

Sitio donde se desarrolló el tema:

Instituto de Investigaciones Biomédicas. Departamento de Inmunología.

Asesor del Tema:



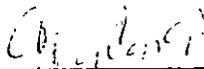
Dr. Enrique Ortega Soto

Supervisor Técnico:



Dra. Bertha Espinoza

Sustentante:



Dolores Aguilar Cázares

Este trabajo se desarrolló en los laboratorios de la Dra. Bertha Espinoza y del Dr. Enrique Ortega, del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Este trabajo se realizó gracias a donativos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (UNAM, Proyecto IN204696) y del CONACyT (Proyectos 3154-N9607 y 2795IM).

Quiero dedicar este trabajo:

A mi mamá y a mi papá; que han sido los mejores padres del mundo. Gracias por todo el amor que me han dado, por todo su apoyo y sobre todo por la confianza que han tenido en mí.

A mis hermanos que también me han dado todo su apoyo, me han ayudado en todo, me han hecho reír y a los cuales quiero mucho.

A mi esposo de manera muy, muy especial, por que siempre estuvo conmigo durante todo este tiempo, y tuvo mucha paciencia, tolerancia, ternura y siempre supo que yo llegaría hasta aquí. Te amo.

A todos mis familiares y amigos.

Le agradezco mucho al Dr. Enrique Ortega y a la Dra. Bertha Espinoza por toda la paciencia que tuvieron conmigo.

También quiero darle las gracias al Dr. José Sullivan López, por la paciencia que ahora el tiene conmigo.

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCION	1
<i>I.1 Objetivo general</i>	2
<i>I.2 Objetivos particulares</i>	2
II. ANTECEDENTES	3
<i>II.1 Características biológicas de Trypanosoma cruzi.</i>	3
II.1.1 Formas morfológicas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	3
II.1.2 Estructura celular de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
La superficie celular de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	5
Organelos citoplasmáticos.	8
II.1.3 La invasión por <i>Trypanosoma cruzi</i> a la célula hospedera.	8
<i>II.2. Ciclo de Vida de Trypanosoma cruzi</i>	10
<i>II.3 Enfermedad de Chagas</i>	12
II.3.1 Mecanismos de transmisión	12
II.3.2 Presencia de <i>Trypanosoma cruzi</i> en México.	14
II.3.3 Características de la enfermedad de Chagas.	16
II.3.4 Patología de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
<i>II.4. Inmunología de la infección por Trypanosoma cruzi.</i>	20
II.4.1 Los macrófagos y la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> .	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
<i>III.1 Obtención de tripomastigotes.</i>	28
III.1.1 Purificación de tripomastigotes	29
III.1.2 Purificación de tripomastigotes por cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa.	30
<i>III.2 Obtención de tripomastigotes de cultivo celular.</i>	31
<i>III.3. Ensayo de infección.</i>	32
III.3.1 Tratamiento de los portaobjetos usados en el ensayo de infección.	32
III.3.2 Sensibilización de tripomastigotes	34
III.3.3 Oponización de tripomastigotes.	34
<i>III.4 Tinción y observación de las preparaciones.</i>	37
IV. RESULTADOS	38
<i>IV.1 Efecto de la oponización de tripomastigotes de Trypanosoma cruzi sobre la infección de macrófagos J774.</i>	39

<i>IV.2 Efecto de la opsonización sobre la infección de células VERO.</i>	43
<i>IV.3 Comparación de los efectos de la opsonización sobre la infección de células VERO y Macrófagos.</i>	45
<i>IV.4 Número de amastigotes por célula infectada.</i>	49
V. DISCUSION.	53
VI. CONCLUSIONES	58
VII. BIBLIOGRAFÍA	59

I. INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es causada por la infección de un protozooario hemoflagelado: *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad afecta a 18 millones de personas en centroamérica y sudamérica. Es una zoonosis parasitaria que constituye un importante problema de salud pública.

Se sabe que la infección por *Trypanosoma cruzi* provoca una inmunosupresión en el hospedero, por lo cual, las células del sistema inmune son ampliamente estudiadas en relación a esta enfermedad. Una célula que participa de manera importante en los mecanismos inmunológicos de defensa es el macrófago.

La hipótesis de este trabajo es que existirá un incremento en la infección a los macrófagos cuando se infecten con tripomastigotes opsonizados con distintas subclases del anticuerpo IgG, en comparación con los fibroblastos, los cuales tendrán un menor grado de infección, debido a que los macrófagos poseen receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas y los fibroblastos no tienen este receptor.

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

I.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la opsonización en la infección de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* a macrófagos murinos que expresan receptores para IgG (FcγRs)

I.2 Objetivos particulares

- Establecer un sistema de infección "in vitro" que permita estudiar cuantitativamente la infección de tripomastigotes de la cepa QUERETARO, a las células de la línea de macrófagos murinos J774.
- Opsonizar tripomastigotes con anticuerpos monoclonales murinos pertenecientes a distintos isotipos de IgG, sin pérdida de viabilidad.
- Determinar si la opsonización de los tripomastigotes con anticuerpos de distintos isotipos tiene algún efecto en la infección de macrófagos murinos de la línea celular J774.
- Comparar el efecto de la opsonización sobre la infección de células que expresan receptores para IgG (macrófagos J774) y células que no los expresan (células VERO).

II. ANTECEDENTES

El protozoario *Trypanosoma cruzi* fue descrito por primera vez, por Carlos Chagas en 1909. Este descubrimiento dio inicio al estudio de la enfermedad de Chagas de la cual se identificó primero el agente etiológico, después el vector, los reservorios y posteriormente se dilucidó la etiología de la enfermedad (Lewinsohn R, 1979). El *Trypanosoma cruzi* es un parásito flagelado provisto de membrana, con un ciclo de vida muy complejo y a lo largo del cual sufre varias transformaciones, tanto en la infección al huésped vertebrado como en el invertebrado.

II.1 Características biológicas de *Trypanosoma cruzi*.

II.1.1 Formas morfológicas de *Trypanosoma cruzi*.

Los protozoarios de la familia *Trypanosomatidea* muestran distintas formas durante el ciclo de vida, las cuales pueden ser identificadas por microscopía de luz en preparaciones teñidas con Giemsa. La definición de estas formas se basa en: a) La forma general de la célula, b) La posición de cinetoplasto en relación con el núcleo, y c) la región por la cual emerge el flagelo del paquete flagelar (Hoare C y col., 1966).

De acuerdo con ese criterio las siguientes formas han sido identificadas: tripomastigotes, epimastigotes, esferomastigotes (amastigote, micromastigote), promastigote, paramastigote, opistomastigote y choanomastigote. En el caso de *Trypanosoma cruzi*, se reconocen las siguientes formas (figura 1) :

Amastigotes. De acuerdo a la nomenclatura propuesta por Hoare y Wallace la forma intracelular multiplicativa de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* es llamada amastigote. Se ha observado que los amastigotes de *Trypanosoma cruzi* poseen un flagelo corto (Meyer y De Souza, 1976).

Epimastigotes. Es la forma que se observa en la fase logarítmica de la curva de crecimiento de *Trypanosoma cruzi* cuando se mantiene en medios acelulares. Los epimastigotes también se encuentran en la fase final del ciclo cuando los amastigotes son transformados en tripomastigotes. Miden de 20-40 μm de longitud. El cinetoplasto está localizado en la parte anterior con respecto al núcleo. Los epimastigotes son capaces de dividirse.

Tripomastigotes. Estas formas pueden ser observadas en la sangre de vertebrados infectados y en el intestino posterior, heces y orina del hospedero invertebrado (vector). Miden aproximadamente 25 μm de largo y 2 μm de diámetro. El cinetoplasto está localizado en la parte posterior del núcleo. No es capaz de dividirse.

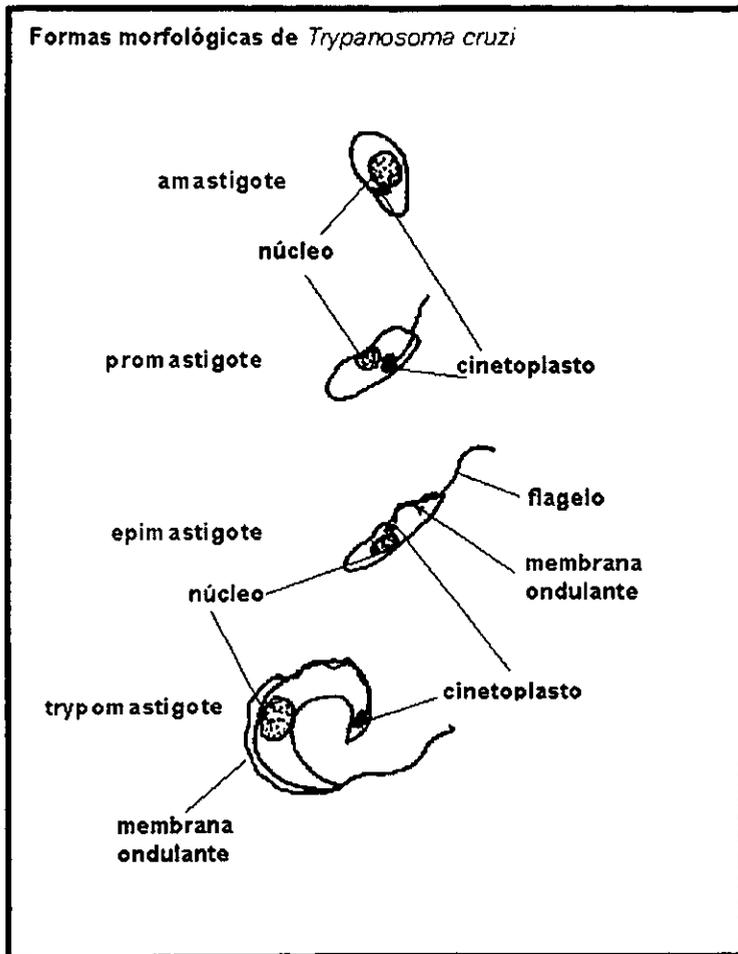


Figura 1. Formas morfológicas de *Trypanosoma cruzi*

II.1.2 Estructura celular de *Trypanosoma cruzi*

La superficie celular de *Trypanosoma cruzi*.

La superficie celular de *Trypanosoma cruzi* es muy importante por el papel que juega en el proceso de infección por el parásito a la célula hospedera. Consta de dos estructuras bien definidas: la membrana plasmática y el glicocalix. La

membrana plasmática esta compuesta de proteínas, lípidos y carbohidratos. Los carbohidratos de la superficie de *Trypanosoma cruzi* son determinantes en los procesos de reconocimiento, interacción célula-célula y penetración a la célula hospedera y están presentes en todas las fases del ciclo de el *Trypanosoma cruzi* (Meyer y De Souza 1976). Se ha propuesto que están involucrados en la unión y penetración de la célula hospedera. También le proporcionan al parásito protección en contra de la fagocitosis y participan en el control de la diferenciación morfológica. Estudios hechos con lectinas, revelan que hay diferencias en los glicoconjugados de cada forma del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*; es decir, el parásito exhibe distintos carbohidratos en cada fase del ciclo de vida.

La presencia de carbohidratos es esencial para los métodos de aislamiento y purificación de algunos antígenos por medio de cromatografía de afinidad, usando lectinas, anticuerpos, etc.

El *Trypanosoma cruzi* posee en la membrana plasmática distintos sitios con densidad de carga negativa que varían con respecto a sus distintas formas morfológicas (Martínez-Palomo y col., 1976). Datos obtenidos en estudios hechos con partículas de hierro, muestran diferencias entre la superficie de epimastigotes y tripomastigotes. Las partículas positivas se unen más fuertemente a los tripomastigotes que a los epimastigotes, lo que sugiere que los tripomastigotes tienen una mayor densidad de carga negativa en la superficie (De Souza, y col., 1977). Los estudios de determinación de carga neta hecha por electroforesis (EPM) de epimastigotes y tripomastigotes obtenidos de cultivos acelulares, así como de tripomastigotes sanguíneos, indican que todas las formas presentan carga negativa aunque de distinta magnitud.

Durante el desarrollo de *Trypanosoma cruzi* en cultivos axénicos, se observa un aumento gradual en su carga neta negativa, la EPM indica una carga de superficie de $-0.52 \mu\text{m sec}^{-1} \text{V}^{-1} \text{cm}$ para epimastigotes y $-1.14 \mu\text{m sec}^{-1} \text{V}^{-1} \text{cm}$ para tripomastigotes sanguíneos.

Los tripomastigotes sanguíneos pueden separarse del resto de las células sanguíneas por cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-celulosa, gracias a la diferencia en la carga de superficie entre las células sanguíneas y los tripomastigotes. La carga de un eritrocito es de $-1.07 \text{mm sec}^{-1} \text{V}^{-1} \text{cm}$ y de *Trypanosoma cruzi* $-1.14 \mu\text{m sec}^{-1} \text{V}^{-1} \text{cm}$ (Lanham, Godfrey, 1970).

Por otra parte, el glicocalix esta compuesto de material filamentoso localizado en la cara exterior de la membrana plasmática. El glicocalix esta presente en todos los estados del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* y es un órgano celular único de los tripanosomátidos. El glicocalix es una estructura en forma de microtúbulos, que están conectados a la membrana plasmática, lo que le confiere rigidez al parásito. En experimentos hechos con animales infectados con *Trypanosoma cruzi* se ha observado que se producen anticuerpos anti-tubulina, los cuales pueden mostrar reacción cruzada con la tubulina del hospedero; es interesante determinar si estos anticuerpos participan en la patogenia de la enfermedad de Chagas. Los microtúbulos están localizados en toda la membrana plasmática, excepto en el área por donde emerge el flagelo (paquete flagelar).

Organelos citoplasmáticos.

Muchos organelos característicos de eucariotes superiores se encuentran en *Trypanosoma cruzi*. El parásito contiene mitocondrias, retículo endoplásmico, ribosomas, peroxisomas, lisosomas y aparato de Golgi. La función de los organelos es aparentemente similar a la de los mamíferos. El *Trypanosoma cruzi* realiza glicólisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, oxidación de prolina, etc.

Una estructura especializada presente en el *Trypanosoma cruzi* es el cinetoplasto, el cual es un complejo formado por fibras de DNA en la matriz mitocondrial. Cambios en la posición del cinetoplasto, con relación al núcleo, definen los estados morfológicos de *Trypanosoma cruzi*. La digestión del cinetoplasto con endonucleasas de restricción, seguido de un análisis electroforético, es usado en la caracterización de cepas y clonas de *Trypanosoma cruzi*.

Es importante identificar las posibles diferencias entre las vías metabólicas y la composición de productos endógenos de *Trypanosoma cruzi* con respecto a la célula hospedera, ya que éstas pueden proveer una estrategia para el control de la infección. Esto puede ser posible encontrando drogas que inhiban las enzimas del parásito sin afectar las enzimas del hospedero.

II.1.3 La invasión por *Trypanosoma cruzi* a la célula hospedera.

La entrada de *Trypanosoma cruzi* a la célula hospedera es un proceso que involucra una gran variedad de factores. Se ha observado que cuando la membrana del parásito y/o la célula hospedera son tratados con oxidantes,

lectinas o enzimas (proteasas, glicosidasas, y fosfolipasas) se puede alterar la eficiencia de la asociación parásito-célula hospedera in vitro, lo cual resalta la importancia de las moléculas de superficie del *Trypanosoma cruzi*. Se ha sugerido que entre las moléculas importantes en la infección, están los receptores de fibronectina que son moléculas con un peso molecular de 85 KD y que se han aislado de tripomastigotes. Los anticuerpos anti-receptores de fibronectina inhiben la infección de células por *Trypanosoma cruzi*, mientras que la adición de fibronectina incrementa la internalización de tripomatigotes a la célula hospedera. Esto sugiere que la fibronectina actúa de puente entre las dos células (Ouaissi y col 1986).

Hay evidencia de que la neuraminidasa presente en la superficie de *Trypanosoma cruzi* controla la infección por un mecanismo negativo, ya que la adición de anticuerpos antineuraminidasa aumentan la infección. De igual modo la lipoproteína HDL (lipoproteína de alta densidad), un inhibidor específico de la neuraminidasa de *Trypanosoma cruzi*, aumenta la infección. Se ha postulado también que la fosfolipasa A₂ esta involucrada en el proceso de infección. Por otra parte la transalidasa de *Trypanosoma cruzi* facilita la entrada del tripomastigote a la célula, y ha sido demostrado que genera un epítipo llamado Ssp-3, que es requerido para la invasión (Ortega-Barria y col, 1991).

La invasión por *Trypanosoma cruzi* a la célula hospedera es un proceso activo el cual requiere gasto de energía metabólica por parte del parásito. No se ha reportado que la entrada del parásito este asociada, por parte de éste, con una explosión respiratoria lo que indica que el mecanismo no oxidativo del parásito puede ser importante para limitar la infección.

II.2.Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi*.

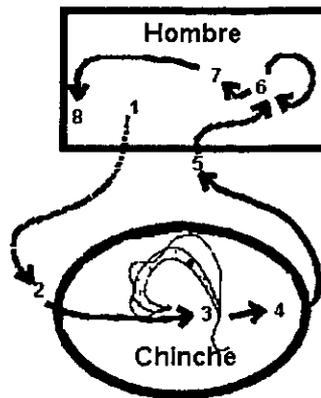
El ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* comienza cuando el insecto succiona sangre de un mamífero infectado y durante la succión los tripomastigotes sanguíneos del mamífero son ingeridos por el insecto. En el estómago del insecto muchos de los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes y en algunas formas redondas. En el intestino del insecto, los epimastigotes se dividen por fusión binaria y pueden unirse a las células intestinales. En el recto es donde una cierta proporción de epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos, los cuales son eliminados en las heces del insecto cuando se alimenta de un nuevo vertebrado y los parásitos son capaces de infectarlo.

Los tripomastigotes eliminados en las heces y la orina del hospedero invertebrado pueden introducirse por el orificio del piquete y penetrar en las células del animal vertebrado en donde se transforman en amastigotes. Los amastigotes se dividen rápidamente por fusión binaria y se convierten en tripomastigotes, los cuales son liberados al espacio extracelular (puede haber lisis celular) y penetran a otras células para iniciar un nuevo ciclo. Los tripomastigotes no se pueden dividir. Se ha observado que cuando los tripomastigotes entran en las células conservan cierta motilidad por un periodo de tiempo y puede haber colisiones con los organelos de la célula hospedera. Progresivamente asumen su forma redondeada. Después de algunas horas el flagelo se acorta, hasta 1 μm de largo. Durante la transformación tripomastigote-amastigote, hay una fase intermedia la cual es conocida como epimastigote, aunque difiere del epimastigote observado en cultivos axénicos.

Antes de la división, los amastigotes aumentan de tamaño y se alargan. El cinetoplasto y el núcleo se dividen, y se forma un nuevo flagelo. La división se lleva a cabo con la separación de los dos nuevos amastigotes a través de la región transversal de la célula de la cual se originan.

Después de la división (que dura aproximadamente 12 horas) se llevan a cabo otras divisiones y a los pocos días se encuentran varios parásitos en la célula. Cuando concluye el periodo de divisiones, el parásito se transforma en tripomastigote. El número de tripomastigotes producidos en una célula hospedera depende del volumen de la célula y probablemente de su estado metabólico. La transformación amastigote-tripomastigote tarda varias horas. Durante la transformación ocurren cambios en la organización de la célula, en la estructura del cinetoplasto y en la del flagelo. La población de parásitos intracelulares en una célula no está completamente sincronizada y por lo tanto en una misma célula se encuentran amastigotes, tripomastigotes y estados intermedios.

El ciclo se cierra cuando los tripomastigotes son liberados al torrente sanguíneo y un insecto se infecta con ellos al succionar sangre del hospedero (Figura 2).



Ciclo de vida de *T. cruzi*

- 1 Tripomastigote en sangre
- 2 Tripomastigotes ingeridos por un invertebrado
- 3 Se forman epimastigotes y se dividen en intestino
- 4 Formación de Tripomastigotes metacíclicos
- 5 Los tripomastigotes metacíclicos presentes en las heces del triatomino contaminan el sitio del piquete
- 6 Los amastigotes se dividen en los tejidos
- 7 Se forman tripomastigotes y reinfectan tejidos cercanos
- 8 Los tripomastigotes salen al torrente sanguíneo

Fig. 2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

II.3 Enfermedad de Chagas

II.3.1 Mecanismos de Transmisión

Los hospederos invertebrados de *Trypanosoma cruzi* son insectos de la familia Hemiptera y Reduvidae entre los cuales se encuentran *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *Pastronylus megistus*, y otros (Figura 3). El mecanismo natural de transmisión de *Trypanosoma cruzi* es el piquete de la chinche. La asociación de triatominos con *Trypanosoma cruzi* y mamíferos silvestres se había establecido en su nido natural por lo que la enfermedad era estrictamente una zoonosis que involucraba triatominos y mamíferos silvestres en su

ambiente natural, del cual los humanos y animales domésticos se encontraban ausentes. Como resultado del contacto entre el vector y el humano; que ocurre con la aparición de poblaciones rurales y modificaciones en los ecosistemas naturales, incluyendo cambios sociales intensos y continuas intervenciones humanas en el medio ambiente, la enfermedad se propagó hacia áreas peridomésticas y domésticas, convirtiendo a la Tripanosomiasis en una antrozoosis.



Figura 3. *Triatoma infestans*

El gran número de humanos y animales domésticos en zonas rurales conduce a un incremento en la densidad poblacional de triatomíneos y, por lo tanto hay una mayor transmisión del parásito a humanos. Se ha demostrado que un triatomino se reproduce mas si el acceso al mamífero es mayor y si existe una población relativamente pequeña de triatomíneos (Schofield 1988).

Además del piquete de la chinche, el *Trypanosoma cruzi* puede ser transmitido por vía congénita. Independientemente de que en algunos casos de posibles infecciones asumidas como congénitas, el recién nacido haya estado expuesto a triatomíneos infectados o que los recién nacidos pudieran haber ingerido leche materna infectada que puede ser el foco de infección, hay evidencia clara de

enfermedad de Chagas congénita. Hay incluso casos de enfermedad de Chagas urbana que son el resultado de la migración de mujeres fértiles infectadas con *Trypanosoma cruzi* de zonas rurales a la ciudad. La infección intrauterina de *Trypanosoma cruzi* puede producir aborto o nacimiento prematuro. Los recién nacidos pueden presentar los síntomas clínicos de la enfermedad de Chagas, o bien tener parasitemia y serología positiva sin presentar los síntomas (Schmunis, 1988).

También puede transmitirse por ingestión de carne parasitada semicruda o por bebidas contaminadas con materia fecal de triatomíneos.

Otro posible mecanismo de transmisión es a través de sangre infectada y órganos transplantados infectados, lo que constituye un problema de salud en zonas endémicas y no endémicas. En estos casos la parasitemia y la serología pueden ser negativas y presentarse la sintomatología, aunque en otros casos puede no presentarse síntoma alguno.

El *Trypanosoma cruzi* puede sobrevivir durante 3 semanas a 4° C en la sangre infectada, lo que hace necesario un estricto control de *Trypanosoma cruzi* en los bancos de sangre (De Tito y col 1980).

II.3.2 Presencia de *Trypanosoma cruzi* en México.

Como su nombre lo indica, la Tripanosomiasis americana es una enfermedad característica del continente americano. Se considera que la zona endémica abarca desde el norte de México hasta el sur de Argentina y Chile. Se estima que en las áreas endémicas hay de 16 a 18 millones de personas infectadas con *Trypanosoma cruzi* (Moncayo-Medina 1987), aunque Schofield considera que el

número de personas parasitadas asciende a más de 24 millones (Schofield 1985). Hasta 1992 se habían reportado 187 casos de enfermedad de Chagas en México (Tay y col., 1992).

La gran mayoría de los casos se han encontrado localizados en la vertiente del Océano Pacífico, donde los vectores triatominos se adaptan y proliferan en viviendas humanas construidas de materiales como la paja, el barro o palmas, que favorecen grietas y hendiduras en las cuales los triatominos pueden encontrar un ambiente propicio para su desarrollo. Sin embargo, es muy probable que la prevalencia de la parasitosis sea mucho mayor, ya que en algunas regiones del país como Oaxaca, Morelos, Puebla y Guerrero se han reportado índices de frecuencia de seropositividad muy elevados, lo que quizás señala una transmisión muy activa de *Trypanosoma cruzi*. Solo en 10 estados de la República Mexicana se han capturado reservorios infectados con *Trypanosoma cruzi*, pero muchos estados no tienen datos al respecto, ya que no se han hecho los estudios necesarios.

En México, la chinche es conocida como "talaje" en Veracruz, se le llama "bebrodum" en zapoteca, "pick" en maya, "turicata" en tarasco y "sarria" en huichol. En el estado de Nuevo León se conoce como "palotas" y en otras regiones como "picudas", "hociconas", "ahorcadoras" o "besucona". Es muy conocida, incluso en unas comunidades de Oaxaca la gente usa las heces de la chinche para curar heridas. En Nayarit las chinches son consideradas afrodisiacas y en Jalisco son ingeridas por los huicholes (Salazar y col 1988).

Se han encontrado triatominos infectados con *Trypanosoma cruzi*, desde los 0 hasta los 2200 m de altitud sobre el nivel del mar, por lo que es de suponer que la zona endémica abarca las dos terceras partes del territorio mexicano. En las

viviendas humanas se han encontrado todos los estadios del triatomino, desde el huevo hasta el adulto, siendo sus hábitos antropófilos. También se han colectado triatominos en el momento mismo de estar picando personas dormidas.

A pesar de que la mayoría de los autores sudamericanos afirman que el DDT no tiene efecto alguno contra los triatominos, se ha reportado que en las zonas palúdicas que fueron rociadas intensamente con DDT se produjo la extinción de la chinche, por lo que personas menores de 30 años no las conocen (Velasco y col 1992)

II.3.3 Características de la enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas presenta características complejas y diversas tanto en la infección humana como en la infección experimental en animales. En ambos casos presenta tres distintas fases en su desarrollo: una fase aguda, una indeterminada y una crónica.

La infección del mamífero ocurre de manera natural por el piquete de una chinche infectada, después se presenta la fase aguda de la enfermedad que es caracterizada por una alta parasitemia. Muy pocos individuos son susceptibles y mueren por la alta parasitemia, la mayoría sobreviven y presentan manifestaciones clínicas de la enfermedad después de muchos años. En otros individuos la infección cursa asintómicamente y mueren por causas distintas a la enfermedad de Chagas. En niños se puede presentar fiebre, vómito, inflamación de los ganglios linfáticos e incluso puede observarse miocarditis (Santos-Buch, 1979), así como lesiones en la piel conocidas como "Chagomas"

que aparecen en el sitio de entrada del parásito (piquete de la chinche). Si la lesión se localiza en el ojo y éste se inflama, se le conoce como signo de Romaña.

La alta parasitemia dura de 1 a 2 meses, y los individuos infectados entran a la fase indeterminada (Andrade, 1983). Esta fase es caracterizada por baja parasitemia y es asintomática. La respuesta inmune se encuentra disminuida, lo que permite la proliferación del parásito (Barousse y col, 1980). En esta fase algunos individuos pueden mostrar síntomas clínicos menores, como inflamación o fibrosis cardiaca.

La fase aguda y la fase indeterminada de la enfermedad de Chagas son relativamente asintomáticas y la mayoría de las manifestaciones serias de la infección por *Trypanosoma cruzi* ocurren mucho tiempo después del progreso de la enfermedad. Sin embargo, el daño al músculo ocurre en los períodos de alta parasitemia en sangre y es aquí donde comienza a generarse una respuesta autoinmune (Tkle y Dudson, 1989).

Los principales órganos que se ven afectados en la fase crónica de la enfermedad son el corazón y el tracto digestivo. La enfermedad cardiaca, que es más común en Brasil (Miles y col., 1981), provoca el aumento de tamaño del corazón. Las anormalidades en el electrocardiograma y la dilatación ventricular forman parte de un síndrome conocido como miocarditis chagásica. El daño digestivo involucra aperistalsis, megaesófago y megacolon.



Figura 4. Nido de amastigotes en músculo cardíaco.

Tanto la forma cardíaca como la digestiva, están asociadas con destrucción específica del nervio autónomo de los órganos afectados. Frecuentemente las células ganglionares son destruidas por acción de autoanticuerpos o por la infección de estas células con el parásito (figura 4).

II.3.4 Patología de la infección por *Trypanosoma cruzi*

Como se mencionó, existen tres fases en la enfermedad: aguda, indeterminada, y crónica. La fase aguda afecta principalmente a niños; al 50% de los niños infectados les surge un edema en los párpados, llamado signo de Romaña, relacionado con la puerta de entrada del parásito. El edema palpebral se acompaña de conjuntivitis y adenopatía regional; la queratitis es frecuente. En otros lugares de la cara o del cuerpo pueden presentarse lesiones cutáneas (chagomas) semejantes a forúnculos, acompañadas siempre por adenopatía regional, también relacionados con la entrada del parásito.

La hepatoesplenomegalia es común en las infecciones en niños. Los síntomas y signos de la enfermedad varían según el compromiso de los diferentes órganos. El síndrome febril puede estar acompañado de miocarditis, con

dilatación cardiaca, hipotensión y taquicardia. La agresión al sistema nervioso central puede manifestarse como encefalomielitis o meningoencefalitis. Hay casos en los que el aparato digestivo se ve alterado, con vómito y diarrea.

Aunque el parásito puede encontrarse en cualquier lugar del organismo, tiene cierta predilección por el sistema reticuloendotelial, el músculo esquelético o cardiaco y el sistema nervioso central; esto explica que las manifestaciones clínicas más importantes sean las de miocarditis o meningoencefalitis. La letalidad de la forma aguda es de 8% aproximadamente y ocurre sobre todo en niños con complicaciones cardiacas o del sistema nervioso central.

La fase indeterminada se caracteriza por serología positiva y/o xenodiagnóstico positivo, pero generalmente sin manifestaciones clínicas (cardiacas, digestivas o nerviosas) ni alteraciones electrocardiográficas o radiológicas. En las áreas endémicas esta forma se encuentra sobre todo en las tres primeras décadas de vida. En la autopsia de algunas personas en esta fase de la parasitosis pero que fallecen por otras causas, se han encontrado focos de miocarditis y disminución de neuronas del plexo parasimpático.

La forma crónica se presenta en un 10 a 30 % de los individuos infectados, en general de 10 a 15 años después de la fase aguda, y la cardiopatía chagásica es la forma más común. Después de las primeras manifestaciones, que consisten casi siempre en extrasístoles y precordialgias, mediante electrocardiograma se puede comprobar el bloqueo completo o incompleto de la rama derecha del haz de His. En esta etapa se encuentran signos de insuficiencia cardiaca y en las autopsias se observa la pared ventricular adelgazada y aneurismática. Muchas veces la fase crónica solo se expresa por anomalías del electrocardiograma, sin sintomatología clínica. En el examen histopatológico del tejido cardiaco se

observan áreas de fibrosis e infiltración de células mononucleares sin la presencia de parásitos, cuyo hallazgo es excepcional en la enfermedad crónica.

En varias áreas endémicas de América Latina se observa una forma digestiva de la infección chagásica, que consiste en visceromegalias, especialmente megaesófago y megacolon. Con menos frecuencia se presentan formas nerviosas, mixedematosas y glandulares.

Aun no es claro el mecanismo por el cual se produce la patogenia de la fase crónica. Llama la atención que en las lesiones miocárdicas o del aparato digestivo muy difícilmente se comprueba la presencia de parásitos, por lo que se ha sugerido el desarrollo de una enfermedad autoinmune y se han propuesto dos diferentes mecanismos que no son excluyentes entre ellos. El primer mecanismo plantea la posibilidad de que la infección provocada por el parásito perturba la inmunoregulación provocando pérdida de la tolerancia a antígenos propios. El segundo mecanismo, propone una reacción cruzada entre los antígenos producidos por el propio *Trypanosoma cruzi* y antígenos del hospedero (mimetismo molecular) lo que puede provocar la reacción autoinmune.

II.4. Inmunología de la infección por *Trypanosoma cruzi*.

El *Trypanosoma cruzi* es el más exitoso de los parásitos intracelulares, tiene la capacidad para invadir, sobrevivir y replicarse en prácticamente cualquier célula con núcleo, y particularmente en los macrófagos. En la naturaleza

Trypanosoma cruzi es transmitido al hospedero vertebrado e infecta a las células de éste. Se ha sugerido que la entrada a las células por *Trypanosoma cruzi* se lleva a cabo a través de transalidasas/neuraminidasas de la familia SAPA (antígenos liberados en la fase aguda) que se encuentran en la superficie del parásito, estas enzimas transfieren moléculas de ácido sialico, formando epítopes importantes para la adhesión parásito-célula hospedera. Uno de estos epítopes importantes es el Ssp-3, el cual al ser bloqueado con anticuerpos monoclonales inhibe la unión y la invasión de *Trypanosoma cruzi* a las células hospederas. Una vez hecha esta unión, el parásito entra a través de la formación de una vacuola parasitofora, de la cual *Trypanosoma cruzi* puede escapar evadiendo la unión de los lisosomas con la vacuola parasitofora y evitando así el daño lisosomal; además los tripomastigotes y los amastigotes sintetizan una proteína hemolítica que es activada a pH ácido y es capaz de lisar la membrana de la vacuola parasitofora (Tamowitz y col., 1992) Después el parásito comienza a replicarse en el citoplasma y sale al torrente sanguíneo. Si el parásito no escapara de las vacuolas parasitoforas, dentro de la célula, está podría procesar sus antígenos y presentarlos, a las células del sistema inmune, unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I.

Cuando se detectan parásitos en la sangre se puede afirmar que el hospedero se encuentra en la fase aguda de la enfermedad. En esta fase se presenta una supresión del sistema inmune que le ayuda al parásito a establecerse en el hospedero.

Se sabe que la supresión del sistema inmune no altera las fases iniciales del establecimiento de una respuesta inmune por parte del hospedero y que el procesamiento y la presentación de antígenos no se ven alterados. Esto se concluyó de estudios de hipersensibilidad, los cuales consistieron en montar una reacción con oxazolona, un agente que induce sensibilización por contacto, en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. Los ratones infectados con el parásito y sensibilizados con oxazolona no fueron capaces de montar una respuesta de hipersensibilidad; aunque al transplantar las células inmunes de sus nódulos a un ratón sinérgico, este último si pudo montar una respuesta de hipersensibilidad, lo que indica que las células T del ratón infectado con *Trypanosoma cruzi* si fueron capaces de procesar y presentar antígenos cuando fueron transplantadas al ratón sinérgico (Reed y col., 1978).

La inmunosupresión se presenta a otros niveles de la respuesta inmune, Szein y Kierszenbaum han reportado una inhibición en la expresión de la interleucina-2 (IL-2) y de su receptor (IL2R). La IL-2 es una citocina producida por los linfocitos T y que estimula la proliferación de los linfocitos T induciendo la progresión de un estado G₀ a un estado G_{1b} del ciclo celular (Beltz y col. 1988). Kierszenbaum y col también han demostrado que *Trypanosoma cruzi* inhibe la expresión de la cadena p55 que forma parte del receptor para IL-2 y también puede afectar la expresión de la cadena p70, causando una disminución en la expresión del receptor para IL-2 (Beltz y col., 1988). La IL-2 también modula la producción de TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) en los macrófagos, que es una citocina importante para la erradicación del parásito.

Kierszenbaum y col han reportado una inhibición en la expresión de CD3, CD4 y CD8 en la superficie de los linfocitos T. Las moléculas CD4 y CD8 participan

en la interacción del linfocito T con las células presentadoras de antígeno, formando enlaces subsidiarios con las moléculas del MHC de clase II y I respectivamente, por lo que son de suma importancia para controlar la infección por *Trypanosoma cruzi*. Aunque se ha sugerido que el procesamiento y la presentación de antígenos no se ven afectados en la infección por *Trypanosoma cruzi*, la disminución en la expresión de éstas moléculas afecta el desarrollo de una buena respuesta inmune por parte del hospedero.

También se ha reportado una disminución en la expresión del receptor para los linfocitos T (TcR) así como una respuesta disminuida de los linfocitos T a la proliferación cuando son activados con mitógenos (Sztein MB y col., 1992).

Aunque no se conoce bien el mecanismo por el cual *Trypanosoma cruzi* induce la inhibición de la producción de citocinas y de marcadores celulares en las células del sistema inmune, ésta se produce tanto en células provenientes de animales infectados como en células que provienen de sangre periférica de individuos sanos que son puestos en contacto con *Trypanosoma cruzi* solamente un determinado tiempo. Esto ha llevado a postular que la supresión es mediada por una molécula que ha sido designada TIF (molécula de infiltrado de suspensión de *Trypanosoma cruzi*). (Kierszenbaum y col., 1994)

Otro mecanismo de evasión del sistema inmune que utiliza el parásito en el hospedero, es producir una respuesta policlonal en éste. Así, tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección por *Trypanosoma cruzi* se observan altos títulos de anticuerpos de muchos isotipos, debido a una activación policlonal de las células B. Estos anticuerpos no son precisamente dirigidos en contra del parásito, lo que lleva a sugerir que la activación policlonal puede ser

un mecanismo de evasión del parásito (Ortiz-Ortiz y col.,1980). Esta respuesta policlonal puede estar relacionada con la presencia de antígenos de la familia SAPA, presentes en la superficie de *Trypanosoma cruzi*, estas moléculas SAPA tienen dos dominios uno de ellos con actividad enzimática, que es utilizado por el parásito para la unión de éste con la célula hospedera, el otro dominio es altamente antigénico y se sospecha que está involucrado en la respuesta policlonal.

Después de la fase aguda se pueden detectar anticuerpos en contra del parásito. Las subclases predominantes de anticuerpos son: IgG2a, IgG2b e IgG1. En la fase crónica de la enfermedad se observa que predominan los anticuerpos IgG1 e IgG3, que pueden mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y activación del sistema del complemento, lo que puede predisponer a una enfermedad autoinmune. Los autoanticuerpos encontrados en individuos con la enfermedad de Chagas son de los isotipos IgG2a, IgG2b, e IgG1.

Cuando se compara el curso temporal de los títulos de anticuerpos séricos específicos para *Trypanosoma cruzi*, con las curvas de parasitemia, se observa claramente que la concentración de anticuerpos es muy baja en las primeras semanas y va incrementándose al mismo tiempo que va disminuyendo la parasitemia (Bouhdidi y col. 1994).

Los tripomastigotes no pueden ser lisados por el complemento ya que poseen una molécula parecida a DAF, que es una enzima que inhibe la formación de la C3 convertasa e inhibe la lisis mediada por complemento. También se ha visto

una segunda actividad anticomplementaria asociada con los receptores de fibronectina del parásito.

II.4.1 Los macrófagos y la infección por *Trypanosoma cruzi*.

Los macrófagos juegan un papel decisivo en la infección por *Trypanosoma cruzi*, ya que pueden erradicar al parásito o bien servir para la replicación intracelular del mismo.

Como ya se menciono el *Trypanosoma cruzi* puede inhibir la producción de citocinas las cuales actúan directamente sobre los macrófagos. Si los macrófagos no están activados, son susceptibles a la infección por los tripomastigotes. Sin embargo, cuando los macrófagos son estimulados y, por lo tanto, activados por citocinas, entonces pueden matar al parásito.

El *Trypanosoma cruzi* no solo inhibe la producción de citocinas que pueden activar a los macrófagos y a otras células del sistema inmune, también puede incrementar la producción de citocinas que regulan negativamente al sistema inmune, como es el caso del factor de crecimiento transformante beta TGF- β , que es una citocina producida por un gran número de células y que interviene en procesos de diferenciación celular y embriogénesis. El TGF- β tiene un efecto inmunosupresivo de funciones de los linfocitos T, como la proliferación y la producción de citocinas

Se ha observado en cultivos de células de bazo de ratón provenientes de animales con infección aguda por *Trypanosoma cruzi* que presentan una gran síntesis de TGF- β , además se ha demostrado que los macrófagos tratados con esta citocina son incapaces de activarse con la presencia del interferón gama (IFN- γ) que es una de las principales citocinas activadoras de macrófagos. Con base en estas observaciones se ha planteado que la infección por *Trypanosoma*

cruzi puede incrementar la producción de TGF- β y así inhibir su erradicación por los macrófagos (Silva y col., 1991).

Otra citocina que inhibe la producción de IFN- γ es la interleucina-10 (IL-10), que es una citocina producida por los macrófagos, linfocitos B y linfocitos T del subtipo Th2. El papel de la IL-10 en el desarrollo de la infección por *Trypanosoma cruzi* es paradójico. En ratones de la cepa B6, infectados con *Trypanosoma cruzi*, a los cuales se les administró una dosis intermedia de anti-IL-10, tuvieron una clara disminución en la mortalidad, pero cuando se les administró una dosis mayor se observó que la mortalidad no disminuyó. Así un exceso o una completa ausencia de IL-10 pueden incrementar los efectos negativos en la infección por *Trypanosoma cruzi*, por lo que se plantea la hipótesis de que la presencia de *Trypanosoma cruzi* puede influir en la producción de esta citocina y por lo tanto en la regulación negativa de las células del sistema inmune (Silva y col., 1992).

Una de las citocinas importantes en la activación de los macrófagos es el IFN- γ el cual activa al macrófago infectado por *Trypanosoma cruzi* estimulándolo a producir óxido nítrico (NO) a través del catabolismo de L-arginina. El IFN- γ promueve la producción de la enzima NO-sintetasa la cual rompe a la L-arginina y al oxígeno molecular para formar L-citrulina y NO con un par de electrones libres. El NO con un par de electrones libres es altamente reactivo y una vez formado difunde rápidamente a través de las membranas dañando al parásito cuando se une a proteínas que contienen hierro (Fe). El NO es rápidamente oxidado a nitrito y nitrato, especies con una vida media del orden de segundos.

La producción de NO por los macrófagos, esta potenciada por el TNF- α , que es una citocina producida por los monocitos/macrófagos la cual tiene un papel de regulación autócrina y también puede participar directamente en la erradicación del parásito, destruyendo células infectadas. El GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrofagos) es otro factor activador de macrófagos, induciendo la producción de peróxido de hidrógeno y la expresión de TNF- α . (Deepika y col., 1994; Olivares y col.,1995;. Plasman y col., 1994).

Como se mencionó antes, si el macrófago se encuentra activado, puede erradicar al parásito. Una de las vías por las cuales el parásito puede entrar al macrófago es por fagocitosis. El macrófago puede fagocitar al parásito eficazmente cuando este se encuentra opsonizado. También se ha observado que cuando el parásito está opsonizado y el macrófago lo fagocita, éste puede eliminarlo de una forma más eficiente.

En células RHM (Rat Heart Myoblast), se ha observado que la opsonización con anticuerpos IgG2a, IgG2b o IgG3, no produce cambios en la infección. En cambio con el anticuerpos IgG1 se puede incrementar significativamente la infección, aunque los anticuerpos no sean específicos en contra de *Trypanosoma cruzi*. Pueden observarse los mismos efectos usando fracciones Fc (Wirt J., Kierszenbaum F. 1994)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Obtención de tripomastigotes.

Los tripomastigotes se obtienen a partir de sangre de ratones hembras de la cepa CD1, infectadas previamente con el aislado mexicano QUERÉTARO. La cepa de *Trypanosoma cruzi* QUERÉTARO fue obtenida de la Facultad de Medicina UNAM y su procedencia es el estado de Querétaro, aislada originalmente de *Triatoma barberi*. Los animales se inoculan intraperitonealmente con 5×10^5 tripomastigotes. Las curvas de parasitemia establecidas en el laboratorio de la Dra. Bertha Espinoza (Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas), demuestran que el pico máximo de parasitemia se observa alrededor de los 20 días de infección (Caballero 1996).

Para determinar el número de parásitos por mL de sangre a lo largo de la infección se obtiene una muestra de 10 μ L de sangre por un corte en la cola. La sangre se diluye 1:1000 y se observa al microscopio en hemocitómetro, para contar el número de parásitos y determinar la cantidad de tripomastigotes contenidos en la sangre del ratón. En el día de parasitemia máxima, se extrae la sangre de los ratones por punción cardiaca con una jeringa heparinizada (0.2ml de heparina a una concentración de 1000 U/mL por cada mL de sangre).

III.1.1 Purificación de tripomastigotes

La sangre obtenida se diluye 1:2 con PBS (solución salina amortiguada con fosfatos) y se realiza una separación mediante un gradiente de densidad. Para esto se estratifican 2.0 mL de la sangre diluida de ratón en 3.0 mL de Ficoll-Paque (Pharmacia) y se centrifuga a 400 X g por 45 minutos separándose los tripomastigotes junto con las células mononucleares y plaquetas. La figura 5 muestra el orden de sedimentación de las células y las fases. Se recoge la interface donde se encuentran los tripomastigotes con las células mononucleares y plaquetas, para su posterior purificación por cromatografía).

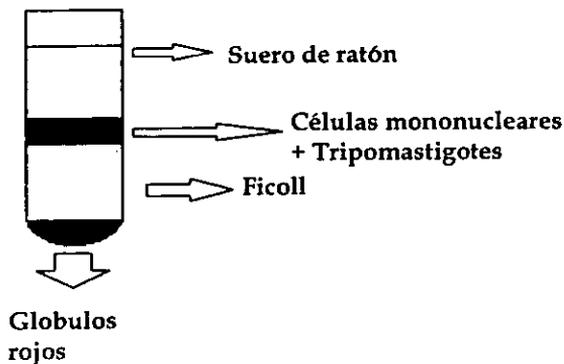


Figura 5. Orden de sedimentación de la sangre en Ficoll-Paque.

III.1.2 Purificación de tripomastigotes por cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa.

La purificación de tripomastigotes por cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa tiene como base el que los tripomastigotes tienen menor carga negativa que las células mononucleares y las plaquetas. La columna de DEAE-celulosa es aniónica por lo que las células, plaquetas y parásitos se adsorben a la misma. Debido a la fuerza iónica que proporciona el eluyente PSG (Amortiguador de fosfatos + glucosa pH= 7.5), se equilibran las cargas de la columna y se eluyen los tripomastigotes, quedando adheridos a la celulosa las células mononucleares y las plaquetas. (Gomes y col., 1992). La DEAE-celulosa se prepara de la siguiente manera: se suspenden 50g de DEAE-celulosa en 2 litros de agua destilada. Se agita con agitador magnético por 15 minutos y se deja reposar 20-25 minutos, se decanta el sobrenadante y las partículas que quedan flotando. Se repite el proceso de suspensión, reposo y decantación 25 veces. Finalmente se resuspende el sedimento en agua destilada de manera que la resina lavada constituya aproximadamente 50% del volumen total, se transfiere a frascos de vidrio y se esteriliza en autoclave. Se conserva a temperatura ambiente hasta su uso. Se prepara una columna con 3.0 mL de DEAE-celulosa en una jeringa de 10 mL. Esta columna se lava con 50 mL de PSG (Na_2HPO_4 0.09M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.004M, NaCl 0.07M, Glucosa 0.027M, pH=7.5) antes de aplicar los parásitos con los monocitos y plaquetas. Los parásitos se eluyen con PSG. El rendimiento oscila entre 40 y 70% de los parásitos iniciales (Goldberg y col, 1976).

III.2 Obtención de tripomastigotes de cultivo celular.

Se infecta una monocapa confluyente de células VERO en una botella de cultivo de 250 mL, las cuales se mantuvieron en medio D-MEM complementado con 10% de suero fetal bovino, estreptomicina y penicilina G (10000 U/mL), aminoácidos no esenciales (10mM), glutamina (2mM), piruvato 100 (mM) y son incubadas en atmósfera con un 5% de CO₂, 95% de humedad y a 37°C. La botella con la monocapa se infecta con aproximadamente 3 X 10⁶ tripomastigotes purificados por cromatografía. Los tripomastigotes que no lograron infectar a las células son lavados 48 horas después y se adiciona medio fresco. Las células infectadas son subcultivadas a otras botellas de cultivo si es necesario. Para cosechar las células, se utiliza una solución de EDTA 5mM y de tripsina (500µl a una concentración de 1 mg/mL en PBS). Las células infectadas son mantenidas con medio D-MEM complementado con 5% de suero fetal bovino, estreptomicina y penicilina G (10000 U/mL), aminoácidos no esenciales (10mM), glutamina (2mM), piruvato 100 (mM) y son incubadas en atmósfera con un 5% de CO₂, 95% de humedad y a 37°C. Después de 10 días de infección se retiran de 20 a 25 millones de parásitos por caja. El medio de la caja de células infectadas se centrifuga a 400xg para eliminar las células desprendidas de la caja. Posteriormente se centrifuga a 4000xg para concentrar los tripomastigotes.

III.3. Ensayo de infección.

Los parásitos obtenidos de los cultivos son usados en los ensayos de infección a las líneas celulares J774 (monocitos-macrófagos provenientes de ratón. ATCC TIB 67) y VERO (fibroblastos de riñón de mono verde africano. ATCC CCL 81).

Ambas líneas se mantienen en medio D-MEM complementado con 10% de suero fetal bovino, estreptomina y penicilina G (10000 U/mL), aminoácidos no esenciales (10mM), glutamina (2mM), piruvato 100 (mM) y son incubadas en atmósfera con un 5% de CO₂, 95% de humedad y a 37°C. Las células J774 se desprenden de la caja con EDTA (5 mM). Para subcultivar las células VERO son despegadas con tripsina/EDTA como se describe arriba.

III.3.1 Tratamiento de los portaobjetos usados en el ensayo de infección.

Los portaobjetos usados en el ensayo de infección tienen una cubierta de teflón la cual cuenta con 18 orificios de 1 mm de diámetro. A estas placas se les aplica el siguiente tratamiento: lavar una vez en acetona y 10 veces en agua destilada. Una vez secas, colocar en una caja Petri la cual contiene un fondo de papel filtro (figura 6), y se esterilizan en el autoclave.

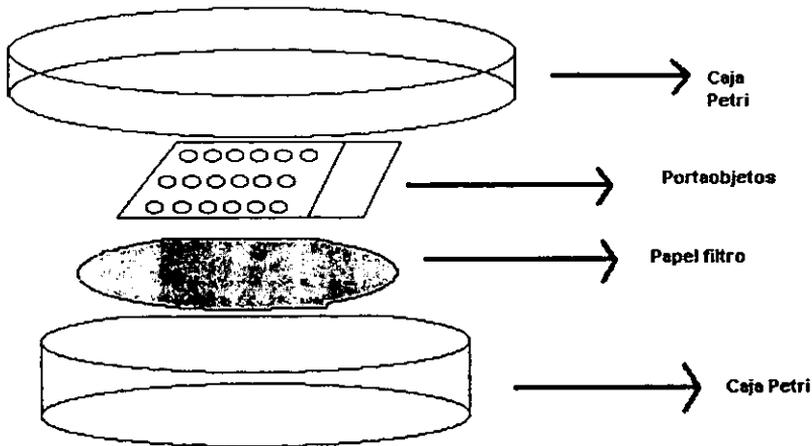


Figura 6.- Procedimiento de preparación de las placas para el ensayo de infección.

Después de que han sido esterilizadas, se colocan en cada orificio $10\mu\text{L}$ de gelatina al 0.1% recién preparada y esterilizada por filtración. Se deja reposar 30 segundos, se retiran $8\mu\text{L}$ de gelatina y se deja $2\mu\text{L}$ en cada orificio. Los portaobjetos se secan toda la noche. Después se humedece el papel filtro con agua destilada estéril y se colocan 3×10^5 macrófagos J774 o células VERO por orificio. Se incuban a $37\text{ }^\circ\text{C}$ toda la noche y al día siguiente se realiza el ensayo de infección.

III.3.2 Sensibilización de tripomastigotes

Los anticuerpos que se utilizaron para opsonizar los parásitos son anticuerpos monoclonales murinos específicos para el hapteno TNBS, (ácido 2,4,6-trinitro bencen sulfónico), y son: 4F8 (IgG2b), 2C3 (IgG2a) y 2C5 (IgG1) producidos en el laboratorio del Dr. Enrique Ortega (Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas). Para lograr la opsonización es necesario entonces sensibilizar los tripomastigotes con el hapteno.

Los tripomastigotes obtenidos de células infectadas in vitro se sensibilizan con TNBS y se cuentan en un hemocitómetro. Se utiliza 1mg de TNBS el cual se disuelve en 1mL de amortiguador de boratos (0.2 M de boratos y 0.15 M de NaCl) por cada 10×10^6 parásitos. La solución de TNBS se filtra por membrana Millipore 0.22 μm para esterilizar. El TNBS estéril se adiciona a los tripomastigotes y protegidos de la luz, se agitan por 10 minutos. Se centrifugan los parásitos a 4000xg y se resuspenden en medio D-MEM. Se observan al microscopio para cuantificar la viabilidad que fue de un 90-100% en todos los experimentos.

III.3.3 Opsonización de tripomastigotes.

Para recubrir los parásitos con los distintos isotipos de anticuerpos, se realiza previamente un ensayo de aglutinación para saber la dilución a la cual se va a adicionar el anticuerpo.

En una placa de 96 pozos fondo plano, se colocan 25µL de PBS por pozo. Al primer pozo se añadieron 25 µL de anticuerpo, y se realizan diluciones 1:2 en cada pozo, posteriormente se colocan 25 µL de tripomastigotes sensibilizados (25,000-30,000 tripomastigotes). Como control se usó un número equivalente de parásitos sin sensibilizar. Se incubó por 1 hora a 4°C en cámara húmeda y se observa posteriormente a 40x en el microscopio invertido. Cada concentración se analiza en el microscopio para determinar la presencia de aglutinación (cúmulos de parásitos).

En este trabajo utilizamos 3 diluciones de cada anticuerpo, la dilución en la que aún se observa aglutinación, una concentración mayor a la aglutinante y una concentración menor de la aglutinante.

Los anticuerpos a la dilución apropiada se adicionan a los parásitos y se incuban 30 minutos. Después de lavar, se colocan 3×10^4 parásitos por pozo, (conservando una relación de 10 parásitos por célula) y se incuban 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Como control, se utilizan tripomastigotes sensibilizados con TNBS y tripomastigotes sin sensibilizar ni opsonizar (figura 7).

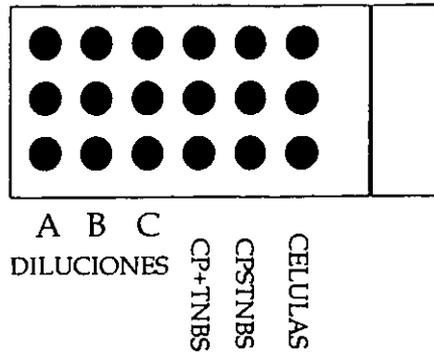


Figura 7- Distribución de los controles y parásitos opsonizados en las placas de infección. CPSTNB=Control de parásitos sin sensibilizar (sin adición de TNBS), CP+TNBS=Control parásitos con TNBS. Diluciones A, B y C, y células sin ningún tratamiento.

Posteriormente se infectan las células de los portaobjetos previamente preparados con los parásitos opsonizados y sensibilizados. Después de 24 horas se lavan los portaobjetos con PBS estéril y se fijan con metanol (sumergir cada placa en metanol absoluto 30 segundos).

Los anticuerpos y las diluciones utilizadas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1.

Anticuerpo	Isotipo	Diluciones usadas
4F8	IgG2b	A B(hay aglutinación) C
2C3	IgG2a	A B(hay aglutinación) C
2C5	IgG1	A B(hay aglutinación) C

III.4 Tinción y observación de las preparaciones.

Se realiza una tinción de Wright para posteriormente observar las preparaciones con el microscopio en 100X. Se cuentan las células infectadas y no infectadas por campo, así como el número de amastigotes por célula infectada, para calcular el porcentaje de células infectadas y el promedio de amastigotes por célula infectada.

IV. RESULTADOS

Para los ensayos de infección in vitro se utilizaron tripomastigotes de la cepa Querétaro de *Trypanosoma cruzi*, la cual fue obtenida de la Facultad de Medicina UNAM. Esta cepa procede del estado de Querétaro, y fue aislada de *Triatoma barberi*. La forma infectiva (tripomastigote) se obtuvo a partir de sangre de animales infectados. En promedio se obtuvieron 3×10^6 parásitos de un ratón infectado, antes de la purificación. Los parásitos se purificaron a partir de sangre de ratones obtenida en el día de máxima parasitemia, mediante cromatografía empleando una columna de DEAE-celulosa, obteniéndose un rendimiento entre el 40 y el 70%. Debido a la necesidad de purificar los parásitos y el alto costo de la producción y mantenimiento de los animales, se decidió utilizar parásitos crecidos en cultivos celulares. Para esto, se usaron parásitos de sangre periférica de animales infectados para inocular cultivos de células VERO (línea celular de fibroblastos de riñón de mono verde africano).

Se infectaron monocapas de células VERO con 3×10^6 parásitos purificados en botellas de cultivo de 75 cm. A los 10 días después de la infección se recogió el sobrenadante de los cultivos, los cuales contenían entre 1×10^6 y 2×10^6 parásitos/ mL. A los cultivos infectados se añade 25 mL de medio fresco y pueden cosecharse parásitos cada 1-2 días hasta que las células mueren.

Se realizaron ensayos para determinar si la infectividad de los parásitos obtenidos de cultivo es similar a la infectividad de parásitos obtenidos de la sangre de ratones infectados. Como se muestra en la Tabla 2, la infectividad para células J774 de tripomastigotes obtenidos de ambas maneras, fue similar tanto antes de sensibilizarlos con TNBS (ácido trinitro bencen sulfónico), así como después de sensibilizar.

Tabla 2. Infectividad de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* a células J774.

OPSONIZACIÓN	PORCENTAJE DE INFECCION	
	TRIPOMASTIGOTES PURIFICADOS DE SANGRE PERIFERICA.	TRIPOMASTIGOTES DE CULTIVO
CPSTNBS ^a	33.03 %	33.2 %
CP+TNBS ^b	28.25 %	28.13 %
4F8 ^c	48.5 %	35.5 %
2C5 ^d	38.9 %	24.35 %

^a Control parásitos sin TNBS

^b Control parásitos con TNBS

^c Parásitos opsonizados con el anticuerpo 4f8 (IgG2b)

^d Parásitos opsonizados con el anticuerpo 2C5 (IgG1)

IV.1 Efecto de la opsonización de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* sobre la infección a macrófagos J774.

Para estudiar si la opsonización con distintas subclases de IgG modifica la infección de células del linaje monocito/macrófago se determinó la infección a células J774 por tripomastigotes opsonizados con cada uno de 3 distintos anticuerpos de la clase IgG. Para lograr una opsonización equivalente y eliminar posibles efectos debidos a la unión de cada anticuerpo a distintos componentes de la superficie del parásito, se decidió usar un sistema de opsonización que implica la unión de grupos hapténicos a las moléculas de superficie del parásito (sensibilización) y la subsecuente opsonización por anticuerpos específicos para el hapteno. La sensibilización se hizo permitiendo la unión covalente de grupos 2,4,6-trinitrofenol a grupos amino libres de la superficie del parásito. La opsonización se realizó con los anticuerpos monoclonales que son específicos para el hapteno 2,4,6-trinitrofenol y que fueron producidos y caracterizados en el laboratorio del Dr. Ortega, Depto Inmunología, Instituto de Inv. Biomédicas UNAM. Para opsonizar, se

emplearon diferentes concentraciones de anticuerpo, tomando como referencia la concentración mínima de anticuerpo que provoca la aglutinación de una suspensión de 1×10^6 parásitos/mL (concentración aglutinante). Además, se opsonizaron parásitos con concentraciones conteniendo el doble de la concentración aglutinante (supraglutinante) y la mitad (subaglutinante) de la concentración aglutinante. Estas concentraciones se denotan por A (supraglutinante), B (aglutinante) y C (subaglutinante). En todos los ensayos, aparte de parásitos opsonizados con las tres concentraciones de cada anticuerpo, se determinó la infección por parásitos sin sensibilizar (sin tratamiento con TNBS, CPSTNBS) así como de parásitos sensibilizados pero no opsonizados (CP+TNBS) (Ver Materiales y Métodos). Para cada condición experimental, se examinaron al microscopio tres preparaciones contando al menos 100 células en cada una de ellas. Los promedios obtenidos se compararon mediante un análisis de varianza y se consideró significancia estadística cuando la $p \leq 0.05$. Los resultados se muestran en las figuras 8a, 8b y 8c.

En general, los resultados muestran que los tripomastigotes opsonizados con las tres diluciones de anticuerpo infectan un mayor porcentaje de células que los tripomastigotes no opsonizados. Así mismo, es importante notar que la sensibilización (adición de grupos TNP a las moléculas de la superficie del parásito) no afecta la infectividad.

Se encontraron diferencias significativas en la infectividad de parásitos opsonizados versus parásitos no opsonizados. No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de infección observados con parásitos

opsonizados con cada una de las diferentes concentraciones de anticuerpos usadas (A,B,C). Estos resultados se muestran en las siguientes figuras.

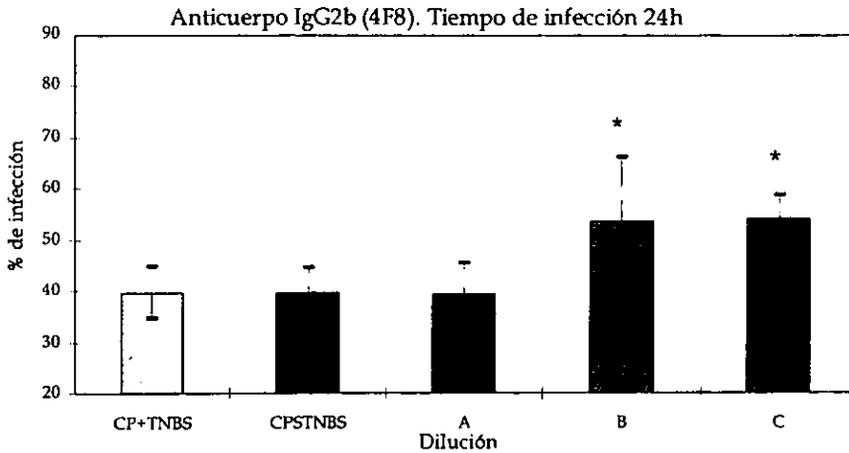


Figura 8a. Porcentaje de células J774 infectadas por tripomastigotes de *T.cruzi* opsonizados con el anticuerpo monoclonal 4F8 (IgG2b), o por parásitos sensibilizados (CP+TNBS) o sin sensibilizar (CPSTNBS). El porcentaje de infección se determinó a las 24 h como se indica en el texto. Las diferencias significativas se calcularon con una $p=0.05$ (*).

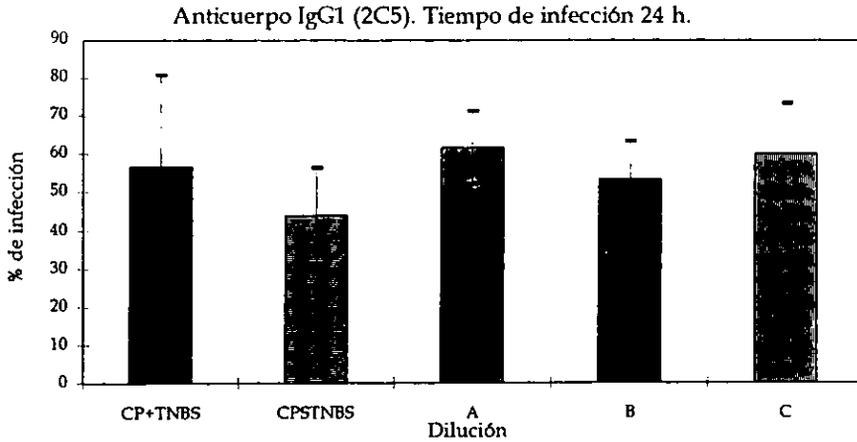


Figura 8b. Porcentaje de células J774 infectadas por tripomastigotes de *T.cruzi* osonizados con el anticuerpo monoclonal 2C5 (IgG1), o por parásitos sensibilizados (CP+TNBS) o sin sensibilizar (CPSTNBS). El porcentaje de infección se determinó a las 24 h como se indica en el texto.

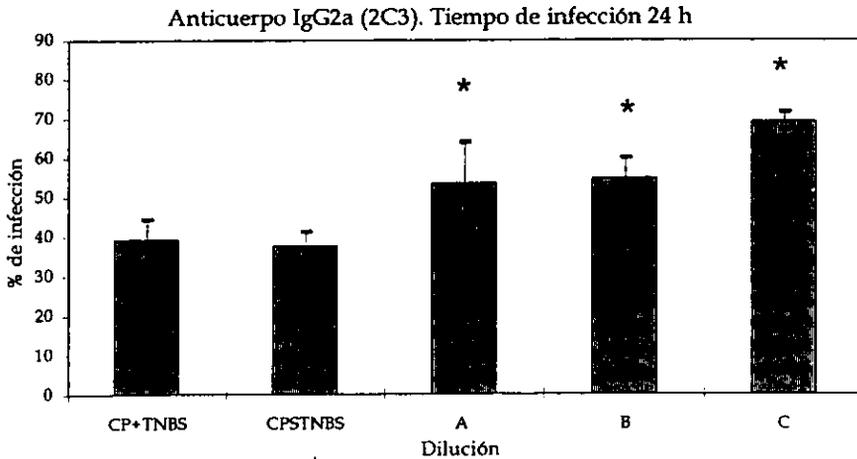


Figura 8c. Porcentaje de células J774 infectadas por tripomastigotes de *T.cruzi* osonizados con el anticuerpo monoclonal 2C3 (IgG2a), o por parásitos sensibilizados (CP+TNBS) o sin sensibilizar (CPSTNBS). El porcentaje de infección se determinó a las 24 h como se indica en el texto. Las diferencias significativas se calcularon con una $p=0.05$ (*).

IV.2 Efecto de la opsonización sobre la infección en células VERO.

Se determinó así mismo el efecto de la opsonización en la infección de células VERO, las cuales no expresan receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas. Los porcentajes de células infectadas son menores que los observados con células J774. En general se observa que los parásitos opsonizados y no opsonizados infectan en igual proporción a las células VERO (figuras 9a 9b 9c).

Así mismo no se observan diferencias en las células VERO infectadas con parásitos controles y parásitos opsonizados con anticuerpos de distintos isotipos. Esto era esperado ya que los fibroblastos no expresan receptores para la fracción Fc de la inmunoglobulinas.

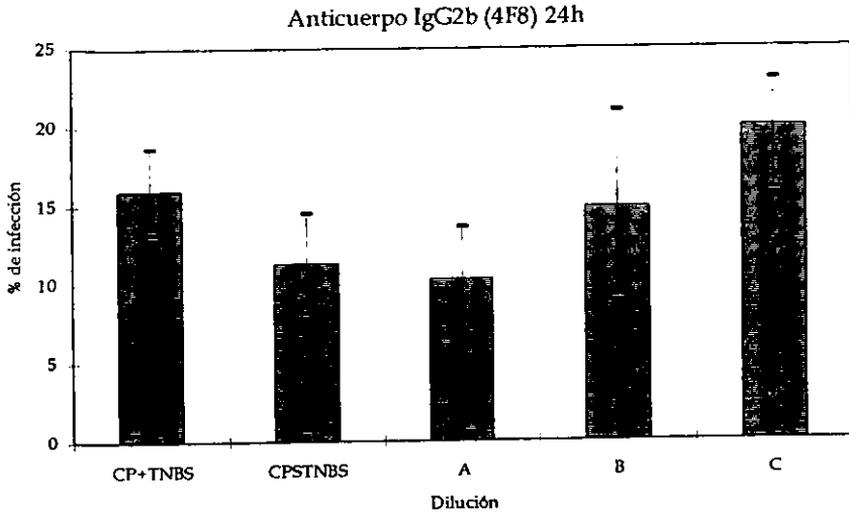


Figura 9a. Porcentaje de células VERO infectadas por tripomastigotes de *T. cruzi* opsonizados con el anticuerpo monoclonal 4F8 (IgG2b), o por parásitos sensibilizados (CP+TNBS) o sin sensibilizar (CPSTNBS). El porcentaje de infección se determinó a las 24 h como se indica en el texto.

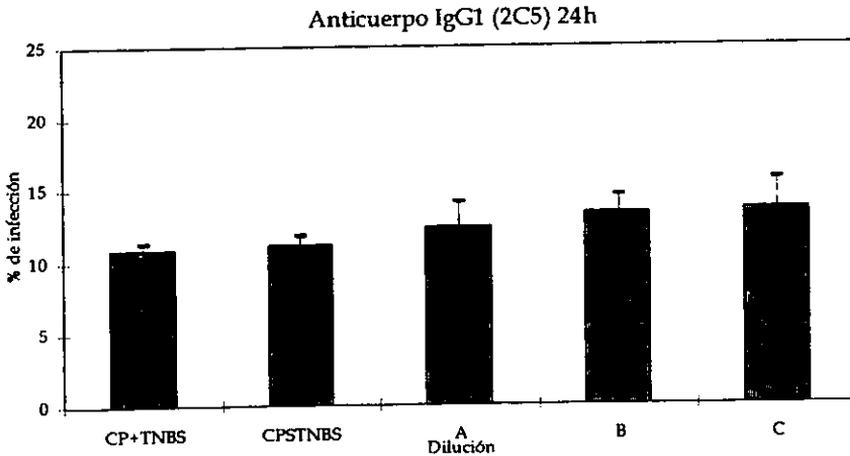


Figura 9b. Porcentaje de células VERO infectadas por tripomastigotes de *T. cruzi* opsonizados con el anticuerpo monoclonal 2C5 (IgG1), o por parásitos sensibilizados (CP+TNBS) o sin sensibilizar (CPSTNBS). El porcentaje de infección se determinó a las 24 h como se indica en el texto.

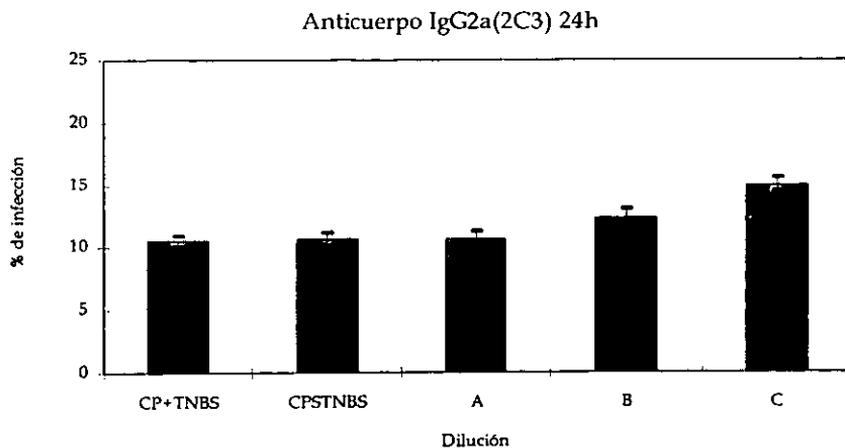


Figura 9c. Porcentaje de células VERO infectadas por tripomastigotes de *T.cruzi* opsonizados con el anticuerpo monoclonal 2C5 (IgG2a), o por parásitos sensibilizados (CP+TNBS) o sin sensibilizar (CPSTNBS). El porcentaje de infección se determinó a las 24 h como se indica en el texto.

IV.3 Comparación de los efectos de la opsonización sobre la infección de células VERO y Macrófagos.

Como se observa en la figura 9, la infección que producen los tripomastigotes opsonizados y no opsonizados en los macrófagos es mucho mayor que la producida en las células VERO y con el objeto de facilitar la comparación del efecto de la opsonización sobre la infección a los distintos tipos celulares opsonizados, se calculó una tasa de incremento en la infección debida a la opsonización. Esto fue necesario ya que por un lado los porcentajes de infección, por parásitos sin sensibilizar ni opsonizar, que se observaron para el mismo tipo celular muestran una cierta variación entre un experimento y otro. Por otro lado también es evidente la variación más notoria en la capacidad de

infección a cada tipo celular. La tasa de incremento en infección se calculó como la diferencia entre la infección por tripomastigotes opsonizados con los distintos isotipos de anticuerpo y su respectivo control (tripomastigotes no opsonizados) en cada experimento; y dividiendo esta diferencia entre el control multiplicando por 100 para obtener la tasa:

$$\text{Tasa de incremento} = \frac{\%OP - \%CPSTNBS}{\%CPSTNBS} \times 100$$

En donde

%OP: Porcentaje de células infectadas por tripomastigotes opsonizados.

%CPSTNBS: Porcentaje de células infectadas por tripomastigotes sin sensibilizar ni opsonizar.

En la figura 10 se muestran las tasas de incremento en la infección de células J774 y VERO infectadas con tripomastigotes opsonizados con los anticuerpos 4F8 (IgG2b), 2C5 (IgG1) y 2C3 (IgG2a). Las barras vacías corresponden a la infección de las células J774 y las barras llenas a las células VERO.

Las tasas de incremento en la infección a ambos tipos celulares se compararon usando un análisis de varianza. Para todos los anticuerpos al menos en dos de las diluciones se encontró una diferencia significativa ($p \leq 0.05$), siendo en todos los casos mayor la tasa de incremento de la infección a macrófagos en comparación con el incremento observado en células VERO. Como puede observarse en las gráficas de la figura 10, con excepción de la dilución A del anticuerpo 4F8, para los tres anticuerpos en todas las diluciones, la tasa de incremento de la infección a macrófagos es positiva. Esto indica que la opsonización favoreció la infección de un mayor porcentaje de células. Con respecto a la infección de células VERO, este efecto es menor, aunque también hay un aumento de la infección como resultado de la opsonización. Esto es más evidente con el anticuerpo 2C5 (Figura 10). Cabe mencionar que la tasa de

incremento en la infección es el efecto real producido por los parásitos opsonizados con los distintos isotipos y distintas concentraciones, para cada línea celular empleada.

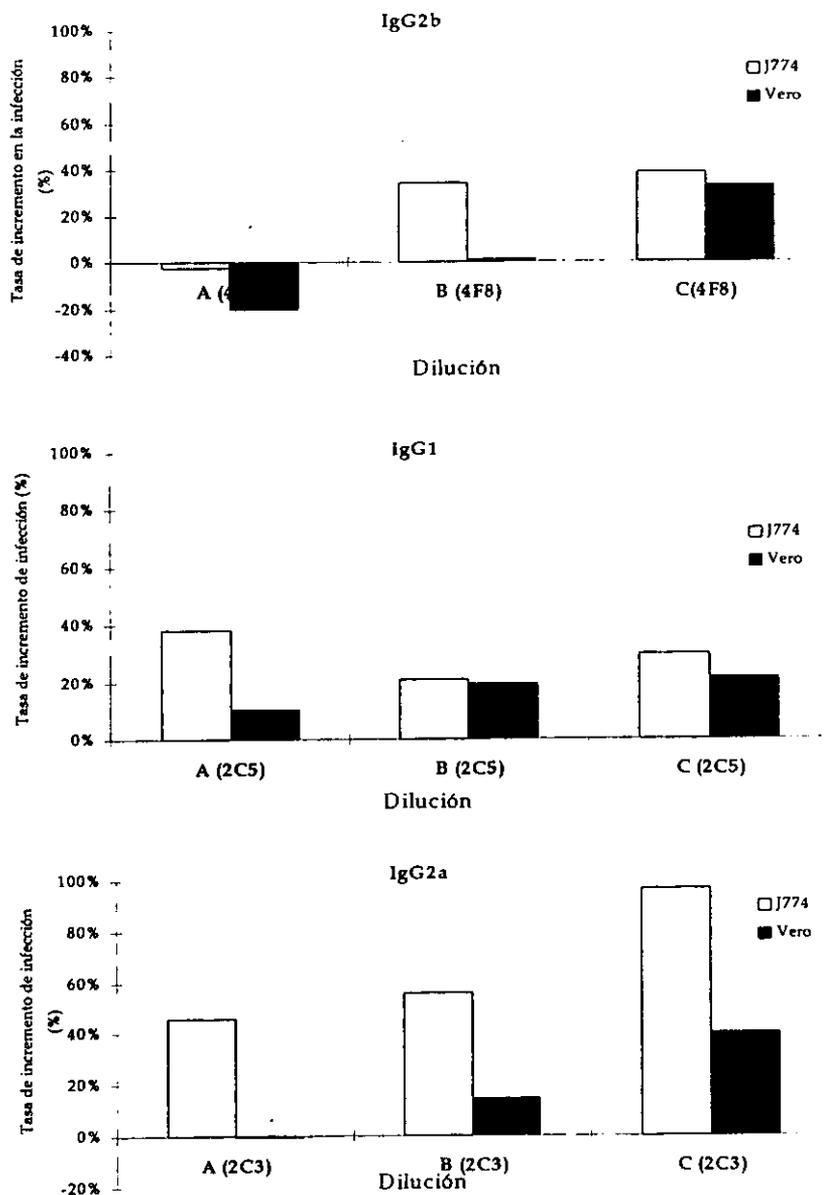


Figura 10. Tasa de incremento en la infección por la opsonización de tripomastigotes por los anticuerpos monoclonales 4F8 (IgG2b), 2C5 (IgG1), 2C3 (IgG2a). El porcentaje de células infectadas y la tasa de incremento se determinaron como se indica en el texto.

IV.4 Número de amastigotes por célula infectada.

Otra variable importante para cuantificar la infección además del porcentaje de células infectadas, es el número de parásitos que se encuentran por célula infectada. Por lo tanto, determinamos así mismo si la opsonización tiene algún efecto sobre este parámetro de la infección, tanto en macrófagos como en células VERO. El número amastigotes dentro de cada célula infectada fue determinado microscópicamente y se obtuvo un número promedio de amastigotes por célula infectada. Con estos datos se calculó una tasa de incremento en el número de amastigotes por célula infectada de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Tasa de incremento} = \frac{X_{OP} - X_{CPSTNBS}}{X_{CPSTNBS}} \times 100$$

En donde

X_{OP} : Número promedio de amastigotes/célula cuando se infectó con tripomastigotes opsonizados.

$X_{CPSTNBS}$: Número promedio de amastigotes/célula cuando se infectó con tripomastigotes no opsonizados

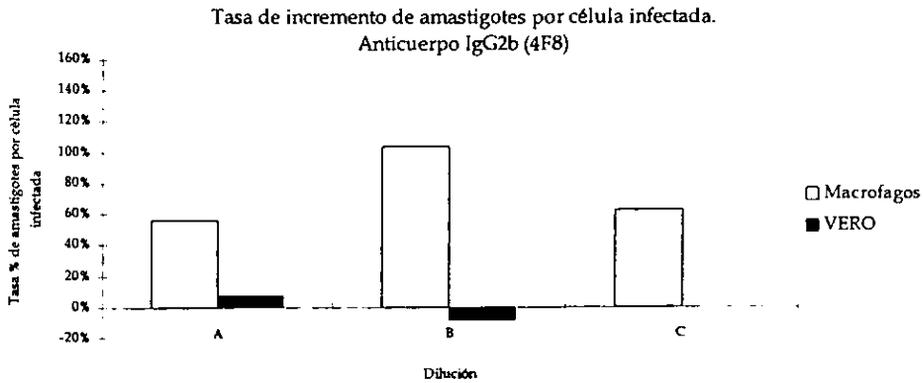


Figura 11a. Tasa de incremento en el número de amastigotes por célula infectada con tripomastigotes opsonizados con el anticuerpo monoclonal 4F8 (IgG2b). El número de amastigotes por célula infectada y la tasa de incremento se determinaron como se indica en el texto.

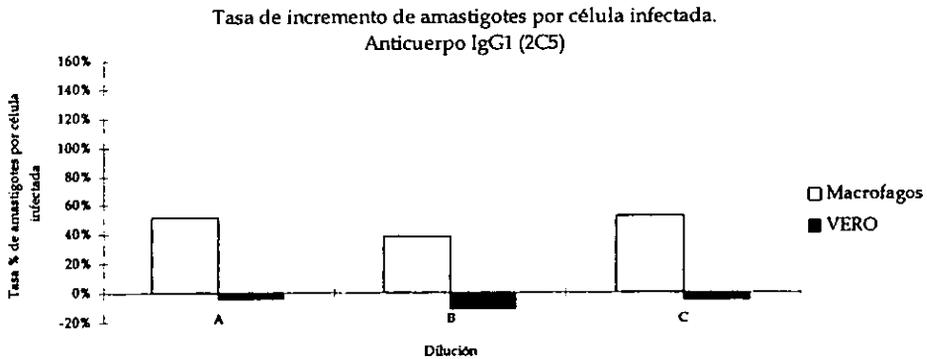


Figura 11b. Tasa de incremento en el número de amastigotes por célula infectada con tripomastigotes opsonizados con el anticuerpo monoclonal 2C5 (IgG1). El número de amastigotes por célula infectada y la tasa de incremento se determinaron como se indica en el texto.

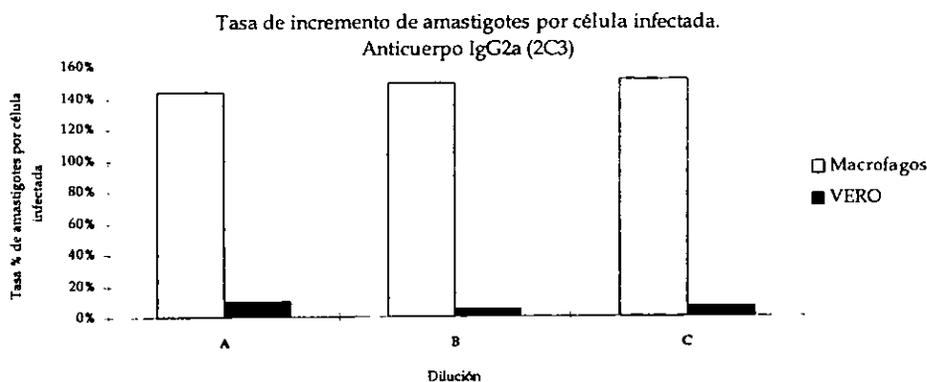


Figura 11c. Tasa de incremento en el número de amastigotes por célula infectada con tripomastigotes opsonizados con el anticuerpo monoclonal 2C3 (IgG2a). El número de amastigotes por célula infectada y la tasa de incremento se determinaron como se indica en el texto.

En la figura 11 se muestran las tasas de incremento en el número de amastigotes por célula infectada cuando la infección de células J774 y VERO se realiza por tripomastigotes opsonizados con los anticuerpos 4F8 (IgG2b, fig. 11a), 2C5 (IgG1, fig. 11b) y 2C3 (IgG2a, fig. 11c) Las barras vacías corresponden a la infección de las células J774 y las barras llenas a las células VERO. Las tasas de incremento se compararon con una prueba estadística para diferencia de proporciones.

Como puede verse en la figura 11, la opsonización produjo un aumento en el número de amastigotes por célula infectada solamente en células J774. Este efecto se observa para los tres anticuerpos en todas las diluciones probadas. En contraste, en todos los casos las tasas de incremento observadas en células VERO son cercanas a cero, indicando que la opsonización no afecta este parámetro en esta línea celular.

Tasa de promedio de amastigotes por célula infectada. Comparación de células J774 y VERO

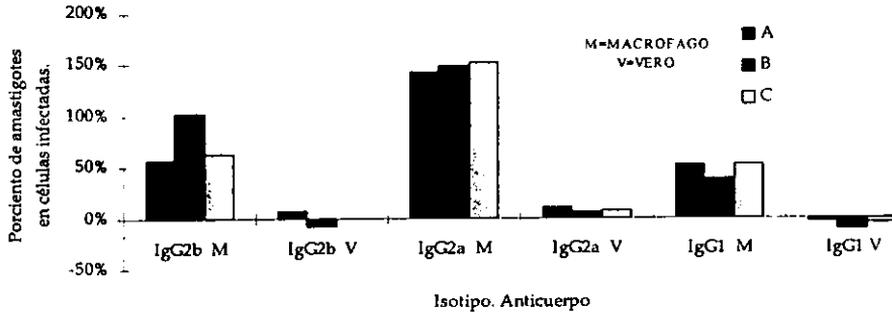


Figura 12. Tasa promedio de amastigotes por célula infectada. Comparación de células J774 y VERO. El número de amastigotes por célula infectada y la tasa de incremento se determinaron como se indica en el texto.

En la figura 12 se comparan las tasas de incremento en el número de amastigotes entre células VERO y macrófagos. Se observa que para todos los isotipos usados en este trabajo los macrófagos infectados tienen un mayor número de amastigotes que las células VERO, en cualquier dilución empleada.

V. DISCUSION.

La enfermedad de Chagas, provocada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, es un problema de salud pública en América Latina y Sudamérica. En la década pasada se reportaron 187 casos de la enfermedad en México y en suroeste del país se ha encontrado gran seropositividad contra el parásito, lo cual indica que la infección por *Trypanosoma cruzi* es más frecuente de lo que hasta hace algunos años se pensaba.

Como se ha reportado, la infección por *Trypanosoma cruzi* causa una supresión del sistema inmune al inicio de la infección lo que se cree facilita el establecimiento del parásito en el hospedero, esto indica que en la infección por *Trypanosoma cruzi*, el parásito puede interferir con las células del sistema inmune en el establecimiento de una buena respuesta y la consiguiente erradicación de la infección.

En este trabajo se infectaron macrófagos murinos (J774) y fibroblastos de mono (VERO) con tripomastigotes opsonizados con distintas subclases del anticuerpo IgG y tripomastigotes no opsonizados para observar el grado de infección que los tripomastigotes con o sin tratamiento podían provocar en estas dos distintas líneas celulares.

Se eligieron macrófagos murinos, ya que el macrófago juega un papel determinante en la infección por *Trypanosoma cruzi*, por ejemplo, el tripomastigote puede sobrevivir y replicarse en el macrófago, escapando de la vacuola parasitofora hacia el citoplasma. Sin embargo los macrófagos pueden erradicar al parásito, siempre y cuando hayan sido activados con distintas citocinas como el IFN- γ . El macrófago activado incrementa su capacidad de fagocitar y también puede incrementar su metabolismo oxidativo, que produce

intermediarios del oxígeno y óxido nítrico que pueden afectar al parásito.

La hipótesis que planteamos es que existiría un incremento en la infección a los macrófagos cuando se infectaban con parásitos opsonizados, en comparación con la infección por parásitos no opsonizados. En este trabajo se encontró que los parásitos opsonizados provocaban una mayor infección en los macrófagos murinos que los parásitos no opsonizados, esta diferencia es de entre el 20 y el 30% de infección, comparado con los macrófagos infectados con parásitos controles no opsonizados. También observamos que la sensibilización de los parásitos con TNBS (CP+TNBS) no interfiere con la infectividad, ya que los macrófagos infectados con parásitos únicamente sensibilizados tienen en general un porcentaje de infección muy similar al de los macrófagos infectados con parásitos sin ningún tratamiento (CPSTNBS). El incremento en la infección a macrófagos por parásitos opsonizados podría indicar que el parásito opsonizado entra por medio del receptor para la fracción Fc de las inmunoglobulinas o por lo menos que la interacción con estos receptores favorece la unión parásito-célula. Para evaluar si el incremento en la infección se debe al hecho de que los macrófagos expresan receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas, el grado de infección presente en los macrófagos se comparó con el grado de infección que presentaron las células VERO las cuales no expresan receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas, aunque si pueden ser infectadas por *Trypanosoma cruzi* y realizar endocitosis, pinocitosis, etc. Primero se determinó el porcentaje de infección que provocaron los parásitos opsonizados y no opsonizados en las células VERO encontrando que no había diferencias significativas en el porcentaje de infección cuando se infectaron con parásitos opsonizados o no opsonizados. Al igual que para las células J774 los tripomastigotes sensibilizados pueden infectar a las células VERO, es decir, el hapteno no interfiere con la infectividad de los parásitos.

El porcentaje de infección que provocaron los tripomastigotes opsonizados y los tripomastigotes controles en las líneas J774 y VERO, fue comparado por medio de una tasa de incremento en la infección, así pudimos comparar la diferencia real de infección entre las líneas celulares utilizadas, ya que este incremento se calculó a partir del porcentaje de las células infectadas con tripomastigotes opsonizados y no opsonizados. En esta parte del trabajo se encontró que la tasa de incremento de infección debido a la opsonización es mayor para macrófagos que para las células VERO, cuando se usan los anticuerpos IgG2b (4F8), e IgG1 (2C5). Cuando se emplea el anticuerpo IgG2a (2C3) prácticamente no hay diferencia en las tasas de incremento entre estas dos líneas celulares. Esta observación indica que la subclase del anticuerpo opsonizante puede influir en la capacidad de infección ya que en particular se observa una clara diferencia en la tasa de infección cuando se utiliza en particular el anticuerpo IgG2a. Se sabe que los tres isotipos principales que intervienen en la eliminación del parásito son IgG1, IgG2a e IgG2b, que contribuyen llevando a cabo citotoxicidad celular, fagocitosis y actividad lítica mediada por complemento. Nuestros resultados indican que algunas subclases de IgG (IgG2a), además de su posible acción contra el parásito, en ciertas circunstancias pueden incrementar la infección. La posible relevancia in vivo no se conoce, pero en vista de estos resultados vale la pena explorarlo ya que si se repitiese este fenómeno in vivo podría utilizarse para el desarrollo de una terapia inmune o inclusive el desarrollo de vacunas que pudieran producir en los mamíferos anticuerpos con una subclase específica, la cual pudiera facilitar la fagocitosis por parte de los macrófagos y la consecuente erradicación del parásito.

También se debe mencionar que los parásitos fueron opsonizados con distintas

diluciones de anticuerpo y como se observa en la figura 10, existe un mayor incremento en la infección cuando se emplea la dilución C (subaglutinante), tanto para los tres isotipos como para las dos líneas celulares empleadas. Aunque la diferencia no es significativa, este punto llama la atención por que puede sugerir que a menor concentración de anticuerpo existe un mayor índice de infección probablemente porque una opsonización excesiva pueda bloquear sitios importantes en el parásito para la entrada a las células. Se han hecho estudios con anticuerpos IgG e IgM de pacientes chagásicos a diluciones no aglutinantes. El experimento se realizó incubando las células por dos horas con tripomastigotes más el suero. El resultado mostró que los anticuerpos interferían en la infección a células RHM (Rat Heart Myoblast). Por lo tanto, la infección se disminuye por que el parásito recubierto con el anticuerpo no puede entrar a la célula, ya que los anticuerpos son capaces de bloquear epítopes importantes en el parásito. Adicionalmente, las células RHM no tienen el receptor para la fracción Fc de las inmunoglobulinas y por lo tanto los parásitos opsonizados no pueden entrar a la célula por fagocitosis. (Wirt J., Kierszenbaum F. 1994)

Otro parámetro de la infección que fue evaluado en este trabajo es el promedio de amastigotes por célula infectada, que se comparó por mediante una tasa de incremento en el número de amastigotes por célula para cada línea celular. Lo que observamos fue que los macrófagos presentaron una tasa mucho mayor en el número de amastigotes por célula infectada en cualquier condición. Aunque la bibliografía reporta que la entrada del parásito a macrófagos es en gran medida por fagocitosis mediada por receptores Fc, también mencionan que los tripomastigotes pueden entrar por "penetración activa" utilizando otros receptores distintos al Fc; como son los receptores para LHD (moléculas de

lípidos de alta densidad). Milder y Kloetzel apoyan la hipótesis de que la presencia del receptor para Fc sí influye en las en la infección a células, razón por la cual el parásito penetra a la célula principalmente por fagocitosis. Sabemos también que la fagocitosis se vuelve eficiente en presencia de anticuerpos o componentes del complemento como el C3b.

Las figuras 11a, 11b y 11c muestran que la opsonización induce un aumento en el número de amastigotes/célula en macrófagos, pero no en células VERO, lo que refleja que entraron más parásitos por célula. En general la opsonización tiene un mayor efecto sobre el número de parásitos que entran a cada célula y no sobre la posibilidad de infectar a más células. Al igual que para el porcentaje de células infectadas, el anticuerpo 2C3 (IgG2a) tiene un efecto mayor que los anticuerpos 4F8 (IgG2b) y 2C5 (IgG1), con lo que podemos decir que hay una diferencia importante entre las subclases de IgG empleadas en este trabajo.

VI. CONCLUSIONES

- La información y resultados obtenidos indican que tanto el porcentaje de células infectadas, así como el número de amastigotes por célula es menor para las células VERO que para los macrófagos, cuando son infectadas con tripomastigotes opsonizados. Esto sugiere que, la entrada de tripomastigotes opsonizados a macrófagos puede ocurrir a través del receptor para la fracción Fc de las inmunoglobulinas.
- Se estableció un sistema de infección "in vitro" que permitió cuantificar la infección de tripomastigotes a células macrófagos murinos de la línea J774 y permite analizar la influencia de las subclases del anticuerpo, independientemente del epítipo que reconozca el Ac.
- La subclase del anticuerpo es importante para el aumento en el porcentaje de células infectadas y el número de parásitos por célula.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Andrade ZA Mechanisms of Myocardial Damage in *Trypanosoma cruzi* infection. Ciba Foundation Symposium 99. London Pitman Books 1983:214.
2. Barousse AP, Costa JA, Epasto L, Plume H, Segura EL. Enfermedad de Chagas e inmunosupresión. Medicina Buenos Aires 1980 40:17.
3. Beltz LA, Szein MB, Kierszenbaum F. Novel mechanism for *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of human lymphocytes. Inhibition of IL-2 Receptor expression. J Immunol 1988; 141:289
4. Bouhdidi A, Truyens C, Rivera M-T, Bazini H, Carlier Y. *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotypic hypergammaglobulinaemia and parasite-specific response involving high IgG2a concentrations and highly avid IgG1 antibodies. Parasite Immunol 1994; 16:69
5. Caballero G M L "Estudio de la Respuesta Inmune Humoral Inducida por Cuatro Aislados Mexicanos de *Trypanosoma cruzi* en Modelo Murino. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM.
6. De Souza W, Arguello C, Martinez-Palomo A, Trissi, D, Gonzales-Robles A, and Chiari E. Surface charge of *Trypanosoma cruzi*. Binding of cationized ferritin and measurement of cellular electrophoretic mobility. J Protozool 1977; 24: 411
7. De Souza W, Martinez-Palomo A, and Gonzales-Robles A. The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: cytochemistry and freeze-fracture. J Cell Sci. 1978; 33:285
8. De Titto EH, and Segura EL. Biology of Chagas Disease. Cell-mediated reactivity against human and *Trypanosoma cruzi* antigens according to clinical status in Chagas' disease patients. Immunol Lett 1985;9:249

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

9. Deepika R, Pakianathan KE. *Trypanosoma cruzi* affects nitric oxide production by murine peritoneal macrophages. *J Parasitol* 1994; 80: 432
10. Goldberg SS, Silva Pereira AA, Chiari E, Mares-Guia M, Gazzinelli G. Comparative kinetics of arginine and lysine transport by epimastigotes and trypomastigotes from two strains of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool* 1976; 23:179
11. Gomes YM, Carvalho AB, Santos M.L, Cavalcanti VMS, Monjour L. Isolation of *Trypanosoma cruzi* from blood by histopaque and continuous percoll gradient centrifugations. *Appl Biochem Biotechnol* 1994; 33: 183
12. Hoare CA and Wallace FG. Academician Eugene N. Pavlousky (The classification of mammalian trypanosomas). *Nature* 1965; 212: 1385.
13. Kierszenbaum F, Cuna W, Beltz LA, Sztejn MB. *Trypanosoma cruzi* reduces the number of High-affinity IL-2 receptor on activated human lymphocytes by suppressing the expression of the p55 and p70. *Int J Parasitol.* 1989; 143:275
14. Kierszenbaum F, Mejia H, Sztejn MB. Inhibition of *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses by protein produced by *Trypanosoma cruzi* in the course of Chagas' disease. *Immunology* 1994; 81: 462
15. Lanham SM, Godfrey DGV. Isolation of salivarian trypaosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. 1970;. *Exp. Parasitol.* 28: 521
16. Lewinsohn R, Carlos Chagas (1879-1934): The discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American Trypanosomiasis (foot-notes to the history of Chaga's disease). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979; 73 (5):125
17. Martinez-Palomo A, De Souza W, and Gonzales-Robles. Topographical differences in the distribution of surface coat components and intramembrane particles. A cytochemical and freeze-fracture study in culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biol.* 1976; 69: 507

18. Meyer H and De Souza W. Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissue cultures. I Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of parasite's life cycle. J Protozool. 1976;. 23: 385-390.
19. Milder R, Kloetzel J. The development of *Trypanosoma cruzi* and macrophages in vitro. Interaction with lysosomes cell fate. Parasitology. 1980; 80:139.
20. Miles MA, Cedillos RA, Povoá MM, De Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* stains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? Lancet 1981; 1:1338.
21. Moncayo-Medina A. Chagas' Disease. tropical disease research: a global partnership. Eighth Programme Report of the UNDP/WORLD BANK-WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 1987:89
22. Olivares E, Vray B. Relationship between granulocyte macrophage-colony stimulating factor, tumor necrosis factor- α and *Trypanosoma cruzi* infection of murine macrophages. Parasite Immunol 1995; 17: 135
23. Ortega-Barria E, Pereira ME. A novel *Trypanosoma cruzi* Heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and Trypanosomes into mammalian cells. Cell 1991; 67:411
24. Ortiz-Ortiz L, Parks DE, Rodriguez M and Weigle WO. Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 1980;. 124:121
25. Plasma N, Metz G, Vray B. Interferon- γ -activated immature macrophages exhibit a high *Trypanosoma cruzi* infection rate associated with a low production of both nitric oxide and tumor necrosis factor- α . Parasitol Res 1994; 80: 554

26. Reed SG, Larson CL, Speer CA. Contact sensitivity response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 1978; 22: 548
27. Rodriguez C, Kierszenbaum F, Wirth JJ. Binding of specific ligand to Fc receptors on *Trypanosoma cruzi* increases the infective capacity of the parasite. *Immunology* 1991; 72: 114
28. Santos-Buch CA. American trypanosomiasis: Chagas' disease. *Int Rev Exp Pathol* 1979; 19:63
29. Schmunis GA, Dodd RY, Barker LE. Infection, immunity and blood transfusion. New York, Alan R. Liss Inc, 1988.
30. Schofield CJ. Control of Chagas' disease vectors. *Brit Med Bull* 1985; 41: 187
31. Schofield CJ. Environmental change-description or prediction? *Ann Soc Belg Med Trop* 1990;70:1.
32. Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. IL-10 and IFN- γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 1992; 175: 169
33. Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in vitro and in vivo by transforming growth factor-beta. *J Exp Med* 1991; 174: 539
34. Sztein MB, Cuna W, Kierszenbaum F. *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8 and IL-2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. *J Immunol.* 1990; 144(9):3558
35. Sztein MB, Kierszenbaum F. Suppression by *Trypanosoma cruzi* of T-cell receptor expression by activated human lymphocytes. *Immunol* 1992; 77:277
36. Takehara HZ, da Silva AP, Mota I. *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp Parasitol* 1981; 52:137

37. Tamowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris AS, Weiss LM, Wittener M. Chagas' Disease. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 400
38. Tarleton R, Sun J, Zhang L. Depletion of T-Cell subpoblations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun* 1994; 62: 1820
39. Tay J, Schenone H, Sanchez TJ, Robert L. Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Biol Chil Parasito* 1992; 47:43
40. Tkle GB, Dudson L. Autoimmunity and Chaga's disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989;145:79
41. Vandekerckhove F, Darji A, Rivera MT, Carlier Y, Vray B, Billiau A. Modulation of T- cell responsiveness during *Trypanosoma cruzi* infection; analysis in different lymphoid compartments. *Parasite Immunol* 1994; 16:77
42. Velasco CO, Valdespino JL, Tapia-Conyer y col. Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. *Sal Pub Mex.* 1992; 34: 186
43. Wirt J, Kierszenbaum F, Inhibition of mammalian host cell infection by insect-derived, metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* in the presence of human or rabbit anti- T. cruzi antibodies. *Int J Parasitol* 1987; 17:841