

00322

91



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Autoriza a la Dirección General de Bibliotecas UNAM a difundir en formato electrónico e impresa el contenido de mi trabajo titulado:

NOMBRE: Esteban Jorge Galarza

FECHA: 18 - Julio - 2003

FIRMA: [Signature]

" LA DEFICIENCIA DE BIOTINA MODIFICA LA SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCION CON UNA CEPA NO VIRULENTE DE *TRYPANOSOMA CRUZI* "

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ESTEBAN JORGE GALARZA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ARMIDA BAEZ SALDAÑA

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

MEXICO, D.F.

2003

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "La deficiencia de biotina modifica la susceptibilidad a la infección con una cepa no virulenta de *Trypanosoma cruzi*."

realizado por Esteban Jorge Galarza

con número de cuenta 9855515-0, quien cubrió los créditos de la carrera de Biología.

Dicho Trabajo cuenta con nuestro voto probatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Armida Báez Saldaña

Armida B.

Propietario Dr. Enrique Ortega Soto

Enrique Ortega Soto

Propietario Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

Bertha Espinoza Gutiérrez

Suplente Dra. Clara Espitia Pinzón

Clara Espitia Pinzón

Suplente Dra. Luz María López Marín

Luz María López Marín

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología



M. En C. Juan Manuel Rodríguez Chávez
M. En C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Este trabajo se realizó en el laboratorio de los Doctores: Armida Báez Saldaña y Enrique Ortega Soto, en colaboración con la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez, del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Esta tesis se realizó con el apoyo de los proyectos IN208399 y IN226402 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), así como del Programa De Becas Para Tesis De Licenciatura (PROBETEL).

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre Magdalena y a toda mi familia por su apoyo: mi padre Eusebio, mis hermanos: Andrés, Adela, Gloria, Juana, Jesús, Margarito y Reina.

Para Anizul y Alfredo por su incondicional amistad.

Para Rosa Angela.

A los doctores por sus enseñanzas: Armida Báez, Enrique Ortega, Clara Espitia, Bertha Espinoza, y Luz María López.

A todos mis amigos y compañeros.

De la Carrera: Fher, Wendy Xolalpa, Gabriel, Ricardo Segundo, Karis Carlos Madrid y Castañeda, Paola Yurima, Wendy, Crystal, Carlos Lozano, Yani, Ivonne Alonso, Areli, Blanca, Arturo Díaz, Pedro, Guillermo, Ajax, Beatriz Ramirez, Anabel, Evgueny, Ivonne Reyes, Lucia, Roberto Carlos, Rodrigo Tzunum, Enrique, Ana Cecilia, Emilio, Elba, Margarita, Erik, María, Hortensia, Fernando, Marco, Arturo Alcazar, Vanesa, Alfredo, Odeth.

Del Laboratorio: Ilse, Claudia (Garay y Hallal), José, Paula, Marta, Paola, Daniel, David, Linda, Fabiola, la Dra. Isabel Soto, Ivonne, Andrea, Tere, Sandro, Guiedani, José Antonio, Edgar, Giovanni, Luis, Gustavo, Brenda, Alejandra, Vero y la Dra. Blanca

Del trabajo: Rosy, Sandra, Ximena, Oscar, Jonathan, Omar, Chano, Samuel Shapiro, Jorge, Sergio, Jorge Goiri,

A mis profesores: Isabel, Ernesto Alarcón, Jorge Meave, Guillermo Salgado,

También para: Eduardo Anzaldúa, Javier, Veronica, Omar, Karina, John, Martha, Laura, Carolina, Claudia Lucia, Alba, Eduardo, Fany, Armando Isibasi, Alex, Irina,

A los Técnicos por su asesoría profesional: Esther Pacheco, Claudia A. Garay, Georgina Díaz e Ignacio Martínez.

Y todos los que faltaron... ya que de todos he aprendido un poco.

RESUMEN

Se ha reportado que la deficiencia de biotina tiene efectos adversos en el sistema inmune. Produce una mayor susceptibilidad a infecciones de la piel, principalmente por hongos como *Candida albicans*; menor celularidad en el bazo; acelera la velocidad de involución del timo y ocasiona un arresto en la maduración de los timocitos. Para determinar cómo influye la deficiencia de biotina en el curso de una infección parasitaria se infectaron ratones machos Balb/cAnN deficientes de biotina con la cepa no virulenta, NinoA, de *Trypanosoma cruzi*. El peso corporal y las actividades específicas de las enzimas acetil CoA carboxilasa, propionil CoA carboxilasa y piruvato carboxilasa en el hígado de los ratones, se usaron como indicadores de la deficiencia de la vitamina. La mortalidad y la parasitemia se consideraron como indicadores de la virulencia del parásito. La respuesta inmune del huésped se determinó por medio de la producción de anticuerpos IgG anti *T. cruzi*, así como por el reconocimiento por el suero de ratones infectados de proteínas antigénicas del parásito. En los ratones deficientes infectados, hubo una disminución significativa del peso corporal en comparación con el peso corporal de los ratones de los grupos control y suficiente a partir de la semana 3 de experimentación. En el hígado de los ratones deficientes la actividad específica de las tres carboxilasas disminuyó en 49 %, 45 % y 52%, para ACC, PCC y PC respectivamente, con respecto a la de los hígados de los individuos suficientes y controles. El grupo deficiente presentó una sobrevivencia del 31 % en comparación al 100 % del grupo control. La parasitemia máxima en circulación sanguínea fue en los ratones deficientes 50 % mayor que en los controles. No se encontraron diferencias en la producción total de IgG anti *T cruzi* en el suero de los ratones infectados, aunque sí las hubo en el reconocimiento de proteínas inmunogénicas. Como se esperaba, los ratones deficientes presentaron una mayor susceptibilidad a la infección desde el punto de vista de sobrevivencia y parasitemia. En conjunto, estos datos muestran que la deficiencia de biotina afecta la capacidad del sistema inmune para eliminar una infección parasitaria y sugieren que la vía humoral no es la principal responsable de que la deficiencia de biotina aumente la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*, sino probablemente a través de mecanismos efectoros celulares.

INDICE

Resumen	1
Índice	2
Antecedentes	
1.- Vitaminas	3
2.- Biotina	4
3.- Nutrición y enfermedades infecciosas	13
Justificación	28
Objetivos e Hipótesis	29
Materiales y métodos	30
Resultados	36
Discusión	56
Conclusiones	63
Apéndice A	64
Apéndice B	66
Bibliografía	67

ANTECEDENTES

1. Vitaminas

Las vitaminas son sustancias orgánicas presentes en pequeñas cantidades en los productos naturales y que son esenciales para el metabolismo normal (Gershwin, 2000).

Las vitaminas se clasifican por su solubilidad en hidrosolubles y liposolubles, ya que esta propiedad influye en su modo de acción, almacenamiento y toxicidad. (Tabla 1). En general y con la excepción de B₁₂, las vitaminas hidrosolubles no son almacenadas en el organismo. Entran al cuerpo libremente, están presentes en fluidos intra y extracelulares, y se eliminan fácilmente y casi sin cambios en la orina. La mayoría de las vitaminas hidrosolubles funcionan como coenzimas en el metabolismo de azúcares, ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos. Alternativamente, son cosubstratos en reacciones enzimáticas o son componentes estructurales de las enzimas.

Tabla 1. Clasificación de las vitaminas con base en su solubilidad

Vitaminas Hidrosolubles	Cofactor de Enzimas	Vitaminas liposolubles	Cofactor de Enzimas
Tiamina, B ₁	Si	A, Retinoides	Si
Riboflavina, B ₂	Si	D, Calciferoles	No
Niacina, B ₃	Si	E, Tocoferoles	No definido
Ácido pantoténico, B ₅	Si	K, filoquinonas y manaquinonas.	Si
Piridoxina, B ₆	Si		
Ácido fólico, B _c	Si		
Cobalamina, B ₁₂	Si		
Biotina,	Si		
Colina	No		
Inositol	No		
Ácido lipóico	Si		
PABA	Si		
Vitamina C	Si		

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las vitaminas liposolubles tienen acciones más individualizadas, con la excepción de la vitamina E que tiene un amplio espectro como antioxidante lipídico. Estas vitaminas son almacenadas y también con la excepción de la vitamina E, no son absorbidas o excretadas tan fácilmente como las vitaminas hidrosolubles (Linder, 1991).

2. Biotina

2.1 Estructura de la biotina

La biotina (Hexahidro-2-oxo-1 H-tieno [3,4-d] imidazol-4-ácido pentanoico) es una vitamina hidrosoluble que forma parte del complejo B y se encuentra en pequeñas cantidades en todos los organismos vivos. Existen ocho isómeros, pero sólo la biotina-D-(+) es biológicamente activa. (Fig. 1). En los organismos está presente en dos formas distintas: sin asociarse (libre) y unida a proteínas. En las proteínas, la biotina está unida covalentemente al grupo ϵ -amino de residuos de lisina en la secuencia de aminoácidos específica -Ala-Met-Lis-Met- (Lewis *et al.*, 2001).

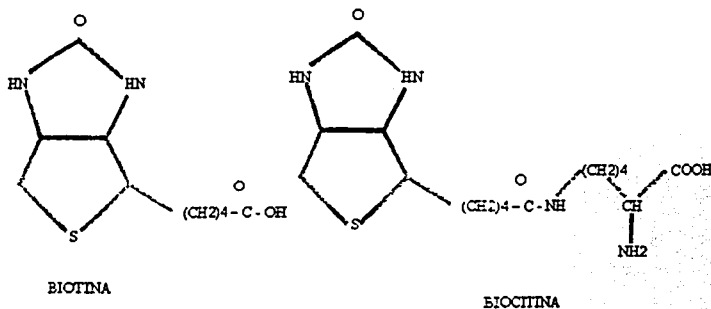


Figura 1. Estructura de la biotina (Hexahidro-2-oxo-1 H-tieno [3,4-d] imidazol-4-ácido pentanoico) en su forma libre y como dímero unida a lisina en la posición ϵ -amino (biocitina)

La biotina es sintetizada por varias bacterias y plantas superiores, sin embargo muchos microorganismos y animales superiores no son capaces de producirla por lo que los requerimientos de esta vitamina deben ser cubiertos por la dieta y/o especulativamente por la que sintetizan los microorganismos simbióticos presentes en el tracto intestinal de los animales superiores. Las fuentes de la dieta más ricas en esta vitamina incluyen hígado, riñón, corazón, páncreas, carne de aves, yema de huevo y leche (Livaniou *et al.*, 2000).

La mayor parte de la biotina de los alimentos está unida a proteínas. Muchas enzimas gastrointestinales pueden hidrolizar a las proteínas que contienen biotina hasta producir péptidos biotinilados y el complejo biotina-lisina el cual se conoce como biocitina (Figura 1). Solamente la biotinidasa intestinal puede liberar a la biotina de la biocitina. Esta biotinidasa intestinal se encuentra en jugos pancreáticos, secreciones de glándulas intestinales, flora bacteriana y membranas intestinales. Las actividades de las biotinidasas son similares en las mucosas del duodeno, yeyuno e íleon. Los sitios primarios de hidrólisis de péptidos biotinilados son inciertos (Wolf *et al.*, 1985).

Algunos estudios sugieren que la biotinidasa puede funcionar como una proteína que une a la biotina en el suero, para transportarla a la célula (Wolf *et al.*, 1985). Otros estudios reportan que más del 80 % de la biotina sérica está libre, menos del 10 % está unida reversiblemente y aproximadamente el 12 % está unido covalentemente a proteínas del plasma (Lankford and Mock, 1988 y Mock and Malik, 1992).

En el intestino, la biotina libre es absorbida por un transportador saturable dependiente de sodio, aunque a concentraciones mayores de 10 μM predomina la difusión pasiva. La

salida de biotina del enterocito es mediada por un acarreador, el cual es independiente de sodio electrogénico y no acumula biotina en contra de un gradiente de concentración. En hepatocitos, capilares cerebrales, vesículas membranales basolaterales de la placenta y células mononucleares periféricas, la biotina libre se acumula por un sistema de transporte saturable (Zemleni and Mock, 1999).

2.2 Función de la biotina

La función bioquímica de la biotina se determinó desde principios del siglo XX cuando E. Wilders hizo importantes observaciones acerca de que las levaduras requerían para crecer además de sales y azúcares, de un factor presente en la carne al cual llamó "bios". En los siguientes 30 años se probó que dicho factor era una mezcla de 3 compuestos, uno de los cuales fue aislado de la yema de huevo y cristalizado por Kögl y Tonis. Este factor fue llamado biotina (Friedrich, 1988).

En los mamíferos, la biotina funciona como grupo prostético de 4 diferentes carboxilasas: Propionil CoA carboxilasa (PCC), β -metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC), piruvato carboxilasa (PC) y acetil Co A carboxilasa (ACC) (Zemleni and Mock, 1999^a). Además en microorganismos se han descrito otras enzimas biotiniladas, siendo en total 9: 6 carboxilasas, una transcarboxilasa y dos descarboxilasas. En humanos la biotina está directamente involucrada en los procesos metabólicos vitales de gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos, y catabolismo de aminoácidos (Fig. 2).

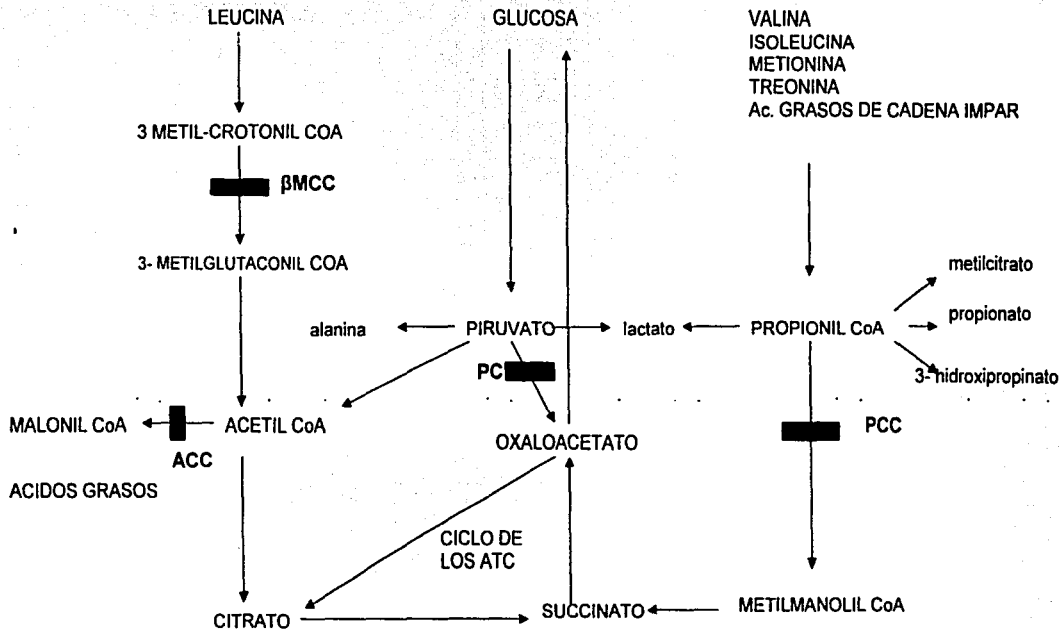


Fig. 2. Vías metabólicas en las que participan las enzimas biotinizadas. Los bloques rectangulares sólidos indican las reacciones catalizadas por las carboxilasas: PCC = Propionil CoA ; β -MCC = β -metilcrotonil CoA; PC =Piruvato; ACC = Acetil CoA. La orina de los niños con deficiencia de carboxilasas aisladas o múltiples tienen concentraciones altas de los metabolitos indicados con minúsculas.

La PC produce oxaloacetato a partir de piruvato para lo cual requiere acetilCoA, ésta es una reacción clave en el proceso de formación de la glucosa a partir de precursores que no son carbohidratos. Adicionalmente, tiene una función muy importante en el proceso citoplasmático de lipogénesis.

La ACC lleva a cabo la primera reacción de la síntesis de ácidos grasos, carboxilando la acetil CoA para formar malonil CoA, la cual es utilizada por el complejo citosólico multienzimático "ácido graso sintetasa" para producir palmitato.

La PCC cataliza la formación de metilmalonil CoA a partir de propionil CoA. La metilmalonil CoA es después convertida a succinil CoA y ésta subsecuentemente sufre una serie de reacciones que terminan con la producción de oxaloacetato y después glucosa o CO_2 y agua.

La MCC interviene en el catabolismo de la leucina, en donde se forma como intermediario el 3-metilglutaconilo y éste por acción de la MCC, se convierte en 3-metilglutaconil CoA, que es hidroxilado y posteriormente fragmentado para producir acetil CoA y acetoacetato (Wolf, 1995).

2.3. Ciclo de la biotina

Cada una de las carboxilasas es sintetizada como una apoenzima inactiva, que posteriormente es biotinilada para formar la holoenzima a través de dos reacciones catalizadas por la holocarboxilasa sintetasa (Fig. 3).

La holoenzima acetil CoA carboxilasa funciona en el citosol, mientras que las otras 3 holoenzimas se encuentran en la mitocondria. Una sola molécula de holocarboxilasa puede realizar muchas carboxilaciones antes de ser capturada por los lisosomas, en donde las holocarboxilasas son degradadas a péptidos biotinilados, los cuales por

hidrólisis secuencial producen biocitina. Como se mencionó en la sección 2.1 la biotinidasa hidroliza la biocitina a lisina mas biotina libre, la cual queda disponible para ser incorporada nuevamente a una apocarboxilasa (Wolf, 1995).

2.4 Características clínicas de la deficiencia de biotina en humanos

En los humanos hay diferentes causas que producen deficiencia de biotina, a saber: 1) Personas con una dieta alta de clara en huevo cruda, - siendo ésta una forma relativamente segura y rápida de desarrollar la deficiencia de biotina (Syndenstricker *et al.*, 1942); 2) Individuos con nutrición parenteral total sin suplementación de biotina (Mock, 1985, Higuchi *et al.*, 1998); 3) Pacientes que reciben tratamientos terapéuticos crónicos con anticonvulsivantes como la carbamazepina, la difenilhidantoina y el fenobarbital (Mock and Dyken, 1997, Mock *et al.*, 1998); 4) Niños con desnutrición energética y proteínica severa (Velásquez *et al.*, 1988); y 5) Individuos con defectos congénitos de deficiencia de biotinidasa (Wolf *et al.*, 1985^a) o de holocarboxilasa sintetasa (Burri *et al.*, 1981). Estos defectos producen dos variedades del desorden metabólico que se conoce como Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC) (Fig. 2).

La deficiencia de la holocarboxilasa sintetasa (HCS) conocida también como DMC neonatal o de aparición temprana, consiste en un trastorno en la biotinilación de las apocarboxilasas. La DMC juvenil o de aparición tardía es causada por la deficiencia en la biotinidasa, lo que produce un defecto en el reciclamiento de la biotina (Baumgartner and Suormala, 1999).

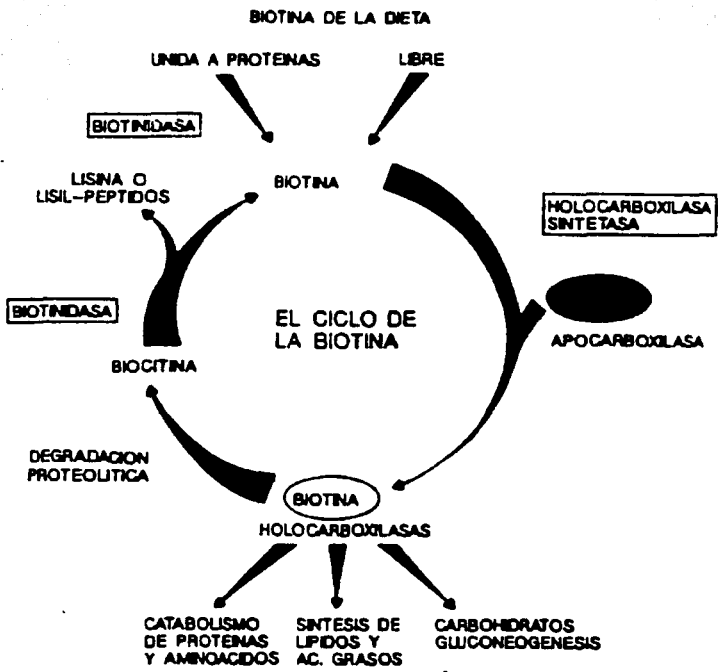


Fig. 3. Ciclo de la biotina que muestra el reciclamiento metabólico de la biotina. Las dos enzimas principales relacionadas con este ciclo son la holocarboxilasa sintetasa (HCS) y la biotinidasa (B'asa). La HCS une covalentemente la biotina a las diferentes apocarboxilasas para formar las holocarboxilasas. La B'asa es la hidrolasa que libera a la biotina de la biocitina y de pequeños péptidos biotinilados que se formaron en la degradación proteolítica de las holocarboxilasas y de la biotina unida a las proteínas de la dieta.

La deficiencia de biotina es muy rara y debido a la gran variabilidad de síntomas observados en los desórdenes metabólicos de las DMC no se ha podido establecer un cuadro clínico, aunque los hallazgos más frecuentes incluyen: dermatitis periorificial, dermatitis intratable, conjuntivitis, alopecia, ataxia, hipotonía, acidosis cetoláctica/ aciduria orgánica, convulsiones, infecciones de la piel y retraso del desarrollo. Además, en adolescentes y adultos ocurren los siguientes síntomas: adelgazamiento del pelo, por lo general con pérdida de color, salpullido de piel descrito como escamoso (seborreico) o rojo (eccematoso) que en casos severos se distribuye alrededor de los ojos, nariz y boca; dolor muscular generalizado; náuseas; vómito; anorexia; cambios en el estado mental; depresión; letargo; alucinaciones y parestesias de las extremidades.

En general, los niños con deficiencia de alguna de las carboxilasas no responden al tratamiento con biotina, mientras que la mayoría de los individuos con alguna DMC han mejorado con la administración de dosis farmacológicas de la vitamina (Wolf, 1995).

2.4.1 DMC y Función del Sistema Inmune.

En una familia, 3 hermanos diagnosticados con DMC juvenil presentaron disfunción del sistema nervioso central, dermatitis causada por *Candida*, keratoconjuntivitis y alopecia. Dos de ellos fueron estudiados inmunológicamente y mostraron ausencia de respuesta en una prueba de piel de hipersensibilidad dérmica retardada y en estudios *in vitro* ausencia de respuesta de linfocitos al antígeno de *Candida*. Uno de ellos además tuvo deficiencia de la inmunoglobulina del isotipo IgA y no presentó respuesta a la inmunización con polisacárido de neumococo (Cowan *et al.*, 1979).

Un paciente deficiente de PCC, por consiguiente con acidemia propiónica, que fue resistente al tratamiento con biotina, a pesar de tener una cuidadosa terapia dietética falleció a los 10 meses de edad, después de episodios infecciosos recurrentes acompañados de desórdenes metabólicos. Tuvo repetidas leucopenias, linfopenias, granulopenias y trombopenias; en diversas ocasiones se le identificaron bacterias patógenas en la piel y mucosas y a la edad de 9 meses presentó niveles séricos bajos de IgG, valores normales para IgM e IgA y títulos normales de IgM específica para diversas bacterias, pero no formó anticuerpos para 15 virus comunes (Müller *et al.*, 1980).

2.5 Respuesta inmune humoral y celular en animales de experimentación deficientes de biotina

Se ha observado que la deficiencia de biotina en animales de experimentación produce alteraciones en el sistema inmune. Las ratas deficientes de biotina inoculadas con toxoide diftérico tuvieron una respuesta débil o nula de anticuerpos antitoxoide diftérico (Pruzansky and Axelrod, 1955). Además, no desarrollaron autoinmunidad inducida experimentalmente con proteína básica de mielina de cobayo (Rabin, 1983) y presentaron una disminución en la velocidad de crecimiento corporal y menor peso de timo, bazo y nódulos linfáticos intestinales. En cobayos deficientes de biotina, se observaron alteraciones en las proporciones de los glóbulos blancos circulantes (Petrelli *et al.*, 1981). Para la generación *in vitro* de linfocitos T citotóxicos de bazo de ratón se requiere de biotina en el medio de incubación (Kung *et al.*, 1979). En el bazo de ratones Balb/cAnN deficientes en biotina se encontró un menor número total de células y alteraciones en las proporciones de linfocitos que expresan diferentes marcadores fenotípicos; disminuyendo el porcentaje de los que tienen inmunoglobulina de superficie (sIg) y aumentando los que

tienen al correceptor CD3. Además, la proliferación inducida por un mitógeno en células de bazo de los ratones deficientes fue más baja que la de los controles. (Báez –Saldaña *et al.*, 1998). Estos ratones deficientes de biotina también tuvieron menor peso de bazo y timo, menor contenido total de células tímicas y mostraron un arresto en la maduración de los timocitos (Báez-Saldaña, Tesis de doctorado. 1998).

3. Nutrición y enfermedades infecciosas.

Está bien demostrado que una nutrición adecuada es crítica para el desarrollo de un sistema inmune efectivo así como para incrementar sus mecanismos efectores. Actualmente en el mundo occidental prevalecen grandes sectores de la sociedad que padecen desnutrición y que muestran respuestas inmunes subóptimas (Gershwin *et al.*, 2000). De hecho, la desnutrición es la causa más común de inmunodeficiencia alrededor del mundo. La deficiencia nutricional está asociada a una respuesta inmune disminuida, particularmente la inmunidad mediada por células, la función fagocítica, la producción de citocinas, la respuesta de anticuerpos secretados y la afinidad de los anticuerpos (Chandra, 1996).

Datos epidemiológicos y clínicos así como estudios experimentales sugieren que hay una interacción bidireccional entre los micronutrientes y los patógenos infecciosos. Por una parte las deficiencias nutrimentales pueden alterar muchos aspectos de las respuestas inmunes hacia los patógenos y por otra, algunas enfermedades infecciosas pueden alterar el estado nutricional del hospedero, aumentando la pérdida de nutrientes e interfiriendo en su utilización por medio de alteraciones en sus vías metabólicas (Tylor, 2000).

Muchos micronutrientes tales como la vitamina A, el beta caroteno, el ácido fólico, la vitamina B₁₂, la vitamina C, la riboflavina y otras vitaminas del complejo B, el hierro, el zinc y el selenio, tienen funciones inmunomoduladoras que influyen en la susceptibilidad de un hospedero a las enfermedades infecciosas así como en el curso y en el resultado de tales enfermedades (Bhaskaram, 2002).

Sin embargo, la nutrición no afecta de la misma manera a todas las infecciones. Para algunas infecciones como neumonía, diarrea viral y bacteriana, sarampión y tuberculosis hay mucha evidencia de que el curso clínico y el resultado final son afectados adversamente por la deficiencia nutricional. Para enfermedades infecciosas como la encefalitis viral y el tétanos, el efecto del estado nutricional es mínimo. Para otras como infecciones por el virus de la influenza y el virus de la inmunodeficiencia humana, la nutrición ejerce una influencia moderada (Chandra, 1996). Las deficiencias nutricionales pueden influir también en mutaciones del patógeno afectando su virulencia y el resultado clínico (Beck and Levander, 2000).

Todas estas interacciones dependen de otras variables, como la severidad de la deficiencia de micronutrientes, la edad, la condición clínica del hospedero y una variedad de factores ambientales (Jain, 2002 y Kapil and Bhavna, 2002).

En las infecciones por parásitos intestinales, se encontró una asociación positiva entre el número de parásitos y el impedimento de crecimiento en niños, principalmente con edades entre 5 y 12 años. Los parásitos que de manera aislada presentaron la mayor asociación fueron *Ascaris lumbricoides* y *Trichiuris trichiura*, cuando se presentan juntos la asociación fué más significativa. Los mecanismos por los cuales los parásitos causan sus efectos han sido ampliamente estudiados, la parasitosis puede causar anorexia, daño en las vellosidades intestinales, competencia por nutrientes, facilitación de la colonización

por bacterias, incremento en los requerimientos de energía y pérdida de sangre, entre otras (Saldiva *et al.*, 1999).

En otro estudio, los niveles de vitamina A en plasma estuvieron inversamente relacionados con la infestación de parásitos intestinales como *Ascaris lumbricoides*, *Entamoeba histolytica*, *Enterobius vermicularis*, *Giardia lamblia*, e *Hymenolepis nana*. De 100 niños estudiados el 42 % estuvieron infectados y tuvieron valores de 51 unidades/dl de vitaminas mientras que el 58% no infectados tuvieron valores de 75 unidades/ dl (Kumar, 2000).

En la infección por malaria en humanos, los micronutrientes como la vitamina A, los carotenoides, la riboflavina, el folato, la vitamina E y el zinc, regulan negativamente la secreción de TNF α y regulan positivamente la expresión de CD36 por los monocitos y macrófagos además de inducir un incremento en la fagocitosis de eritrocitos parasitados por *Plasmodium falciparum*, entre otros (Nussenblatt and Semba, 2002 y Serghides and Kain, 2002).

3.1 Nutrición y *Trypanosoma cruzi*

EL efecto de la dieta ha sido también estudiada en las infecciones experimentales con *Trypanosoma cruzi*, ratones Balb/c se alimentaron "ad libitum" con una dieta deficiente de zinc (1.0 μg de Zn/ g de alimento) y adecuada en zinc (51 μg de Zn/ g). Además se incluyó un grupo al cual se le proporcionó la dieta adecuada de zinc pero restringiéndolo a la misma cantidad de alimento que ingirió el grupo con la dieta deficiente (51 μg de Zn/ g). La mitad de cada uno de los grupos fue infectado con la cepa Tulahuén de *T. cruzi* y

después de 8 días, en los ratones deficientes de zinc se observó una mortalidad del 80 % comparada con un 10 % en el grupo restringido y 0% en el grupo con la dieta adecuada. Previo a la muerte, el grupo deficiente de zinc tuvo una parasitemia 50 veces mayor a la de los grupos con dietas adecuada y restringida (Fraker *et al.*, 1982).

En otro estudio en ratones Balb/c, la suplementación con vitamina D tuvo un efecto protector, ya que en los ratones suplementados con dosis de 63 o 430 U.I. se observó una menor mortalidad, menor parasitosis del tejido cardíaco en donde la reacción celular e inflamatoria también fue menos intensa. (Silva *et al.*, 1993). En ratones infectados con la cepa Y de *T. cruzi* y tratados con hierro, la parasitemia fue más intensa que en ratones no tratados, los cuales tenían niveles bajos de hierro en suero y en órganos como hígado y bazo (Pedrosa *et al.*, 1993).

En otro estudio, se observó que la restricción severa de proteínas modificó el comportamiento de la parasitemia y la sobrevivencia de los ratones infectados con *T. cruzi*. Los ratones adultos fueron sometidos a diferentes grados de restricción de proteínas por 5 semanas (4.75, 9.5, 14.25 y 19 % de proteína en dietas isocalóricas con contenido normal de vitaminas y minerales). Después de la inoculación con 2 cepas de *T. cruzi* (Y y CL) sólo la restricción severa de proteínas (4.75%) indujo decremento en la resistencia a la infección con ambas cepas, manifestándose en una mayor parasitemia y mortalidad (Gomes *et al.*, 1994).

Por otra parte la interacción entre la dieta y la infección se observa incluso en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi*. Perros con mal Aspecto Clínico Externo (ACE) definido por el grado de desarrollo muscular, evidencia externa de estructuras óseas,

existencia de depósitos grasos, etc., tuvieron una mayor probabilidad de infectar triatominos que fueron alimentados con los perros una sola vez. Esta probabilidad en los perros con mal ACE fue de 2.6 y 6.3 veces mayor que la probabilidad de los perros con regular y buen ACE respectivamente (Petersen *et al.*, 2001).

3.2 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esta enfermedad es generalmente letal y virtualmente incurable. La organización mundial de la salud (WHO) estima que 100 millones de personas están en riesgo y de éstas 16-18 millones están infectadas, por lo que la enfermedad de Chagas representa un serio problema de salud en 17 países de América Latina. La distribución geográfica de la infección humana se extiende desde el sur de los Estados Unidos de América a la provincia de Chubut en Argentina. En México se estima que el 1.6 % de una población total de 97.4 millones de mexicanos, están infectados (WHO, 1991).

En el territorio mexicano se han reportado 31 especies del género *Triatoma* y todas las especies de triatominos son consideradas como vectores potenciales. Se han encontrado, en promedio, anticuerpos anti-*T. cruzi* en 20% de la gente mayor de 5 años que viven en áreas rurales y suburbanas al sur del trópico de Cáncer. La mayor evidencia proviene de un estudio realizado entre 1987 y 1989, donde se estudiaron cerca de 70 000 individuos de una muestra representativa de cada estado. La seroprevalencia nacional de anticuerpos anti-*T. cruzi* fue del 1.6% y en todo el país fueron encontrados casos seropositivos (Guzmán-Bracho 2001).

3.2.1 Morfología de *Trypanosoma cruzi*

Con base en el desarrollo morfológico del parásito (Pereira, 1990) se pueden identificar 3 diferentes estados con propiedades biológicas únicas:

1) Tripomastigotes: Tienen el kinetoplasto localizado posterior al núcleo; en hospederos mamíferos, son encontrados intracelularmente en tejidos y extracelularmente en sangre periférica; mientras que en hospederos invertebrados están siempre extracelularmente (Figura 4).

2) Epimastigotes: tienen el kinetoplasto localizado anterior al núcleo, en forma de huso y

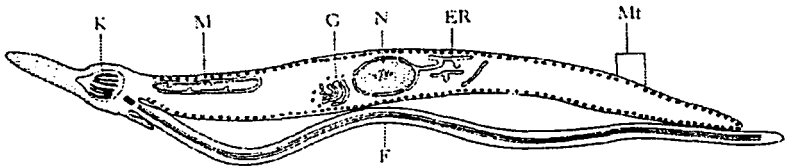


Figura 4. Representación de un tripomastigote de *T. cruzi*. K, kinetoplasto; M, mitocondria; G, aparato de Golgi; N, núcleo; ER, Retículo endoplásmico; Mt, microtúbulos subpeliculares; F, flagelo. (Pereira, 1990)

miden de 20 a 40 μm de longitud. Están localizados en el estómago medio de hospederos invertebrados donde se multiplican y mantienen la infección

3) Amastigotes: son la forma intracelular replicativa de *T. cruzi* en células de mamíferos. Tienen forma circular con un flagelo corto y se multiplican por fisión binaria en un lapso de 7 a 14 horas.

3.2.2. Ciclo de vida

El parásito en la etapa de tripomastigote metacíclico, es normalmente transmitido pasivamente a humanos y otros mamíferos en las heces del insecto triatómino de la familia Reduviidae (Figura 5). Cuando el triatómino pica la piel con su estilete para alimentarse, defeca sobre la piel y el tripomastigote penetra al cuerpo por la herida hecha por la picadura u otra abrasión de la piel o mucosa. Cuando la infección es por vía cutánea se produce una lesión llamada chagoma, pero si la infección es por vía ocular la lesión se le conoce como signo de Romaña. El *T. cruzi* también puede ser transmitido de manera congénita, por transfusión sanguínea y por trasplante de órganos contaminados.

Una vez dentro del cuerpo, los tripomastigotes metacíclicos no se dividen extracelularmente, sino que entran a macrófagos o tejidos cercanos a la picadura del triatómino en una forma polarizada y probablemente activa. Posteriormente escapan de los compartimientos lisosomales hacia el citoplasma y se transforman en amastigotes redondos. El escape de los fagolisosomas probablemente involucra una molécula ácido-activa, o hemolisina, inmunológicamente relacionada al componente C9 del complemento que tiene actividad de perforina. (Andrews *et al.*, 1990)

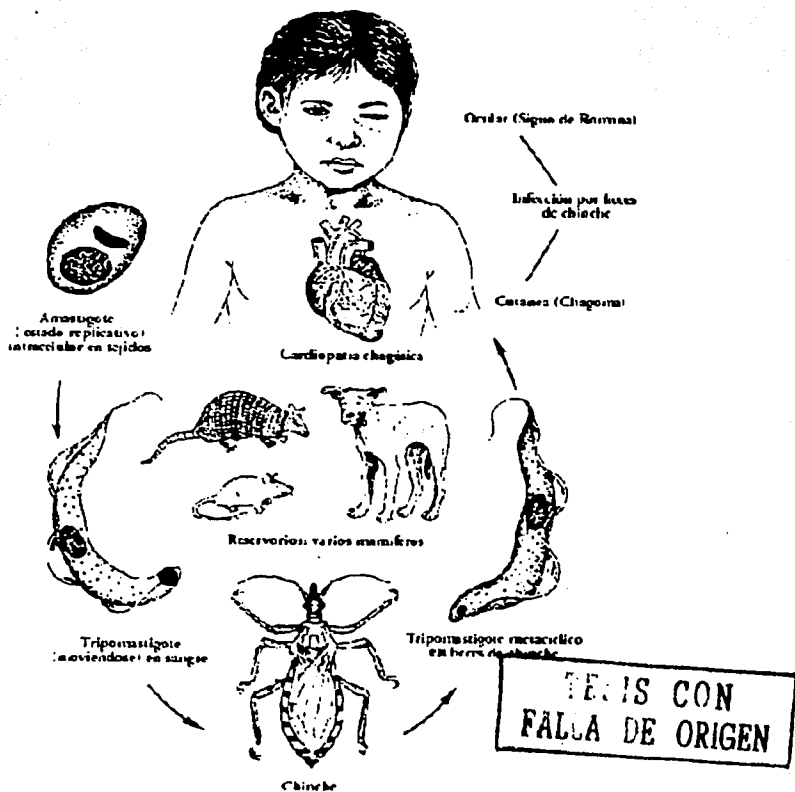


Figura 5) Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Ilustración por George Wassilchenko

La división intracelular ocurre muchas veces por fisión binaria; la ruptura de las células infectadas libera tripomastigotes derivados del tejido, los cuales son capaces de infectar células circundantes o diseminarse a otros tejidos a través del torrente circulatorio. Característicamente, los tejidos neuronales y musculares de todos los tipos son los más fuertemente parasitados. El ciclo de vida es completado cuando los tripomastigotes son tomados durante la alimentación de la chinche y en el estómago medio del insecto, éstos se transforman en la forma de epimastigotes. Los factores que controlan la diferenciación a formas metacíclicas en el estómago medio del insecto aún son inciertos, pero el proceso es posiblemente a través de una lectina de la pared del estómago que se une a los receptores de superficie del parásito. Las formas metacíclicas finalmente migran al estómago posterior de donde pueden ser vaciados a las heces (Warren, 1993).

3.2.3 Patología en humanos

Tres estados son reconocidos en la enfermedad de Chagas: una fase aguda de duración corta con parásitos en circulación sanguínea y una fase crónica de larga duración, separadas por una larga fase clínicamente asintomática llamada fase indeterminada. Diferentes órganos pueden estar involucrados en cualquier momento durante la primera y tercera fase y la enfermedad puede ser fatal en cualquiera de estas dos fases.

Fase Aguda:

Existe un periodo de incubación que generalmente es asintomático y dura de 4-10 días. Algunas veces, y cuando la transmisión se hizo por triatómicos, aparece una inflamación localizada en la puerta de entrada llamada Chagoma. Los signos y síntomas son diferentes según el sitio de infección. Cuando ocurre una infección a través de la

conjuntiva o la piel del párpado se forma una celulitis perioftálmica rojiza, indolora, con un característico edema (signo de Romaña- Mazza).

La fiebre es el signo más importante en esta etapa, observándose en el 95 % de los casos agudos. Generalmente la fiebre se acompaña de cefalea, astenia, malestar general, mialgias, artralgias e hiporexia. La duración del periodo febril guarda relación con la parasitemia, persistiendo de 2-4 semanas después de detectados los tripomastigotes en sangre.

La hepatoesplenomegalia se presenta en el 30-40 % de los casos con repercusiones clínicas y ocurre en forma precoz pero discreta. El hígado suele aumentar rápida e intensamente de volumen si se instala una insuficiencia cardíaca aguda.

La meningoencefalitis es rara y de pronóstico sombrío, se presenta principalmente en lactantes. En estos casos son comunes los fenómenos convulsivos generalizados, con crisis frecuentes o espaciadas. En casos menos graves, el compromiso del SNC se limita a una irritación meníngea fugaz manifestándose como contracturas o parálisis focalizadas.

La cardiopatía es común en esta fase y parece ser la lesión anatomopatológica más frecuente, ocurriendo en aquellos pacientes que en vida presentan signos mínimos de compromiso cardíaco. Los casos graves de miocardiopatía chagásica aguda pueden evolucionar hacia la insuficiencia cardíaca congestiva, a veces de instalación súbita y curso violento, que conduce a la muerte en cuestión de horas o días (Rassi *et al.*, 2001).

Fase indeterminada

Durante la fase indeterminada desaparece la sintomatología y el individuo se considera curado. Sin embargo, la serología es positiva y con frecuencia se encuentran datos electrocardiográficos y ecocardiográficos sugestivos de miocarditis.

La información disponible muestra que los siguientes cambios pueden ocurrir: a) fibrosis, periganglionitis y reducción en el número de neuronas en el sistema nervioso autónomo, especialmente en el sistema parasimpático, b) fibrosis local y c) miocarditis media focal con ausencia de lesiones.

Después de aproximadamente 10 -20 años, que dura la fase indeterminada, la enfermedad de Chagas evoluciona hacia la enfermedad crónica (WHO, 1991).

Fase crónica.

La fase crónica de la enfermedad de Chagas se manifiesta casi siempre en personas de 20-50 años. Puede ocurrir que en las fases iniciales el paciente sea hipo o asintomático, e inclusive el examen físico no revele ninguna anomalía o apenas una cardiomegalia discreta.

Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CCC);

La Cardiomiopatía chagásica crónica instalada en su evolución natural avanza insidiosamente hacia la insuficiencia cardíaca pero aunque en las áreas endémicas frecuentemente se ve interrumpida por la muerte súbita, alrededor del 40 % de los casos muestran una evolución benigna permitiendo una supervivencia del enfermo hasta los 60 años o más (Velasco-Castrejón, 1991).

Las características más importantes son: a) miocarditis crónica activa, difusa y severa, con infiltrados celulares principalmente de macrófagos y linfocitos, b) hipertrofia de fibras miocárdicas, a veces con atrofia local de miocitólisis, c) reemplazamiento de fibras miocárdicas por fibrosis intersticial y focal y d) cambios inflamatorios fibróticos y vasculares del tejido conductivo.

En la CCC existen otras alteraciones viscerales debidas a la acción directa del parásito, como la denervación, el estasis sanguíneo, los fenómenos isquémicos y desde luego los fenómenos inmunes y autoinmunes. Los órganos así afectados pueden ser duodeno, estómago, intestino delgado, hígado, vías biliares extrahepáticas, páncreas, bronquios, pulmón y tracto urinario y además produce alteraciones secretorias a nivel de glándulas salivales y sudoríparas (Velasco-Castrejón, 1991).

Otras formas clínicas.

Las megavisceras (megacolon y megaesófago) son frecuentes en algunas regiones de Brasil, obedecen a la disfunción motora de los segmentos del esófago y colon debido a la denervación parasimpática intramural. No hay hallazgos microscópicos o de grosor específicos que puedan diferenciar entre un megaesófago o megacolon asociado con la infección, solo la rara demostración de amastigotes. Los pocos cambios microscópicos observados en un megaesófago y megacolon son infiltraciones locales medias de células mononucleares en la cubierta muscular y en el plexo mientérico (WHO, 1991).

3.2.4. Diversidad de aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*

Los síntomas clínicos tan diversos en la infección humana por *T. cruzi* y las diferencias biológicas entre las cepas del parásito condujeron a la hipótesis de que *T. cruzi* es una especie heterogénea. La diversidad de *T. cruzi* fue confirmada inicialmente por caracterización fenotípica de los aislados del parásito efectuando electroforesis de isoenzimas. Se demostró que existen al menos tres grupos principales de cepas o "zymodemas" de *T. cruzi* llamadas; Z1, Z2 y Z3, cada una conteniendo muchas cepas distintas. La diversidad dentro del zymodema 2 es particularmente marcada, fue originalmente descrita en el centro y este de Brasil, está involucrado en los ciclos de

transmisión doméstica (que incluye al humano) mientras que Z1 fue encontrado predominantemente en la transmisión selvática (Brenière *et al.*, 1999)

En estudios más profundos de los fenotipos de isoenzimas de *T. cruzi*, se ha demostrado una fuerte correlación entre los grupos Z1, Z2 y Z3 con el genotipo definido a través de perfiles de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD por sus siglas en inglés). Además se han usado otros 2 métodos para profundizar en el estudio de genotipos; uno basado en el análisis de polimorfismos de genes ribosomales amplificados con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el otro basado en análisis del polimorfismo de los genes del miniexón, estos dos métodos han indicado la presencia de por lo menos 2 principales linajes genéticos de *T. cruzi* llamados linaje genético I y linaje genético II, que al parecer corresponden a Z2 y Z1 respectivamente (Stothard *et al.*, 1999).

Los aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi* también han mostrado un alto grado de heterogeneidad en muchas de sus propiedades biológicas. *in vitro* se ha observado diferencia en la tasa de crecimiento, en la transformación de epimastigote a la forma tripomastigote y en la infectividad y lisis de células Vero y células p388 (López-Olmos *et al.*, 1998). *In vivo*, la mortalidad inducida por los diferentes aislados mexicanos de *T. cruzi* es muy variable. En la figura 6 se puede observar que existen aislados que causan una mortalidad del 100 %, otros que causan una mortalidad intermedia y otros más que no causan mortalidad (Espinoza *et al.*, 1998 y Caballero-García, Tesis de licenciatura. 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

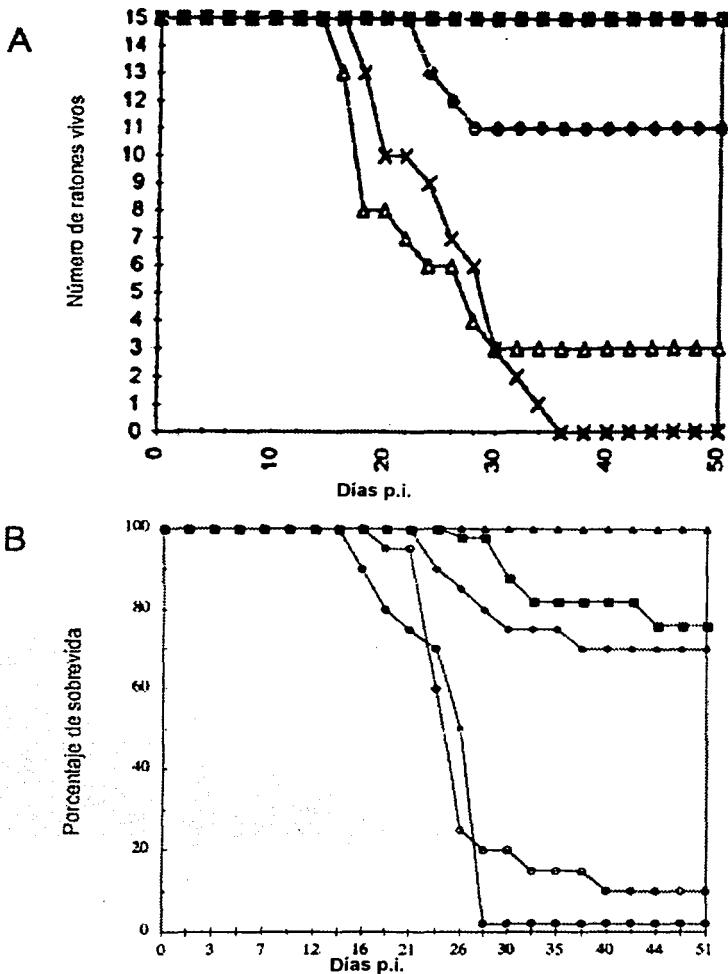


Figura 6 Mortalidad inducida por aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi* en ratones Balb/cAnN infectados con 1×10^5 tripomastigotes A) Aislados: Ninoa ■, H5 ●, Querétaro Δ, y Z10 X. B) Aislados: JRA ▲, JBE ■, JJO ◆, JFR ○ y JAL ● n= 20. (Tomado de Espinoza *et al.*, 1998 y Caballero-García, Tesis de licenciatura, 1999)

Los análisis geonómicos de los aislados JRA, JBE, JJO JFR y JAL presentados en la figura 6B mostraron claramente 2 patrones distintos de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP's) los que permiten agrupar a los aislados en dos grupos que muestran correlación con la mortalidad inducida *in vivo*. (Espinoza *et al.*, 1998). En otro estudio se analizaron 56 aislados por medio de la técnica de RAPD, en los cuales se observó que solo 2 aislados (3.6% de la muestra) pertenecen al linaje genético II mientras que el resto pertenecen al linaje genético I, por lo que se puede afirmar que los aislados mexicanos forman un grupo homogéneo con distancias genéticas reducidas entre sus miembros (Bosseno *et al.*, 2002).

JUSTIFICACIÓN

Se han descrito funciones inmunomoduladoras para diversos micronutrientes tales como la vitamina A, el beta caroteno, el ácido fólico, la vitamina B₁₂, la vitamina C, la riboflavina, el hierro, el zinc, y el selenio (Bhaskaram P. 2002). Está reportado que la deficiencia de biotina causa una disminución en la proporción de células B en el bazo, provoca un arresto en la maduración de timocitos (Báez Saldaña, Tesis de doctorado. 1998) y tiene efectos adversos en las funciones inmunes celulares y humorales (Zemleni and Mock, 1999).

Sin embargo, aún no se ha caracterizado si la deficiencia de biotina modifica el curso de una enfermedad parasitaria experimental, por lo que es necesario determinar si los efectos de la deficiencia de biotina en el sistema inmune alteran la capacidad de los individuos para resistir a una infección parasitaria.

El modelo en ratón de la infección por *T. cruzi* presenta características que hacen ventajoso el estudio de la participación de la biotina en el sistema inmune frente a una infección parasitaria debido a que presenta las mismas fases de infección que en el humano. El ratón es infectado naturalmente por el parásito, actúa como reservorio (WHO, 1991), desarrolla una cardiomiopatía chagásica crónica similar a la de los humanos (Guarner *et al.*, 2001) y se conoce mucho acerca de las características de la inmunidad del hospedero, tanto mediada por células contra el parásito (Dos Reis, 1997), como por anticuerpos (Kumar and Tarleton, 1998 y Umekita and Mota, 2000). Ambos modelos, el de la deficiencia de biotina y el de la infección con *T. cruzi*, ya se han establecido previamente en la cepa Balbc/AnN de ratón (Báez-Saldaña *et al.*, 1998 y Espinoza *et al.*, 1998).

HIPÓTESIS

Los ratones deficientes de biotina son más susceptibles a la infección con una cepa no virulenta de *T. cruzi* que los ratones no deficientes.

OBJETIVOS

GENERAL

Caracterizar la infección con la cepa no virulenta "Ninoa" de *Trypanosoma cruzi* en ratones deficientes de biotina.

PARTICULARES

- 1) Estudiar el estado funcional de la biotina en los ratones con dietas control, suficiente y deficiente de biotina por medio de:
 - a) Evaluación de la ganancia de peso corporal.
 - b) Monitoreo de las actividades específicas de las enzimas dependientes de biotina ACC, PCC y PC en el hígado de los ratones en estudio.
- 2) Valorar la virulencia de la cepa Ninoa de *T. cruzi* en los ratones deficientes de biotina
- 3) Determinar el curso temporal de la carga parasitaria en sangre periférica en los ratones en experimentación infectados con una cepa no virulenta (Ninoa) de *Trypanosoma cruzi*.
- 4) Medir la producción de anticuerpos anti-*T. cruzi* Ninoa en ratones deficientes y controles infectados con este parásito.
- 5) Identificar si hay diferencias entre ratones inoculados con *T. cruzi* suficientes y deficientes de la vitamina en el reconocimiento de antígenos de *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones: Se usaron 5 lotes de ratones machos de la cepa Balb/cAnN de 4 semanas de edad producidos y mantenidos en condiciones de barrera en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UNAM. Los ratones se marcaron aleatoriamente en la oreja y se separaron en 3 grupos experimentales al momento de iniciar el estudio. El grupo control se alimentó con dieta comercial no purificada (número de catalogo 8626; Harlan Teklad), el grupo deficiente con un alimento agotante de biotina que contiene 30 % de clara de huevo como única fuente de proteína y carece de biotina (número de catalogo 44475 Test Diet Purina) y el grupo suficiente con alimento que contenía también 30 % de clara de huevo pero adicionada con 0.004 g/Kg. de biotina para asegurar el suministro necesario de la vitamina en el alimento (número de catalogo 44474 Test Diet Purina). La clara de huevo contiene avidina que une a la biotina de forma específica y con alta afinidad impidiendo su absorción hacia la sangre (Spencer and Brody, 1964). El peso corporal de cada ratón se registró el mismo día de cada semana usando una balanza granataria (Sartorius BL150 Ag Göttingen).

Parásitos: Los parásitos utilizados fueron de la cepa mexicana de *T. cruzi* Ninoa, (Monteón *et al.*, 1996) mantenidos por personal del laboratorio de la Dra. Bertha Espinoza del IIB, UNAM. La infección con la cepa Ninoa ya se ha caracterizado biológica e inmunológicamente. Esta cepa fue aislada de un paciente humano del estado de Oaxaca (López-Olmos *et al.*, 1998) y se seleccionó debido a que no produce mortalidad en el ratón Balb/cAnN. Los estudios de la infección experimental con esta cepa en roedores han mostrado que la parasitemia en circulación sanguínea se presenta entre los 16 y 43 días post infección (p.i.) con un promedio máximo de parásitos de 1.6 ± 0.1 millones/mL en el día 27 p.i. Los anticuerpos se empiezan a detectar desde el día 22 p.i. y aumentan

de manera continua hasta el día 50 p.i. El reconocimiento de proteínas antigénicas comienza de una manera débil desde el día 4 hasta el día 20 p.i. y tiene el mayor reconocimiento a partir del día 40 p.i. cuando se considera que inicia la fase crónica (Caballero-García, 1998).

Mantenimiento de la cepa: Cada 28 días, los ratones hembras Balb/cAnN inoculados con 500 mil tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Ninoa se sangraron por el plexo axilar bajo anestesia con éter etílico. La sangre obtenida de 3 ratones se mezcló y de ésta se tomó una alícuota para determinar la concentración de parásitos contándolos en una cámara de Neubauer y un microscopio óptico. Una vez conocida la concentración de los parásitos, se tomó la cantidad de la sangre que contenía 500,000 tripomastigotes y se inyectó a otro ratón hembra Balb/cAnN con una jeringa para insulina por vía intraperitoneal.

Infección: A las 4 semanas de recibir las dietas correspondientes, los individuos de cada grupo experimental se subdividieron en 2 grupos: infectados (10 individuos por dieta) y no infectados (6 individuos por dieta) y cada ratón del grupo infectado se inoculó por vía intraperitoneal con 100 mil tripomastigotes cultivados en los ratones hembras como se describió en el párrafo anterior. La concentración de tripomastigotes en la sangre por administrar se ajustó con PBS estéril para tener un volumen total de 300 μ L por individuo, mismos que se inyectaron usando una jeringa de insulina para cada ratón. Los ratones del grupo no infectado se inocularon con 300 μ L de PBS estéril.

Sangrado: Cada ratón se sangró una vez por semana, el mismo día en que se pesó. El sangrado se llevó a cabo de 2 formas; en el primer lote de ratones se utilizó una cámara de eterización para anestesiarlos y una vez que se tenían bajo anestesia profunda, se les extrajeron de 5-7 gotas de sangre a través de un capilar heparinizado colocado en el plexo ocular. Para medir la parasitemia, se colocó una gota de sangre en un tubo Eppendorf que contenía 3.5 μ L de heparina y del resto de la sangre se separó el suero. Para evitar el uso del éter en los ratones del cuarto y quinto lote, éstos se sangraron sin anestesiar a través de un corte con tijeras en la región distal de la cola y en un tubo con 4 μ L de heparina se depositaron 10 μ L de sangre. Para obtener el suero de los ratones, otros 10 μ L de sangre de cada uno de los ratones que recibía la misma dieta se depositaron en otro tubo Eppendorf para obtener una mezcla de sueros. El suero se separó de las células por centrifugación a 8 °C durante 15 min a 1500 g, después de incubar la sangre a 37 °C durante ½ hora y a 4°C durante dos horas. Los sueros obtenidos se almacenaron a - 20°C hasta el momento de usarse.

Concentración de parásitos: Para medir la concentración de parásitos en sangre periférica se empleó una modificación del método de Hoff (1974). Los parásitos procedentes de la sangre se contaron en la cámara de Neubauer utilizando un microscopio óptico (Axioskop Zeiss 114015 Germany) con objetivo 20X. La carga parasitaria se determinó cada semana, durante las semanas 1, 2, 5 y 6 p.i. y 2 veces por semana durante el pico máximo de parasitemia en las semanas 3 y 4 p.i. El conteo se hizo diluyendo la sangre desde 1:2 hasta 1:10 con solución hemolizante (ACK, Apéndice A).

Actividad específica de las carboxilasas: Las actividades específicas de PC, PCC y ACC se midieron en el hígado de un ratón con cada dieta (deficiente, suficiente y control no

infectados) a las 4, 8 y 12 semanas. Los hígados extraídos se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis; cuando se homogenizaron en 5 ml de PBS frío con un pistón de politetrafluoroetileno. El homogenado se centrifugó a 1 500 X g, 10 minutos a 4°C , se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 2 mL de solución hemolizante ACK y se dejó reaccionar durante 2 min para lisar los eritrocitos. Después se agregaron 13 mL de PBS frío y se centrifugó nuevamente a 1 500 X g por 10 min. a 4°C , se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1 mL de PBS (ver apéndice A). De esta suspensión se tomaron 100 μL que se diluyeron 1:10 con Buffer de lisis y las células hepáticas se lisaron aplicando 20 descargas de 24 W con un homogenizador ultrasónico (4710 Series; Cole Parmer Instrument Co. Chicago). Con los homogenados se realizó el método radioenzimático como se describe en Báez-Saldaña *et al.*, (1998).

Ensayos de ELISA: a) Sensibilización. Se sensibilizaron placas RIA/IEA Costar 3590 aplicando 100 μL de extracto total del aislado Ninoa, a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en buffer de carbonatos 0.1 M pH 9.6, y se incubó 2 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. La placa sensibilizada se lavó tres veces con 200 μl por pozo de PBS-Tween 20 al 0.05%, durante cinco minutos cada lavado, luego se bloqueó con 200 μl de albúmina sérica bovina (BSA Sigma) al 1% en PBS, incubando por 1h a 37°C . b) Medición. se colocaron 100 μl por pozo de los sueros de los ratones de cada dieta en dilución 1:50 con PBS-Tween 20 y la placa se incubó por 16 hrs a 4°C . Se lavó tres veces con 200 μl por pozo de PBS-Tween 20 durante cinco minutos y se agregaron 50 μl de una dilución 1:1000 en PBS Tween 29, de IgG de cabra anti-ratón específico para la cadena gamma de la IgG murina, conjugado con fosfatasa alcalina (No cat. 62-6622 Zymed) y se incubó por 2 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. c) Revelado. Después de la incubación con el segundo anticuerpo, la placa se lavó tres veces con 200

μl por pozo de PBS-Tween, durante cinco minutos cada lavado y se agregaron 100 μl/pozo de sustrato p- nitrofenil fosfato disódico (1mg/mL) en buffer de dietanolamina al 10 % pH. 9.8, se incubó a temperatura ambiente durante 12 min. La reacción se paró agregando 50 μl/pozo de NaOH 2N. La absorbancia a 405 nm se midió en los siguientes 2 min en un espectrofotómetro (BIO-RAD modelo 3550) (Sánchez *et al.*, 2001).

Western blot. Se realizó la separación de 150 μg de proteína del extracto total del aislado Ninoa de *T. cruzi* por electroforesis en gel de Poliacrilamida al 12 % con SDS (PAGE-SDS) durante una hora a 200 V. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 1h 10' a 100 V. Luego la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para verificar la transferencia de las proteínas y posteriormente se destiñó con PBS. La membrana se cortó en tiras de 3 mm de ancho c/u, guardando una tira para teñirla con amido negro y verificar el corrimiento. Las tiras se bloquearon con leche descremada al 1% en PBS incubando con agitación lenta durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del bloqueo se retiró la leche y cada tira de la membrana se incubó con una muestra de suero de ratones controles suficientes y deficientes de biotina diluido 1:200 en leche descremada al 1% en PBS por 16 hrs a 4°C y con agitación suave. Las membranas se lavaron 3 veces por 10 minutos con 1 ml de PBS Tween 20 al 0.1 % con agitación fuerte y en seguida se agregó el segundo anticuerpo, una IgG de conejo anti-IgG de ratón (específico de la cadena gama) conjugada con peroxidasa de rábano (Zymed cat no 61-6020) en dilución 1:200 con PBS Tween 20 al 0.1%, incubando 2 horas a T.A. con agitación suave y luego se lavaron 3 veces con 1mL de PBS Tween 20 al 0.1 % por 10 min con agitación fuerte. La reacción se reveló agregando el sustrato 3,3'-diaminobenzidina en concentración de 0.5 mg/mL en PBS y con peróxido de hidrógeno al

0.02 %. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente; se paró y se lavó con agua destilada 3 veces por 10 min con agitación fuerte. (Sánchez *et al.*, 2001).

Análisis de datos: Con los datos obtenidos se elaboraron gráficas con el programa Excel (Office 2000), los análisis de varianza de una y dos vías así como las pruebas de comparaciones múltiples con el método de Tukey fueron realizadas con el programa Sigma Stat (número de catalogo Z36,578-5 Sigma).

RESULTADOS

PESO CORPORAL

Los datos presentados en esta sección corresponden a 3 de los 5 lotes experimentales utilizados, 2 lotes fueron excluidos del análisis final por diversas razones entre las que se encuentran: ausencia de grupos de ratones no infectados y comportamiento inusual en ganancia de peso y mortalidad.

Los ratones fueron pesados cada semana durante el estudio que incluyó las 4 semanas iniciales necesarias para establecer la deficiencia de biotina con el alimento depletante y 9 semanas adicionales para incluir las dos fases, aguda y crónica, de la infección con *T. cruzi*. La fase aguda comprende las primeras 6 semanas post infección (42 días p.i.) y la fase crónica comienza al término de la fase aguda (semana 10 en adelante). En la tabla 2 se presentan las medias \pm DE del peso corporal de ratones no infectados de cada uno de los 3 lotes estudiados y el promedio general \pm DE de todos los datos de los 3 lotes.

En la figura 7A se muestra la representación gráfica del peso corporal de los 3 lotes de ratones no infectados, donde se observa que los grupos controles y suficientes tuvieron una ganancia de peso corporal continua desde la semana 0 hasta la semana 13 de estudio. En contraste el grupo deficiente tuvo ganancia de peso menor en casi 2 gramos desde la semana 0 hasta la semana 4 en comparación con los otros dos grupos; después de esta semana se presentó una meseta donde no hubo ganancia de peso corporal hasta la semana 11 en que comenzó a disminuir. El peso máximo que alcanzaron los ratones

del grupo control fue de 26.15g (semana 12, n= 8); 26.36g (semana 12 n=8) los del grupo suficiente y 21.20g (semana 10, n= 8) los animales del grupo deficiente.

En un análisis de varianza de dos vías (ANOVA paramétrica), los pesos de los ratones alimentados con las dietas control y suficiente no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.09$); en comparación, el peso de los ratones alimentados con la dieta deficiente presentó diferencias estadísticamente significativas ($p<0.01$) con los grupos control y suficiente. En la figura 7A se señalan las semanas donde la prueba de Tukey indica que hay diferencias significativas entre los pesos de los ratones deficientes en comparación con los controles y suficientes.

En la tabla 3 se muestran los datos de los 3 lotes infectados analizados y el promedio global. Aunque en el lote 2 el peso de los individuos con la dieta suficiente fue mayor al inicio del estudio, el promedio general del peso para los tres grupos de ratones fue similar (control 17.3, suficiente 17.8 y deficiente 16.1, n= 29).

En la figura 7 B se observan las curvas de peso corporal de los 3 grupos infectados, en donde la flecha indica el momento de la infección.

El análisis estadístico para el grupo infectado, por ANOVA de dos vías (n=10) y la prueba de Tukey, mostró que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) entre los tres grupos en las semanas 0-2 y que el peso de los ratones del grupo deficiente fue menor que los controles y suficientes desde la tercera semana hasta el final del estudio (Fig. 7B).

Tabla 2 Peso corporal promedio y desviación estándar (DE.) de ratones no infectados para los tres lotes por separado y promedio general de los datos de los 3 lotes. (*) Diferencia estadística con el grupo suficiente y control, (-) muestra menor a 3 ratones

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Lote 1														
Control	19.45	21.41	22.34	23.52	23.14	22.90	25.13	25.10	26.01	26.28	25.86	25.17	26.28	26.90
DE.	0.49	0.48	0.57	0.81	1.22	0.87	0.64	0.41	0.91	0.61	0.59	1.99	1.36	0.20
Suficiente	19.84	20.80	20.71	21.39	22.86	22.31	24.56	23.21	24.83	24.99	24.04	25.47	27.66	27.63
DE.	1.85	1.54	1.28	1.38	1.91	0.90	1.15	1.17	1.17	1.25	1.99	1.78	1.58	1.40
Deficiente	18.83	19.05	18.13	17.12	20.61	21.83	21.83	21.77	22.98	22.25	22.45	21.37	20.78	21.00
DE.	0.79	0.61	0.82	0.34	0.37	0.06	0.59	0.60	0.46	0.09	0.02	0.18	0.25	0.24
Lote 2														
Control	16.26	18.98	19.97	20.86	22.09	22.15	22.76	23.57	24.87	25.26	26.82	26.57	27.10	26.28
DE.	1.67	1.98	1.64	2.19	2.38	2.42	2.36	2.50	2.13	5.12	3.41	2.70	2.58	2.71
Suficiente	16.20	18.27	20.68	21.13	22.12	22.27	22.34	23.31	23.59	23.63	23.68	23.98	24.40	25.07
DE.	1.77	1.39	1.37	1.43	1.28	1.60	1.07	1.26	1.29	1.06	1.22	1.34	1.00	-
Deficiente	17.10	18.77	20.35	21.33	21.97	22.28	22.31	22.95	22.17	21.66	22.62	22.40	20.45	20.54
DE.	0.90	0.64	0.75	0.86	0.63	0.92	1.18	0.91	1.07	0.27	1.92	1.20	1.22	1.07
Lote 3														
Control	15.43	18.48	19.89	20.31	22.12	22.54	22.48	23.57	24.05	24.06	24.92	25.51	25.12	25.18
DE.	3.00	2.41	1.29	1.85	2.94	0.71	0.58	0.80	0.55	1.04	0.68	1.13	0.03	0.63
Suficiente	15.65	18.81	20.12	20.61	21.64	22.82	23.91	23.95	25.28	24.61	25.91	25.75	26.38	23.38
DE.	2.55	1.32	1.21	0.94	0.50	0.69	0.98	0.50	0.51	0.89	1.42	0.97	1.26	0.68
Deficiente	16.11	17.90	18.19	16.24	17.74	16.92	18.28	15.98	17.04	17.64	17.14	16.66	17.55	14.96
DE.	1.29	0.90	1.35	1.41	1.68	1.54	2.09	2.37	0.91	0.33	0.32	0.78	1.77	-
Promedio General Lotes 1+2+3														
Control	16.65	19.32	20.45	21.24	22.34	22.43	23.08	23.85	24.85	25.07	25.87	25.82	26.15	26.12
DE.	2.52	2.16	1.63	2.14	2.29	1.63	1.85	1.76	1.64	2.95	2.07	1.85	1.73	1.47
Suficiente	16.78	19.01	20.49	21.00	22.11	22.48	23.51	23.52	24.47	24.51	24.65	25.20	26.36	25.79
DE.	2.56	1.63	1.23	1.21	1.22	1.07	1.35	0.97	1.23	1.07	1.74	1.42	1.77	2.31
Deficiente	17.12	18.52	19.11	18.61	20.13	20.25	20.75	20.20	20.79	20.80	21.20	20.71	19.81	19.76*
DE.	1.41	0.84	1.46	2.64	2.28	2.84	2.41	3.67	2.74	1.98	2.81	2.68	1.75	2.46

Tabla 3) Peso corporal promedio y DE. de ratones infectados de los tres lotes por separado y promedio general de los datos de los 3 lotes.

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Lote 1														
Control	17.49	21.13	22.54	23.78	23.96	25.33	26.17	24.70	25.23	24.24	23.70	24.72	24.94	25.03
DE.	1.94	0.83	1.10	0.63	1.05	1.02	1.04	1.53	1.22	1.39	1.00	0.54	1.85	1.10
Suficiente	17.10	19.12	20.16	21.21	22.29	22.81	24.73	22.87	22.08	22.88	22.63	24.61	25.31	25.67
DE.	2.69	1.37	1.28	1.64	1.97	1.55	2.51	1.95	3.01	2.35	2.63	0.68	0.45	0.55
Deficiente	16.19	17.94	18.38	19.81	19.93	20.37	21.51	19.92	18.38	18.40	18.97	19.54	19.85	19.82
DE.	1.78	1.69	1.44	1.29	1.22	1.31	1.67	1.93	1.43	1.96	1.89	2.05	1.59	1.74
Lote 2														
Control	17.93	20.56	21.81	22.53	23.04	23.47	25.17	24.36	23.65	23.94	25.40	25.86	26.37	26.95
DE.	2.33	1.48	1.81	2.02	1.78	2.03	2.03	1.40	1.86	2.18	1.53	1.54	1.10	1.19
Suficiente	19.86	20.81	21.75	22.50	22.83	23.41	25.12	20.99	21.58	23.38	24.59	25.03	25.98	26.40
DE.	1.21	1.29	1.46	1.28	1.04	0.96	1.19	2.60	2.98	3.50	3.20	3.00	2.10	1.92
Deficiente	15.77	17.80	19.43	19.98	21.14	20.80	19.40	17.74	17.49	19.15	18.59	20.15	20.68	19.80
DE.	0.89	1.04	1.13	1.44	1.38	1.91	2.33	2.17	2.50	2.92	3.06	1.10	1.20	2.20
Lote 3														
Control	16.41	19.57	20.62	21.20	21.79	23.02	24.26	24.47	24.41	23.97	24.11	24.42	24.80	24.40
DE.	1.64	1.08	0.82	0.83	0.85	0.94	0.78	0.83	1.00	1.15	1.28	0.66	0.50	0.61
Suficiente	16.44	19.71	20.91	21.67	22.57	23.69	24.96	23.79	23.52	22.57	23.48	24.44	24.65	25.11
DE.	2.73	2.03	1.40	1.39	1.26	1.38	1.73	1.46	1.35	0.80	1.14	0.99	1.78	1.69
Deficiente	16.56	17.81	18.24	18.56	18.56	17.98	19.06	18.28	19.69	21.48	20.99	20.82	21.15	20.36
DE.	1.11	0.85	1.35	1.71	1.76	2.48	2.91	3.25	3.10	0.93	2.22	1.56	1.10	1.22
Promedio General Lotes 1+2+3														
Control	17.31	20.45	21.69	22.55	22.97	23.97	25.23	24.51	24.43	24.06	24.43	24.97	25.33	25.42
DE.	2.03	1.30	1.50	1.66	1.54	1.72	1.57	1.29	1.53	1.51	1.40	1.06	1.41	1.41
Suficiente	17.85	19.89	20.94	21.80	22.56	23.29	24.94	22.52	22.38	22.90	23.47	24.67	25.25	25.67
DE.	2.69	1.68	1.52	1.50	1.45	1.32	1.83	2.30	2.58	2.10	2.27	1.58	1.55	1.47
Deficiente	16.19	17.86	18.63	19.47	19.84	19.75	20.16	18.87	18.49	19.72	19.60	20.17	20.54	20.03
DE.	1.38	1.27	1.38	1.55	1.72	2.20	2.49	2.55	2.27	2.27	2.38	1.65	1.34	1.46

En la 3ª y 4ª semana p.i (7ª y 8ª semana de estudio) el peso de los tres grupos de ratones infectados disminuyó (Fig.8). Si bien esta disminución no fue significativa cuando se comparó con su respectivo grupo no infectado, sí fue reproducible en todos los lotes estudiados; siendo los ratones con dieta suficiente de biotina los más afectados (perdieron 2.6 g) lo que produjo que en estos tiempos los 3 grupos presentaran diferencias significativas ($p < 0.0305$). Aunque los ratones con dieta control fueron los que perdieron menor peso (1.2 g) el efecto se sostuvo durante 3 semanas en contraste con los ratones suficientes y deficientes que disminuyeron durante 2 semanas (hasta la semana 8). Los ratones deficientes perdieron 1.7 g y aunque la pérdida de peso causada por la infección fue distinta en los 3 grupos experimentales, se recuperaron después de 3 semanas de haber alcanzado la máxima reducción (tabla 3).

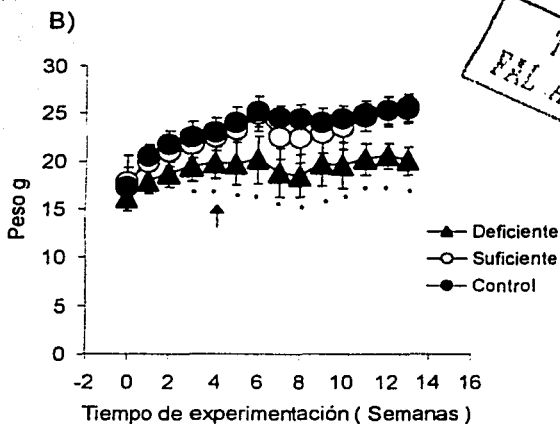
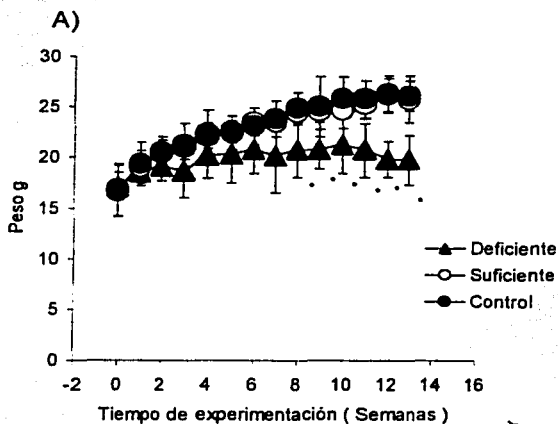


Fig. 7. Peso corporal. Se muestra el peso corporal promedio \pm DE. de ratones alimentados con una dieta comercial no purificada (● Control); con una dieta con clara de huevo como única fuente de proteína y suficiente de biotina (○ Suficiente), o con una dieta agotante de biotina (▲ Deficientes) A) No infectados, para los tres grupos: n=14 semanas 0-3; n = 13 semana 4; n = 11 semanas 5-7; n = 10 semana 8; n = 8 semanas 9-12; n = 6 semana 13. B) Infectados (↑ infección), n = 29 semanas 0-6; n = 27 semana 7; n = 19 semana 8; n = 11 semanas 9 y 10; n = 10 semanas 11-13. * Diferencia significativa con los grupos Control y Suficiente ($p < 0.05$)

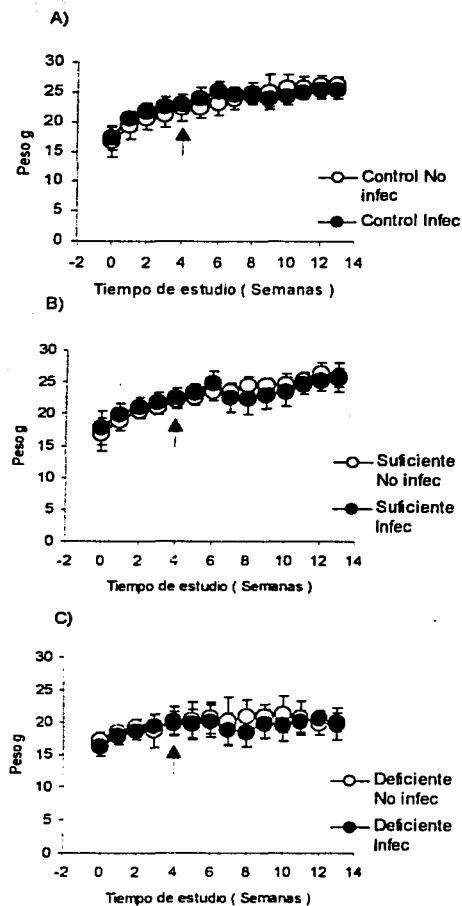


Fig. 8. Efecto de la infección en el peso corporal. El peso corporal promedio \pm DE. de ratones infectados (●) y no infectados (○), para A) ratones alimentados con una dieta comercial no purificada (Control); B) Ratones alimentados con una dieta agotante de biotina suplementada con biotina (Suficiente); C) Ratones alimentados con una dieta agotante de biotina (Deficientes). La n es la misma a la de la figura anterior para infectados y no infectados. (\blacktriangle Infección).

ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE CARBOXILASAS

En la tabla 4A se muestran las actividades específicas de las carboxilasas hepáticas expresadas como picomoles de CO_2 fijadas por minuto por miligramo de proteína ($\text{pmol CO}_2/\text{min} \times \text{mg}$) y en la tabla 4B se presentan estas actividades como porcentaje de la actividad media en el hígado de los ratones que recibieron la dieta control.

De las tres carboxilasas analizadas, la ACC es la que tiene la más baja actividad. En el hígado de los animales controles y suficientes tuvo actividad dentro del rango de 111 a 315 $\text{pmol CO}_2/\text{min} \times \text{mg}$, mientras que en el hígado de los ratones deficientes, desde la 4ª semana de estudio está disminuida, teniendo una actividad de 137 $\text{pmol CO}_2/\text{min} \times \text{mg}$ la cual corresponde a casi la mitad de la actividad que tuvieron en los hígados control y suficiente con 222 y 259 $\text{pmol CO}_2/\text{min} \times \text{mg}$ respectivamente, (Tabla 4B). La disminución avanzó conforme aumentó el tiempo de recibir la dieta depletante de la vitamina siendo casi 80% menor a las 12 semanas. Aunque a las 14 y 15 semanas se observó una recuperación de la actividad alcanzando 58% y 44% con respecto a la actividad de los controles, estas variaciones pueden deberse a las variaciones intra e interensayos (Tabla 4B).

La actividad específica de la PCC en el hígado de los ratones controles y suficientes fue de $16,033 \pm 7,442 \text{ pmol CO}_2/\text{min} \times \text{mg}$ ($n= 25$), cantidad que en promedio es 83.4 veces mayor que la de la ACC. Por otra parte la PC es la que presenta la actividad más alta dentro de con $25,141 \pm 9,866 \text{ pmol CO}_2/\text{min} \times \text{mg}$ ($n= 25$), siendo esta última alrededor de 130 veces más grande que la ACC y 1.6 veces mayor que la PCC.

Tabla 4. Actividad Especifica De Carboxilasas en el Hígado.

Semana	ACC			PCC			PC			n
	Control	Suficiente	Deficiente	Control	Suficiente	Deficiente	Control	Suficiente	Deficiente	
2	*	*	*	12,962	20,625	14,921	26,350	34,553	28,036	1C,1S,1D
4	222	259	137	17,674	18,413	10,658	28,233	33,652	14,194	2C,2S,2D
7	*	*	*	13,629	18,612	6,246	24,355	33,079	17,972	1C,1S,1D
8	132	140	36	4,851	7,980	2,951	11,619	19,706	6,325	2C,2S,2D
9	*	*	*	26,958	29,410	8,483	42,173	43,388	23,762	1C,1S,1D
12	152	315	67	13,345	15,018	4,755	18,226	24,243	5,519	2C,2S,2D
14	111	150	87	6,399	9,051	3,253	12,508	19,017	8,513	3C,2S,3D
± D.E.	4	32	59	434	1,972	576	2,493	4,968	5,080	
15	247	193	85	21,816	21,308	6,685	21,980	19,791	7,970	1C,1S,1D
Promedio semanas 4-15	192 ± 66		82 ± 37	16,033 ± 7,442		6,147 ± 2,788	25,141 ± 9,866		12,036 ± 6,849	25CS,13D

B

Semana	ACC		PCC		PC		n
	Suficiente	Deficiente	Suficiente	Deficiente	Suficiente	Deficiente	
2	*	*	159	115.1	131	106.4	1S,1D
4	116.7	61.7	104	60.3	119	50.3	2S,2D
7	*	*	137	45.8	136	73.8	1S,1D
8	106.1	27.3	165	60.8	170	54.4	2S,2D
9	*	*	109	31.5	103	56.3	1S,1D
12	207.2	44	113	35.6	133	30.3	2S,2D
14	135.1	78.4	141	50.8	152	68.1	2S,3D
15	78.1	34.4	98	30.6	90	36.3	1S,1D
Promedio semanas 4-15	128.6	49.2	123.8	45.1	128.9	52.8	12S,13D

* no medido

Actividad especifica de acetil CoA, propionil CoA y piruvato carboxilasa (ACC, PCC y PC) expresada como pmolCO₂/min.mg (A). Actividad especifica de las carboxilasas expresada en porcentaje con respecto al control (B).

De manera similar, la actividad específica de la PCC en los ratones del grupo deficiente fue de $6,147 \pm 130$ en promedio ($n=13$), valor que representa un 45.1 % con respecto a las actividades del grupo control, en cambio, los ratones del grupo suficiente, para el mismo intervalo de tiempo presentaron un 123.8 % de actividad con respecto al control.

Por último, la actividad específica de la PCC también se encontró disminuida en el grupo deficiente a partir de la 4ª semana, su actividad fue de $12,036 \pm 6,849$ lo cual representa un 52.8 % con respecto al control. En contraste los ratones del grupo suficiente tuvieron un porcentaje de la actividad específica de sus enzimas del 128.9 % con respecto al control

SOBREVIDA

La mortalidad de los ratones infectados se registró junto con el peso corporal cada semana a lo largo del estudio. En la Tabla 5 se muestran los porcentajes de sobrevida de cada uno de los lotes, así como el promedio general de los 3 lotes estudiados. Durante las 13 semanas de seguimiento post- infección no se registró mortalidad de los individuos del grupo control en ninguno de los 3 lotes; el grupo suficiente no presentó mortalidad en los lotes 1 y 3 y sólo tuvo un 40 % de mortalidad en el lote 2. En contraste, el grupo deficiente presentó una mortalidad de 70, 80 y 40 % en los lotes 1, 2 y 3 respectivamente.

Tabla 5. Porcentaje de sobrevivencia de los ratones de cada uno de los 3 lote y porcentaje general de los datos de los 3 lotes.

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Lote 1														
Control	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Suficiente	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Deficiente	100	100	100	100	100	100	100	100	75	50	33,3	33,3	33,3	33,3
Lote 2														
Control	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Suficiente	100	100	100	100	100	100	100	90	90	90	70	60	60	60
Deficiente	100	100	100	100	100	100	100	70	50	30	30	20	20	20
Lote 3														
Control	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Suficiente	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Deficiente	100	100	100	100	100	100	90	80	50	40	40	40	40	40
Promedio General Lotes 1+2+3														
Control	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Suficiente	100	100	100	100	100	100	100	96.7	96.7	96.7	90.0	86.7	86.7	86.7
Deficiente	100	100	100	100	100	100	97	84	59	41	34	31	31	31

En la figura 9 se presentan los porcentajes globales de los datos, con una n=29 para el grupo control, n= 30 para el grupo suficiente y n= 33 para el grupo deficiente. Ningún ratón del grupo control murió durante la experimentación, pero el grupo suficiente tuvo un porcentaje de mortalidad de 3.3 % en la semana 7, semana 3 post infección (Tabla 5), que aumentó al 10 % en la semana 10 y 13.3 % en la semana 11 para mantenerse con este valor hasta el final del estudio. El grupo deficiente, en cambio, presentó una mortalidad del 3 % en la semana 6, del 16 % en la semana 7 (semana 3 P.I.) aumentando a 66% en la semana 10 (semana 5 p.i.) y terminó con 69 % desde la semana 11.

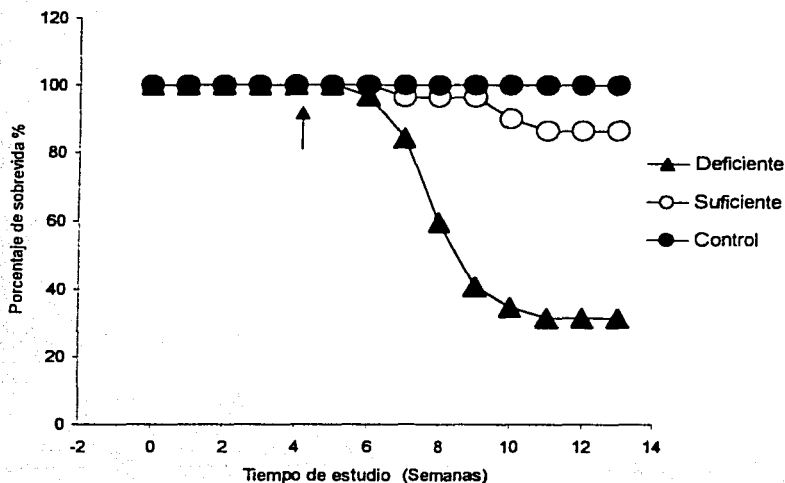


Fig. 9. Mortalidad. Porcentaje de sobrevivida de ratones infectados y alimentados con una dieta comercial no purificada (●Control), con una dieta agotante de biotina suplementada con biotina (○ Suficiente), y con una dieta agotante de biotina (▲ Deficientes), n=29 Controles, n=30 suficientes y n=32 deficientes. ↑ Infección con 100 mil tripomastigotes de la cepa Ninoa. de *T. cruzi*.

PARASITEMIA

Los ratones fueron infectados con 100 mil tripomastigotes de la cepa mexicana Ninoa y la concentración de parásitos en sangre periférica a distintos tiempos post -infección se determinó individualmente como se describió en Material y Métodos.

En la tabla 6 se presentan los promedios y desviación estándar (DE.) de cada uno de los tres lotes analizados, así como el promedio general y desviación estándar de todos los datos obtenidos. Para los tres lotes, en el grupo deficiente se observó en promedio una parasitemia mayor que la de los grupos suficientes y controles. Expresando la parasitemia como millones de parásitos por mL de sangre, los ratones del grupo control tuvieron 1.7 ± 0.7 , los del grupo suficiente 1.7 ± 1.2 y los del grupo deficiente 2.4 ± 1.3 .

En la figura 10A se graficaron los valores promedio (\pm DE) de la parasitemia en los ratones de los tres lotes y se puede observar que en general el grupo deficiente tuvo una curva de parasitemia mayor a la de los grupos suficientes y controles. En las semanas cercanas al pico de la curva, los grupos suficientes y controles tuvieron valores muy similares, cercanos a 1.6 millones de parásitos/mL, mientras que los del grupo deficiente tuvieron más de 2 millones de parásitos/mL. El ANOVA de dos vías no paramétrico (población no normal), balanceado con una $n = 17$, se realizó con los datos de los días 7, 14, 21, 24, 28 y 31 encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el grupo deficiente y los grupos control y suficiente ($p < 0.001$) pero no así, entre los grupos control y suficiente ($p = 0.997$), además por medio de la prueba de Tukey se encontraron diferencias significativas en los días 21 y 28 p.i.

Tabla 6. Promedio de Parásitos X 10⁶ en sangre periférica de ratones infectados con los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Días P.I.	7	14	21	24	28	31	35	42
Lote 1								
Control	0.002	0.058	1.433	1.489	1.144	0.813	0.360	0.150
DE.	0.001	0.024	0.941	0.796	0.550	0.253	0.152	0.000
Suficiente	0.004	0.090	1.811	2.200	1.350	1.186	0.720	0.150
DE.	0.002	0.071	0.917	1.903	0.759	0.570	0.205	0.050
Deficiente	0.002	0.123	2.742	2.433	2.736	1.667	1.450	0.175
DE.	0.000	0.084	1.000	0.925	1.690	0.859	0.129	0.150
Lote 2								
Control	0.009	0.230	1.336	2.053	2.479	1.344	0.181	
DE.	0.010	0.076	0.864	0.964	1.940	0.571	0.171	
Suficiente	0.008	0.172	0.939	1.428	1.625	1.917	0.983	
DE.	0.005	0.067	0.452	0.731	0.872	0.567	0.572	
Deficiente	0.006	0.167	1.417	2.529	1.940	1.667	0.615	
DE.	0.003	0.064	0.817	1.401	0.571	1.144	0.749	
Lote 3								
Control	0.002	0.193	1.344	1.569	1.125	0.650	0.011	0.002
DE.	0.001	0.041	0.479	0.423	0.426	0.237	0.011	0.002
Suficiente	0.002	0.126	1.128	1.494	1.064	0.893	0.015	0.047
DE.	0.001	0.070	0.615	0.913	0.416	0.386	0.007	0.034
Deficiente	0.002	0.109	1.330	1.533	2.200	1.370	0.011	0.022
DE.	0.001	0.081	0.592	0.671	1.182	0.985	0.006	
Promedio General Lotes 1+2+3								
Control	0.005	0.167	1.371	1.695	1.583	0.890	0.198	0.061
DE.	0.007	0.090	0.758	0.773	1.304	0.419	0.194	0.081
Suficiente	0.005	0.129	1.293	1.696	1.346	1.194	0.510	0.109
DE.	0.004	0.075	0.764	1.266	0.713	0.596	0.495	0.069
Deficiente	0.003	0.135	1.986	2.244	2.419	1.579	0.686	0.144
DE.	0.003	0.078	1.082	1.070	1.377	0.891	0.735	0.147

El pico máximo de parasitemia se registró en distintas fechas post-infección; incluso entre los individuos de un mismo grupo. En la tabla 7 se observa que para los ratones con dietas control y suficiente, la mayoría de los ratones presentaron la parasitemia máxima en el día 24, en cambio en el grupo deficiente no se observó en un día en particular: 9 la presentaron el día 21, 8 el 24 y 28 y 2 el 31 p.i

Tabla 7. Días post infección (p.i.) donde los ratones de los 3 grupos tuvieron su parasitemia máxima

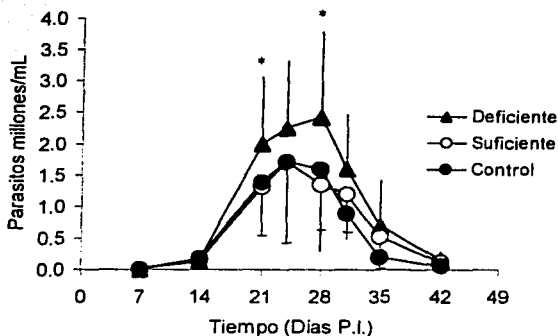
Día p.i.	Control	Suficiente	Deficiente
21	9	6	9
24	14	12	8
28	3	7	8
31	1	2	2
Total	27	27	27

La comparación entre la parasitemia máxima de los individuos que recibieron cada una de las dietas permite ver más claramente la diferencia estadística encontrada entre el grupo deficiente con los grupos control y suficiente (Fig. 10B). Aunque el promedio de la parasitemia máxima en los ratones deficientes de la vitamina que murieron fue mayor que en los que sobrevivieron, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8).

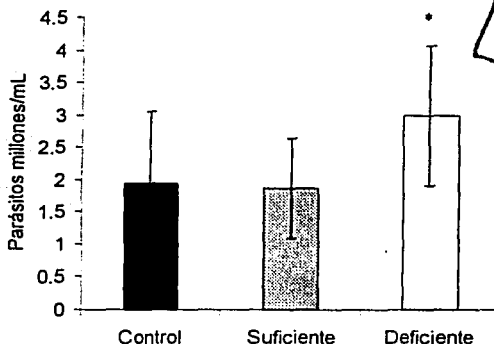
Tabla 8. Parasitemia máxima de ratones deficientes de biotina que sobrevivieron y que murieron

Sobrevivientes	No sobrevivientes
2.4 ± 1.2	3.1 ± 1.1

A) Curso Temporal De La Parasitemia



B) Parasitemia Máxima



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. 10.- Parasitemia en sangre periférica. Parasitemia promedio (\pm DE.) de ratones infectados con 100 mil tripomastigotes de la cepa mexicana Ninoa y alimentados con una dieta comercial no purificada (● Control) con una dieta agotante de biotina suplementada con biotina (○ Suficiente), o con una dieta agotante de biotina (▲ Deficientes) **A)** Curvas de parasitemia en la fase aguda de la infección, para los tres grupos n=24 día 7, n=27 días 14-21, n=25 día 24, n= 21 día 28, n= 17 día 31, n=13 día 35 y n=5 día 42. **B)** Parasitemia máxima del grupo control (barra negra) suficiente (barra gris) y deficiente (barra blanca) n=27. (*) Diferencia significativa con los grupos Control y Suficiente (p<0.05).

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

Se han descrito respuestas disminuidas de producción de anticuerpos en respuesta a inoculaciones con diversos antígenos en las ratas deficientes de biotina y por otra parte, se sabe que los anticuerpos anti *T. cruzi* son elementos importantes para el control de esta parasitemia durante la infección (Kumar and Tarleton, 1998). Para evaluar la respuesta de anticuerpos IgG anti-extracto total de *T. cruzi* de los ratones infectados y alimentados con cada una de las tres dietas (control, suficiente y deficiente) se realizaron ensayos de ELISA con sueros de los ratones de los lotes 1 y 3. En la figura 1A se muestra la cinética de producción de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* durante la fase aguda (0-39 días p.i) y para el día 60 de la fase crónica en los sueros de los ratones del lote 1. En este ensayo se incluyeron sueros de los ratones no infectados con cada una de las tres dietas, los cuales representaron el nivel basal de respuesta inespecífica. Los tres grupos no infectados tuvieron valores de densidad óptica menores de 0.07 a lo largo del estudio (n= 2 por grupo).

No hubo diferencia entre la producción de anticuerpos anti-*T. cruzi* entre los tres grupos de ratones con las dietas correspondientes (Fig. 11A). La densidad óptica de los sueros de los ratones aumentó gradualmente desde 0.34 ± 0.15 para el grupo control, 0.35 ± 0.15 en el grupo suficiente y 0.43 ± 0.15 en el grupo deficiente en el día 14 p.i, hasta 1.01 ± 0.2 en el grupo control, 0.97 ± 0.3 en el grupo suficiente y 0.902 ± 0.2 en el grupo deficiente en el día 39 p.i.

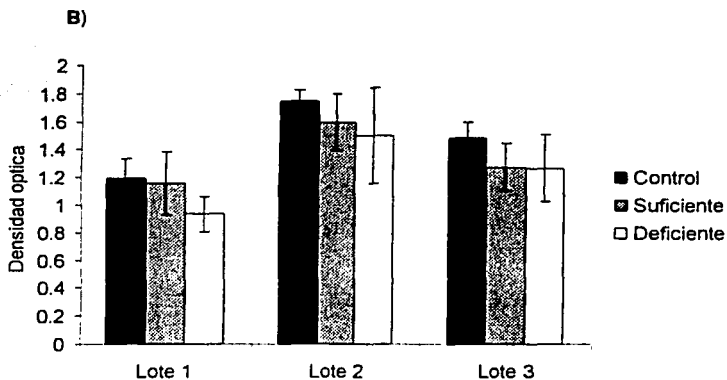
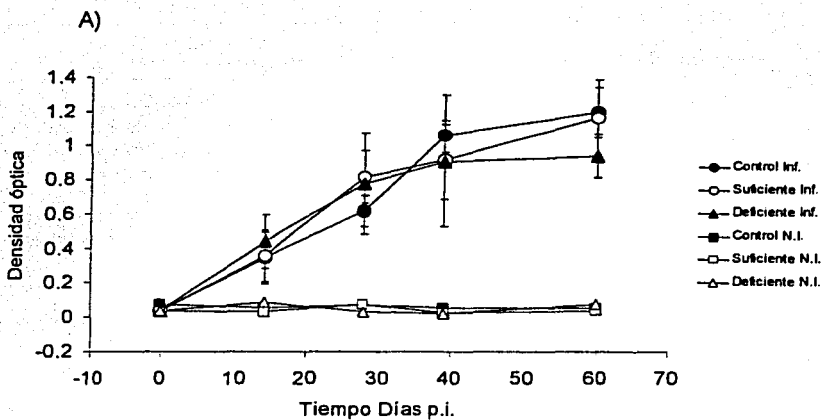


Fig. 11. Producción de anticuerpos de ratones infectados con la cepa Ninoa. A) Valor promedio \pm DE. de densidad óptica que representa la concentración de anticuerpos IgG anti-T. *cruzi* en los ratones alimentados con una dieta comercial no purificada (● Control); con una dieta depletante de biotina suplementada con biotina (○ Suficiente); o con una dieta depletante de biotina (▲ Deficientes). No infectados Control (■) Suficiente (□) y Deficiente (△). Para infectados n=10 día 14, n= 4 días 28-60 para los tres grupos. No infectados n= 2 días 14 - 60 para los tres grupos. B) Cantidad de anticuerpos IgG anti-T. *cruzi* en los ratones al día 60 p.i. para los tres lotes. Control barra negra, suficiente barra gris y deficiente barra blanca, n= 4 para los tres grupos.

Durante la fase crónica en el día 60 p.i, los valores de los 3 grupos fueron muy similares y aunque el grupo deficiente tuvo un promedio menor en la densidad óptica (0.93 ± 0.12) en comparación con el control (1.07 ± 0.25) y el suficiente (1.08 ± 0.3) el análisis de varianza para los días 14, 28, 40 y 60 no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.54$)

En la figura 11 B se muestran las concentraciones de anticuerpos anti-*T. cruzi* en fase crónica (día 60) de los tres lotes estudiados y en ella no se observan diferencias significativas entre los tres grupos.

RECONOCIMIENTO DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS.

Con el fin de detectar diferencias en el tipo de proteínas del parásito *T. cruzi* reconocidas por el suero de los ratones infectados y alimentados con dietas control, suficiente y deficiente, se realizó un ensayo de Western blot como se describió en Material y Métodos. Aunque se observó un patrón de reconocimiento similar entre las proteínas reconocidas por los sueros de los ratones, sí hubo diferencias en el reconocimiento de proteínas inmunogénicas (Figura 12).

El reconocimiento de las proteínas antigénicas fue gradual, comenzó con un reconocimiento de 3 bandas por parte de los sueros de los grupos control y suficiente en el día 14 (de 36 KD, 60 KD, y 62 KD) y consecutivamente el número de bandas aumentó conforme transcurrió el tiempo p.i. A lo largo del estudio no hubo diferencias entre las bandas reconocidas por los sueros de los ratones que recibieron las dietas control y suficiente, mientras que los sueros de los ratones deficientes en el día 14 reconocieron

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

dos bandas, de 33KD y 51KD, que los sueros de los ratones controles y suficientes no reconocieron. Adicionalmente desde el día 29 hasta el día 63 los sueros de los ratones deficientes no reconocieron dos bandas que aparecieron en los sueros de los controles y suficientes, una banda de bajo peso molecular de 6 KD y otra de 48 KD.

Debido a que se desconoce la identidad y la función de las distintas proteínas antigénicas reconocidas por los sueros de los ratones, en este momento es muy difícil considerar que papel podrían tener en la respuesta del organismo a la infección con *T. cruzi*.

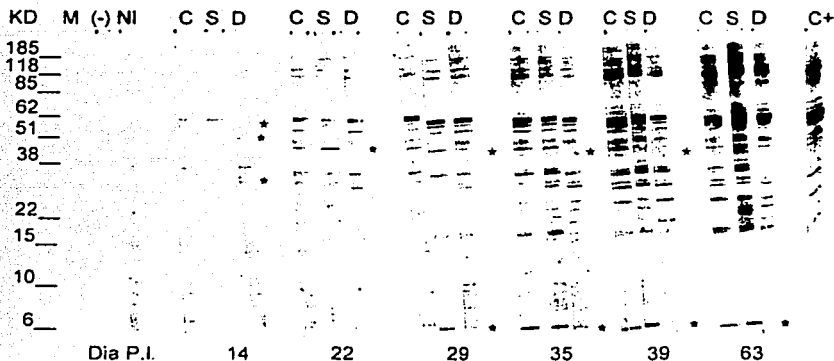


Fig. 12. Reconocimiento de proteínas antigénicas. Proteínas de la cepa Ninoa reconocidas por la mezcla de sueros de los ratones del lote 3 infectados y alimentados con una dieta comercial no purificada (Control C) con una dieta depletante de biotina suplementada con biotina (Suficiente S), o con una dieta depletante de biotina (Deficientes D). M marcador de pesos moleculares, (-) sin suero, NI suero de ratón no infectado, C+ control positivo. Las proteínas del extracto (ver apéndice) fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con SDS y mercaptoetanol para posteriormente ser transferidas a papel de nitrocelulosa, e incubarse con un "pool" de sueros obtenidos de ratones infectados a diferentes días p.i. (diluidos 1:50). Posteriormente fueron incubados con un segundo anticuerpo anti- IgG de ratón (cadena pesada y ligera) unido a peroxidasa (diluido 1:2000) para finalmente revelar agregando 3,3-diaminobencidina como sustrato. * Diferencias con los grupos control y suficiente.

DISCUSIÓN

Hay evidencias de que las personas con deficiencia de biotina presentan una mayor susceptibilidad a infecciones en la piel, principalmente por hongos como *Candida* (Scriver, 1995) y que animales de experimentación no responden adecuadamente a las inoculaciones con toxoide diftérico (Pruzansky And Axelrod, 1995), a la administración de eritrocitos de camero (Kumar and Axelrod, 1978) y tienen alteraciones en la autoinmunidad inducida experimentalmente (Rabin, 1983).

Adicionalmente, en nuestro laboratorio se ha reportado que la deficiencia de biotina produce alteraciones en las proporciones de las subpoblaciones celulares tanto en el bazo como en el timo, lo cual sugiere un desarreglo en la maduración de células del sistema inmune y por consiguiente puede afectar los mecanismos de defensa (Báez-Saldaña *et al.*, 1998). Sin embargo no se han realizado infecciones experimentales para estudiar como influye la deficiencia de biotina en el desarrollo de una infección experimental.

Como anteriormente se mencionó, el modelo de la infección de *T. cruzi* en ratón tiene características ventajosas que permiten determinar si los efectos de la deficiencia de biotina sobre el sistema inmune alteran la capacidad individual de resistir una infección experimental con *T. cruzi*. Ambos modelos, el de la deficiencia de biotina y el de la infección con *T. cruzi*, ya se han establecido previamente en la cepa Balbc/AnN de ratón (Báez-Saldaña *et al.*, 1998 y Espinoza *et al.*, 1998).

En el presente trabajo el peso de los ratones no infectados con *T. cruzi*, presentó diferencias significativas entre los ratones deficientes con los controles y suficientes a partir de la semana 8. Estos resultados son semejantes a los reportados previamente en nuestro laboratorio (Báez-Saldaña *et al.*, 1998) aunque en dicho trabajo la diferencia significativa se observó desde la semana 6. El tiempo distinto de aparición de las diferencias en el peso pudiera deberse a que en este estudio se utilizó un alimento de otra marca comercial o bien porque se usó un número menor de individuos. Esta última posibilidad podría ser lo más probable, ya que como se observa en la figura 7, las diferencias significativas en los lotes infectados se observaron a partir de la semana 3 de experimentación, 1 semana antes de inocularlos y en este lote el número de ratones fue el doble que en los no infectados. Adicionalmente, en otro estudio simultáneo en donde se utilizó la misma dieta comercial pero con un número mayor de ratones, las diferencias significativas en el peso aparecieron en la 6ª semana (Delint, Tesis de licenciatura. 2003).

Otro hallazgo importante fue la ligera reducción de peso que se observó en los ratones después de la infección. Debido a que este efecto se presentó en los 3 grupos de los 3 lotes de ratones y corresponde con el tiempo de parasitemia máxima, se puede decir que la infección con *T. cruzi* fue la causa directa de la disminución de peso post infección. Cabe mencionar que no se tiene conocimiento de algún estudio en donde se haya descrito este efecto, aunque como ya se mencionó, uno de los síntomas clínicos de la fase aguda es la hiporexia (WHO, 1991).

Debido a que el peso corporal no es un indicador específico de la deficiencia de biotina, se efectuaron los monitoreos de la actividad enzimática de las carboxilasas, ya que éste sí es un indicador más sensible y específico de la deficiencia de biotina (Báez-Saldaña *et*

al., 1998). En los hígados de los ratones deficientes la actividad específica de las tres enzimas dependientes de biotina que fueron analizadas, estuvo marcadamente disminuida. Este análisis nos indica con certeza, que cuando los ratones se inocularon con los parásitos sí estaban deficientes de la vitamina. Las investigaciones en nuestro laboratorio han mostrado que en los ratones suficientes el peso corporal y el del hígado, así como las actividades específicas de las carboxilasas son iguales y en algunos casos mayores, aunque no significativamente, que en los ratones con dieta control

Los factores más utilizados para determinar la virulencia de las cepas de *T. cruzi* son: la mortalidad y la parasitemia. En este estudio los ratones que recibieron dieta control no presentaron mortalidad cuando fueron inoculados con la cepa Ninoa, resultado que concuerda con el reporte previo de Caballero García, 1998.

Solamente en los ratones suficientes del lote 2 hubo mortalidad, con un ratón muerto en la semana 7; 2 más en la semana 10 y uno más en la 11 de experimentación (3, 6 y 7 semanas p.i.) de un total de 10 ratones en ese grupo. La mortalidad de este lote 2 produjo que en el resultado global se reportara una mortalidad del 13 % para este grupo de ratones.

Es posible considerar que las causas de la mortalidad en el lote 2 puedan deberse a factores externos no relacionados con la infección ya que el momento en el que se presentó no concuerda con la parasitemia máxima. Además en una experimentación de nuestro laboratorio paralela a ésta, en la que los ratones no fueron inoculados con ningún parásito, tuvieron una mortalidad de 21.4 % en el grupo suficiente y 14.2 % en el grupo deficiente lo cual sugiere una infección ajena a nuestro estudio.

A pesar de que como ya se dijo está reportado que esta cepa no causa la muerte de los ratones infectados, la infección con *T. cruzi* en los ratones deficientes de biotina produjo una dramática mortalidad. Se puede asumir que la susceptibilidad aumentó drásticamente por la deficiencia de la vitamina y que esta mortalidad se correlaciona con los tiempos en los que se produjo la parasitemia máxima, misma que fue 50 % mas alta que en los controles y suficientes (Tabla 8).

Aunque la mayor parasitemia en los ratones deficientes puede explicar la mortalidad de éstos, al comparar la última parasitemia que se registró en los ratones que murieron con la de los que sobrevivieron, no se encontró correlación entre la intensidad y la mortalidad. Sin embargo, esa última parasitemia que se registró en los ratones deficientes que murieron, no necesariamente fue la máxima que tuvieron ya que en este estudio no se pudo registrar la parasitemia previa a la muerte. Esta pudiera ser la razón por la que no se encontró una correlación entre la intensidad de la parasitemia de los ratones deficientes de la vitamina sobrevivientes y los que murieron (Tabla 9).

Se ha sugerido que una respuesta pobre de anticuerpos anti-*T. cruzi*, cuando inicia la fase aguda, es indicativa de mayor susceptibilidad a la infección (Corsini *et al.*, 1980). En los ratones deficientes la producción de IgG anti *T. cruzi* fue igual que en los ratones suficientes y controles tanto en la fase aguda como en el inicio de la fase crónica (Fig. 12). Estos datos concuerdan con los recientemente reportados por Helm *et al.*, (2001) en donde las ratas deficientes de biotina inoculadas con la vacuna conjugada de *Haemophilus influenzae* tuvieron la misma respuesta de anticuerpos anti *H. influenzae* que las ratas suficientes. Sin embargo, la información que se encuentra en la literatura más antigua reporta datos controvertidos, ya que las ratas deficientes de biotina no produjeron anticuerpos o los produjeron débilmente para antígenos como el toxoide

diférico o la proteína básica de mielina de cobayo (Pruzansky and Axelrod, 1955 y Rabin, 1983)

Aunque la producción de anticuerpos IgG anti *T. cruzi* no fue diferente en los ratones deficientes a la de los controles y suficientes, el estudio del reconocimiento de los anticuerpos séricos por las distintas proteínas antigénicas del parásito sí fue diferente. Se sabe que los anticuerpos anti-*T. cruzi* de la subclase IgG tienen funciones de limpieza de tripomastigotes; sin embargo, en los ratones deficientes de biotina, la producción de estos anticuerpos fue igual, pero no sabemos cómo estaban los niveles de estos anti *T. cruzi* en los ratones que se murieron, ya que el diseño del estudio no permitió esta evaluación. Si se especula que los anticuerpos IgG anti *T. cruzi* en los ratones que se murieron hubieran tenido la misma producción que los controles y suficientes, una posibilidad por la que no fueron protectores estos anticuerpos se debe a que existe la hipótesis (García *et al.*, 1997) de que anticuerpos de la subclase IgM, que se producen en el inicio de la infección (Texeira *et al.*, 1975) y que tienen funciones líticas pero no de limpieza, pueden unirse a los tripomastigotes bloqueando la unión de los anticuerpos IgG que se producen más tarde en la infección (Takehara, 1981)

Esta hipótesis podría aplicarse en este caso ya que la cepa Ninoa induce producción de anticuerpos de la subclase IgM antes que la producción de la subclase IgG, sin embargo existen datos controvertidos que muestran que la cepa H5 que es muy virulenta y que causa una mortalidad de 93.3% al día 28 p.i. produce anticuerpos IgG 10 días antes de que se comiencen a producir anticuerpos IgM (Caballero García, Tesis de licenciatura. 1998).

Por otra parte, aunque la cantidad de las células B en el bazo se encuentren disminuidas en los ratones deficientes (Báez-Saldaña, 1998) los resultados obtenidos en

este trabajo indican que la producción de anticuerpos durante la infección experimental no fue afectada. Sin embargo queda la pregunta de ¿cuál es el mecanismo de defensa contra la infección que está siendo afectado por la deficiencia de biotina y que por lo tanto no está operando y provoca el aumento de susceptibilidad?

Uno de los mecanismos importantes para el control de esta parasitemia son los linfocitos citotóxicos T CD8⁺ (Kumar And Tarleton, 1998) los cuales podrían tener afectadas sus funciones en los ratones deficientes. Está reportado que se requiere de la biotina en el medio de incubación para la generación *in vitro* de linfocitos citotóxicos T CD8⁺ de bazo de ratón (Kung *et al.*, 1979). Para comprobar esta hipótesis, se necesitaría evaluar tanto la cantidad como la función de los linfocitos citotóxicos T CD8⁺ específicos a *T. cruzi*.

De la misma manera es necesario determinar la participación de la parasitemia en los tejidos y correlacionarla con la sobrevivencia de los ratones deficientes. Con base en datos clínicos (Rassi, 2001) existen dos causas principales de muerte en la enfermedad de Chagas; cardiovasculares, que son las más comunes y no cardiovasculares que incluyen complicaciones de megaesófago y megacolon.

Los estudios histológicos en tejidos de ratones DBA/2 han demostrado la presencia abundante de amastigotes en corazón, músculo esquelético, sistema nervioso central, páncreas y en menor grado en tracto digestivo, pulmones, bazo y nódulos linfáticos. Resultados similares se obtuvieron usando inmunohistoquímica dirigida a antígenos de tripomastigotes; en ambos casos la parasitemia en corazón tuvo un pico entre los días 15 y 30 p.i. (Guamer, 2001). Además, en infecciones experimentales en ratón con la cepa Ninoa se encontraron amastigotes en músculo esquelético pero no en corazón, sin embargo en este mismo órgano el PCR fue positivo y se detectaron antígenos de

tripomastigotes por inmunohistoquímica (Cruz, 1994, Monteón *et al.*, 1996). Con base en los datos anteriores es necesario estudiar histológicamente cuál o cuáles podrían ser los órganos que tengan un papel determinante en la supervivencia/mortalidad de los ratones deficientes de biotina infectados.

La pregunta de cuál es la causa de muerte de los ratones deficientes, genera otra muy similar pero opuesta: ¿Cuales mecanismos están participando en el 30 % de los ratones deficientes que sobrevivieron para que hayan podido resistir a la infección?, Para contestarla es necesario que se diseñe un experimento que permita determinar la causa de la muerte de los ratones deficientes de biotina.

CONCLUSIONES.

- En concordancia con reportes anteriores, la dieta depletante de biotina produjo una menor ganancia de peso corporal y disminución en la actividad específica de las carboxilasas.
- La infección con *Trypanosoma cruzi* produce una pérdida de peso corporal transitoria, independiente del estado nutricional de los ratones.
- Los ratones deficientes de biotina son más susceptibles a la infección con *Trypanosoma cruzi* debido a que:
 - 1) Presentan mayor mortalidad (67%) en comparación con la del grupo suficiente (13.3%) y la del grupo control (0%).
 - 2) Tuvieron una parasitemia máxima 50% más alta que en los grupos controles.
- No se sabe si la mayor parasitemia fue la causa de la mortalidad ya que con este diseño experimental no se pudo determinar este parámetro en el momento previo a la muerte.
- No existe diferencia en la producción de anticuerpos, IgG anti *T. cruzi* entre los tres grupos alimentados con las diferentes dietas
- La vía humoral no es la principal responsable de que la deficiencia de biotina aumente la susceptibilidad a la infección con *Trypanosoma cruzi* sino que probablemente sea por medio de la vía celular.

APÉNDICE A

SOLUCIONES

Nombre	Reactivo	Fórmula	Peso molecular	Cantidad	Observaciones
BUFFER DE CARBONATOS (100 mL)	Carbonato anhidro de sodio	Na ₂ CO ₃	105.99	0.15 g	Disolver en 50 ml ajustar pH a 9.6 y aforar a 100 mL.
	Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	84.01	0.29g	
	Azida de sodio	NaN ₃	65	0.02g	
BUFFER DE DIETANOLAMINA 10% pH = 9.8 (1L)	Dietanolamina			100 ml	Ajustar pH= 9.8, aforar a 1 L con H ₂ O destilada, Guardar a temperatura ambiente cubierto de luz.
	Cloruro de magnesio	MgCl ₂ ·6H ₂ O		102 mg.	
	Azida de sodio	NaN ₃	65	0.40 g	
	Agua destilada	H ₂ O		700 ml	
BUFFER DE ELECTROFORESIS 5X/SDS (1L)	Base tris		121.1	15.1g	Llevar a 1L con agua desionizada.
	Glycine			72 g	
	SDS		288.38	5 g	
BUFFER DE TRANSFERENCIA (1 L)	Base tris		121.1	3.03 g	Llevar a 1 L con agua desionizada.
	Glycine		75.07	14.4 g	
	Metanol	C ₂ H ₇ O		200 mL	
PBS 20 X (1L)		Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O		7.2	Para PBS 1 X 1900 ml H ₂ O + 100 ml PBS 20 X pH 7.4
		Na ₂ HPO ₄		22g	
		NaCl ₂		180g	
30 % ACRILAMIDA/ 0.8 % BISACRILAMIDA	Acrilamida n'n'-metilene-bisacrilamida			30.0g	Aforar a 100 ml Filtrar y mantener a 4°C en oscuridad por 30 días.
				0.8g	
4X Tris-HCl/SDS pH=6.8 (100 mL)	Base tris		121.1	6.05g	Disolver en 40 mL. Ajustar el pH Llevar a 100, filtrar y guardar a 4° C en oscuridad
	SDS		288.38	0.4 g	
4 X Tris-HCl/SDS pH 8.8 (500 mL)	Base tris		121.1	91 g	Disolver en 300 mL ajustar el pH y llevar a 500 mL filtrar y guardar a 4 ° C en oscuridad.
	SDS		288.38	0.2g	

HEMOLIZANTE ACK

Volumen Final (mL)	100	200	500
KH CO ₃ (g)	0.1	0.2	0.5
NH ₄ Cl (g)	0.83	1.66	4.15
EDTA (g)	0.0035	0.007	0.0175

GELES DE ELECTROFORESIS

Soluciones	Gel concentrador		Gel separador	
	4%		12%	
	Para 1 gel	Para 2 geles	Para 1 gel	Para 2 geles
30 % Acrilamida/ 0.8 % bisacrilamida	0.21 ml	0.420 mL	2.00 mL	4.00 mL
4 X Tris-HCl/SDS pH 8.8			1.25mL	2.50 mL
4X Tris-HCl/SDS pH 6.8	0.417 mL	0.834 mL		
H ₂ O	1.017 mL	2.034 mL	1.75 mL	3.5 mL
Persulfato de amonio al 10 %	8.5 µL	17 µL	16 µL	32 µL
TEMED	1.6 µL	3.2 µL	3.3 µL	6.6 µL

APÉNDICE B

PREPARACIÓN DE EXTRACTO DE *T. cruzi*

- Se cultivaron en el medio de cultivo Triptosa-infusión de hígado (LIT) 26-28 °C con extensiones: caja de 25 cm con 7 mL de LIT.
- Pasar a 2 cajas de 75 cm con 25 mL de parásitos + 17 mL de LIT
- Pasar a botellas rolandoras con 35 mL de parásitos + 150 mL de LIT.

Volumen total 180 de cada botella + 20 de cada caja (2 cajas = 400 mL)

4,500,500 parásitos / mL en los de ratón

5,000,000 parásitos/ mL en los descongelados

- 1.- Colocar los 215 mL en frascos (ya pesados) para centrifugar con el rotor JA14 a 4°C a 3000 r.p.m. por 10 min.
- 2.- Desechar el sobrenadante, disolver el botón en PBS 1X y centrifugar de nuevo a 3000 r.p.m. por 10 minutos. Hacer un segundo lavado.
- 3.- Desechar el PBS del segundo lavado y pesar la cantidad de parásitos. Pesar el tubo y restarle el peso anterior para obtener el peso húmedo.
- 4.- Agregar Tris-HCl 10 mM a una relación 5 mL/g de parásitos. Agregar inhibidores de proteasas. EDTA 125 µL/gramo, PMSF 25 µL/gramo, Leupeptin 50µL /gramo, Pepstatin 5 µL/gramo de peso.
- 5.- Separar el contenido en tubos cónicos de 15 mL con aprox. 3,5 mL cada uno.
- 6.- Sonicar en 3 periodos de 6 min. A una intensidad de 80 Watts y agitar en vórtex por 1 min. Después de cada sonicado. (Nota: se checa si hay parásitos vivos al microscopio.)
- 7.- Centrifugar el contenido en el rotor JA21 a 15,000 r.p.m. durante 30 min.
- 8.- Realizar la determinación de proteínas por el método de Bradford. (Se prepara una curva patrón con una solución estándar de albúmina sérica bovina, concentraciones: 5, 10, 15, 20, 25 mg/ mL en PBS 1 X.) y medir absorbancia a 595 nm.

BIBLIOGRAFÍA:

- Andrews, N.M. Abrams, C.K., Slatin, S.L. and Griffiths G. (1990). A *T. cruzi* secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore forming activity at low pH. *Cell*. 61:1277-1287
- Báez Saldaña, A. (1998). cambios en las proporciones de los linfocitos de bazo y timo causados por la deficiencia de biotina. Tesis Doctoral, Facultad de Química. UNAM.
- Báez-Saldaña, A., Díaz, G., Espinoza, B., and Ortega, E. (1998). Biotin deficiency induces changes in subpopulation of spleen lymphocytes in mice. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:431-437
- Beck, M.A. and Levander, O.A. (2000). Host nutritional status and its effect on a viral pathogen. *J. Infect. Dis.* 182:S93-96.
- Bhaskaram, P. (2002). Micronutrient malnutrition, infection and immunity: an overview. *Nutr. Rev.* 60:S40-S45.
- Bosseno, M.F., Barnabé, C., Magallón Gastéllum, E., Lozano Kasten, F., Ramsey, J., Espinoza, B. and Brenière, F.S. (2002). Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in México. *J. Clin. Microbiol.* 40: 627-632.
- Braumgartner, E.R. and Suomala, S. (1999). Inherited defects of biotin metabolism. *Biofactors*. 10: 287-290.
- Brenière, S.F., Bosseno, M.F. y Espinoza, B. (1999). Genética de las poblaciones de *Trypanosoma cruzi*: Conocimientos actuales. Chagas, la enfermedad en Bolivia, parte III. Editores: Cassab, J.R., Noireau, F. y Guillén, G. Ediciones Gráficas "E.G." la Paz, Bolivia.
- Burri, B.J, Sweetman, L. and Nyhan W.L. (1981). Mutant holocarboxilase syntetase Evidence for the enzyme defect in early infantile biotin responsive multiple carboxilase deficiency. *J. Clin. Invest.* 68:1491-1495.

- Caballero-García, L. (1999). Estudio de la respuesta inmune humoral inducida por 4 aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM
- Chandra, R.K. (1996). Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:14304-14307.
- Corsini, A.C., Costa, M.G., Oliveira, O.P., Camargo, I.J.B. and Rangel, H.A. (1980) A fraction (Fad) from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes depresses the immune response in mice. *Immunology.* 40:505-511.
- Cowan, M.J., Packman, S., Wara, D. and Ammann, A.J., (1979). Multiple biotin-dependent carboxylase deficiencies associated with defects in T cell and B-cell immunity. *Lancet* 2:115-118.
- Cruz Robles, D. (1994) Caracterización biológica de un aislamiento mexicano de *Trypanosoma cruzi* y detección de antígeno por método inmunohistoquímico en modelo murino. Tesis Licenciatura (Biólogo)-UNAM, Facultad de Ciencias 74 p
- Dos Reis, G.A. (1997) Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol. Today.* 13:335-341.
- Delint, I. (2003) Efecto de la biotina en la respuesta inmune humoral. Tesis de licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias UNAM.
- Espinoza, B., Vera-Cruz, J.M., Gonzalez, H., Ortega, E. and Hernández, R. (1998) Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Trop.* 70:63-72.
- Fraker, P.J., Caruso, R. and Kierszenbaum, F. (1982). Alteration of the immune and nutritional status of mice by synergy between zinc deficiency and infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Nutr.* 112:1224-1226.

- Friedrich, W., Vitamins. (1988). Editorial Walter de Gruyter New York.
- Garcia, I.E., D'império Lima, M.R.,Marinho, C.R.F., Kipnis, T.L., Furtado, G.C. and Alvarez, J.M. (1997) Role of membrane-bound IgM in *Trypanosoma cruzi* evasion from immune clearance. *J. Parasitol.* 83:230-233.
- Gershwin, M. E. (2000). Nutrition and immunology, principles and practice. Editorial Human Press. Totowa, New Jersey pág. 75.
- Gershwin, M.E., Borches, A.T. and Keen, C. (2000) phenotypic and functional considerations in the evaluation of immunity in nutritional compromised host. *J. Infect. Dis.*182:S108-14
- Gomes, G.L., Pereira, E. L., Domínguez, C. S. and Alves R. (1994). Effects of severe protein restriction in levels of parasitemia and in mortality of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 27 (1): 19.-24.
- Gonçalves da Costa, SC. (1999) Mouse model for Chagas Disease: Does mouse represent a good model for Chagas disease? *Mem. I. Oswaldo Cruz.* 94(1):269-272.
- Guarnier, J., Bartlet, J., Zaki, S.R., Colley, D.G., Grijalva, M.J. and Powell, M.R. (2001) Mouse model for Chagas Disease: Immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65:1452-158.
- Guzman-Bracho, C. (2001) Epidemiology of Chagas's disease in México; and update. *Trends Parasitol* 17: 372-376.
- Helm, R.N., Mock, NI., Simpson, P. and Mock, D.M. (2001). Certain immune markers are not good indicators of mild to moderate biotin deficiency in rats. *J. Nutr.* 132:3231-3236.
- Higuchi, R., Mizukoshi, M., Koyama, H., Kitano, N. and Koite, M. (1998). Intractable diaper dermatitis as an early sign of biotin deficiency. *Acta Paediatr.* 87:228-229.

- Hoff, R. (1974) A method for counting and concentrating living *Trypanosoma cruzi* in blood lysed with Ammonium Chloride. *J. Parasitol.* 60: 527-8
- Jain, A.L. (2002). Influence of vitamins and trace-elements on the incidence of respiratory infection in the elderly. *Nutr. Res.* 22: 85-87.
- Kapil, U. and Bhavna, A. (2002). Adverse effects of poor micronutrient status during childhood and adolescence. *Nutr Rev.* Vol 60: S84-S90.
- Kumar S.M. (2000). Vitamin A levels in plasma and concomitant intestinal parasitosis in Howrah. *Indian pediatrics.* 37:224-225.
- Kumar S. and Tarleton R.L., (1998). The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 20:207-216.
- Kung, J.T., Mackenzi, C.G. and Talmage, D.W. (1979). The requirements for biotin and fatty acids in the cytotoxic T cell response. *Cell Immunol.* 48:100-110.
- Lankfor, G.L. and Mock M.D. (1988) The percent of biotin reversible bound to plasma protein in small intestine. *FASEB J.* 2, A440.
- Lewis, B., Rathman, S. and McMahon, R. (2001). Dietary biotin intake modulates the pool of free and protein-bound biotin in rat liver. *J. Nutr.* 131:2310-2315.
- Linder, M.C. (1991). Nutritional biochemistry and metabolism with clinical applications. Second edition. Appleton & Lange Norwalk Connecticut, pg 113.
- Livaniou, E., Costopoulou, D., Vassiliadou, I., Leondiadis, L., Nyalala, J., Ithakissios, D. and Evangelatos, G. (2000). Analytical technichs for determining biotin *J. Chromatogr.* A. 881:331-343.
- Lopez-Olmos, V., Pérez-Nasser, N., Piñero, D., Ortega, E., Hernández, R., and Espinoza, B. (1998). Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 69:239-254.

- Mock, D.M. (1985). Biotin deficiency complicating parenteral alimentation Diagnosis, Metabolic repercussions and treatment. *Ann. N. Y. Acad Sci.* 314-333.
- Mock, D.M. (1999). Biotin status: which are valid indicators and how do we know? *J. Nutr.* 129:489-498.
- Mock, D.M. and Dyken, M.E. (1997). Biotin catabolism is accelerated in adults receiving long-term therapy with anticonvulsants. *Neurology.* 49:1444-1447.
- Mock, D.M. and Malik, M.I. (1992). Distribution of biotin in human plasma: Most of the biotin is not bound to protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 56:427-432.
- Mock, D.M. and Mock, N.I. (2002). Lymphocyte propionyl-CoA carboxylase is an early and sensitive indicator of biotin deficiency in rats, but urinary excretion of 3-hydroxypropionic acid is not. *J. Nutr.* 132:1945-1950.
- Mock, D.M., Mock, N.I., Lombard, K.A and Nelson, R.P. (1998). Disturbances in biotin metabolism in children undergoing long-term anticonvulsant therapy. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 26:245-250.
- Monteón V.M., Furuzawa-Carballeda J., Alejandro-Aguilar R., Aranda-Fraustro A., Rosales-Encina J.L. and Reyes A.P (1996). American trypanosomiasis: *in situ* generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Exp. Parasitol* 83:267-274.
- Müller, S., Falkenber, N., Mönch, E. and Jakobs, C., (1980). Propionic acidemia and immunodeficiency. *Lancet* 8: 551-552.
- Nussenblatt, V. And Semba, R.D. (2002). Micronutrient malnutrition and the pathogenesis of malarial anemia. *Acta trop.* 82: 321-337.
- Pruzansky, J. And Axelrod, A.E. (1955). Antibody production to diphtheria toxoid in vitamin deficiency states. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 89:323-325.

- Pereira, M.E., (1990). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Editor Wyler, D. J., Modern parasite biology cellular and immunological aspects. Chapter 4. W.H. Freeman and Company New York.
- Petersen, R. M., Gürtler, E.R., Cecere, M.C., Rubel, D. N., Lauricella, M.A., Hansen, D. and Carlomagno, M. A. (2001). Association between nutritional indicators and infectivity of dogs seroreactive for *Trypanosoma cruzi* in a rural area of northwestern Argentina. *Parasitol Res.* 87: 208-214.
- Petrelli, F., Moretti, P. and Campanati, G. (1981). Studies on the relationships between biotin and behaviour of B and T lymphocytes in the guinea-pig. *Experientia* 37: 326-37.
- Pedrosa, M.L., Nicoli, J.R., Silva, M.E., Vieira, L.Q. and Bambirra, E.A. (1993). The effect of iron nutritional status on *Trypanosoma cruzi* infection in germfree and conventional mice. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* 106:813-821.
- Rabin, B.S., (1983). Inhibition of experimentally induced autoimmunity in rats by biotin deficiency. *J. Nutr.* 113:2316-22.
- Rassi, A.Jr., Rassi, S.G. and Rassi, A. (2001). Sudden death in Chagas' disease. *Arg. Bras. Cardiol.* 76:86-96.
- Saldiva, S.R., Silveira, A.S., Philippi, S.T., Torres, D.M., Mangini A.C., De souza, R.M., Da silva, R.M., Buratini, N. And Massad, E. (1999). *Ascans-Trichuris* association and malnutrition in Brazilian children. *Paediatr. Perinat. Ep.* 13:89-98.
- Sánchez, B., Monteon, V., Reyes, P.A. and Espinoza, B. (2001). Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. *Arch Med Res.* 32:382-8.
- Scriver C. (1995). The metabolic and molecular basis of inherited disease. Vol II Cap. 103 Disorders of biotin metabolism. Mc Graw-Hill. New York 7a Ed.

- Serghides, L. and Kain, K.C. (2002). Mechanism of protection induced by vitamin A in *falciparum malaria*. *The lancet*. 359: 1404-1406.
- Silva, M.E., Nicoli, J.R., Bambirra, E.A. and Vieira, E.C. (1993). Vitamin D overload and experimental *Trypanosoma cruzi* infection: parasitological and histopathological aspects. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* 104: 175-81
- Spencer, R. and Brody, K. (1964). Biotin transport by small intestine of rat, hamster, and other species. *Am J. Physiol.* 206: 653-657.
- Stothard, J.R., Frame, I.A. and Miles, M.A. (1999) Genetic diversity and genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*: Dual drug-resistance "progeny" from episomal transformants. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 Suppl 1: 189-193.
- Sydenstricker, V.P., Singal, S.A., Briggs, A.P., De Vaughn, N.M. And Harris Isabel (1942). Observations on the "Egg White Injury" in man. *JAMA* 118: 1199-1200
- Takehara, H.A., Perini, A., da Silva, M.H. and Mota, I. (1981). *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in mice. *Exp. Parasitol.* 52:137.
- Texeira, A.R.L., Santos-Buch, C.A. (1975). Immunology of experimental Chagas's disease: delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigen. 28:401.
- Tylor, E.C. (2000). Workshop on micronutrients and infectious diseases: Cellular and molecular immunomodulatory mechanism. *Emerg. Infect. Dis.* 1: 89-90.
- Umekita, L.F. and Mota, I. (2000). How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*. *Bras. J. Med. Biol. Res.* 33: 253-258.
- Velasco Castrejón O. (1991). La enfermedad de Chagas. Secretaría de Salud, INDRE. # 8 México DF.

- Velázquez, A., Martín-del-campo, C., Báez, A., Zamudio, S., Quiteiro, M., Aguilar, J.L., Pérez-Ortiz, B., Sánchez-Ardines, M., Guzmán-Hernandez, and Casanueva, E. (1988) Biotin deficiency in protein-energy malnutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.* 43:169-173.
- Warren, K.S. (1993). Immunology and molecular biology of parasitic infections. Chapter 11 South American Trypanosomiasis (Chagas's disease). 3th edition Blackwell Scientific Publication.
- Wolf, B. (1995). The metabolic and molecular basis of inherited disease, vol II, 7th Ed. Mc Graw-Hill New York.
- Wolf B., Grier, E., Secor Mc VoyJR. And Heard G.S. (1985^a). Biotinidase deficiency: A novel vitamin recycling defect. *J.Inher. Metab. Dis.* 8: 53-58
- Wolf, B., Heard, G.S., Mc Voy, J.R.S., and Grier, R.E. (1985). Biotinidase deficiency. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 447: 252-262.
- World Health Organization (1991) Control of chagas disease. Report of a WHO expert committee. WHO Technical Report Series Geneva.
- Zempleni, J. And Mock, D. (1999). Bioavailability of biotin given orally to humans in pharmacologic doses. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:504-8.
- Zempleni, J. and Mock, D. (1999^b). Biotin biochemistry and human requirements. *J. Nutr.Biochem.* 10:128-138.