

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



IDENTIFICACION DE PROTEINAS SERICAS DEL
HUESPED EN TRYPANOSOMA CRUZI POR
TECNICAS INMUNOENZIMATICAS EN
MICROSCOPIA ELECTRONICA

T E S I S
P R E S E N T A D A P O R
JOSE DE JESUS M. VILLACAMPA RAMOS
Para Obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

México, D. F.

1978



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
CLAS. TESIS
ADQ. H.T-430 444 437
FECHA _____
PROC. _____



JURADO ASIGNADO

Presidente.	Profra. MAGDALENA ACOSTA SEGURA
Vocal.	Prof. GUILLERMO RENDON PADILLA
Secretario.	Prof. SALVADOR MARTIN SOSA
1er. Suplente.	Profra. BEATRIZ MEDINA
2o. Suplente.	Prof. OSCAR VELASCO CASTREJON

Sitio donde se desarrollo el tema:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS U.N.A.M.

Sustentante. JOSE DE JESUS M. VILLACAMPA RAMOS

Asesor del tema. MAGDALENA ACOSTA SEGURA

Supervisor técnico. DRA. KAETHE WILLMS.

Gracias a mis padres,
mi esposa, mi hermano
y a todos mis fami-
lieres por su apoyo.

En agradecimiento a la
Dra. Kaethe Willms,
Dra. Cristina Cortinas,
Sra. Ma. Teresa Marchan
y a todo el personal del
IIBM que contribuyeron a
realización de esta tesis.

CONTENIDO

OBJETIVO

CAPITULO I. GENERALIDADES

CAPITULO II. METODOS

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO IV. RESUMEN Y CONCLUSIONES

APENDICE. PREPARACION DE REACTIVOS QUIMICOS Y BIOLOGICOS

BIBLIOGRAFIA

Objetivo:

La finalidad de este trabajo de tesis es comprobar si las proteínas del suero normal de conejo y de humano inactivados se adhieren de alguna manera a la superficie de Trypanosoma cruzi cultivados en medio axénico de infusión de hígado-triptosa-suero (LIT), como un posible mecanismo para inhibir la respuesta inmune del huésped.

Para poner de manifiesto si las proteínas del suero, tanto de conejo como de humano, están fijadas a la superficie de T. cruzi, aún después de varios lavados, se utilizaron anticuerpos frente a estas proteínas marcados con la enzima peroxidasa, posteriormente en cortes finos de los tripanosomas así tratados se localiza el producto de la enzima por microscopía electrónica.

Se investigó la presencia de gamma-globulinas en los tripanosomas cultivados en medio LIT-suero de conejo y de gamma-globulinas, albúmina y alfa 2 macroglobulina en los tripanosomas cultivados en medio LIT-suero humano.

CAPITULO I

GENERALIDADES.

Introducción:

La enfermedad de Chagas es causada por la infección con Trypanosoma (Schizotripanum) cruzi; que es un flagelado del orden Cinetoplastida. En Africa - Trypanosoma Trypanosonn brucei causa la enfermedad -- del sueño. En América la enfermedad de Chagas es un gran problema de salud, se encuentra ampliamente difundida en Sur América, América Central, México y en el sur de los E. U. de Norteamérica. (1, 2).

Esta enfermedad es con frecuencia letal y es virtualmente incurable, los agentes quimioterapéuticos no han sido bien estudiados y su efectividad no ha sido demostrada, pues los estudios in vivo no han sido ampliamente probados.

Morfología y multiplicación.

T. cruzi presenta tres formas diferentes - relacionadas a tres estados de su ciclo evolutivo.

Amastigotes: No tienen flagelo; son organismos esféricos u ovals de 2 μ m de diámetro y es la forma multiplicativa intracelular exclusivamente, por esta razón algunos investigadores lo llaman Schizotripanum cruzi porque de amstigote intracelular se transforma a trypomastigote antes de liberarse a la sangre. Esta forma nunca se encuentra en la sangre. En el género Trypanosoma se encuentran tripomastigotes en multiplicación en la sangre o en la linfa.

Epimastigotes: Tienen un cinetoplasto localizado en un plano anterior al núcleo; tienen flagelo y una pequeña membrana ondulante, son de unas 20 μm de largo y representan la forma multiplicativa en el tracto digestivo del vector y en el cultivo.

Tripomastigotes: Tienen el cinetoplasto localizado en un plano posterior al núcleo y un flagelo, y membrana ondulante, miden 20 μm de largo y representan la forma no multiplicativa e infectiva. Estos aparecen en el lumen del recto del reduvido y son infectivos a los mamíferos. Los tripomastigotes solo se encuentran en el huésped mamífero cuando se está transmitiendo la infección de una célula a otra y cuando se inicia la infección en la chinche al ingerir sangre infectada. (3).

Transmisión:

Las chinches reduvidos del género *Triatoma*, comunmente son los transmisores. Las chinches se infectan al ingerir tripomastigotes de la sangre periférica de los mamíferos infectados. En el intestino de la chinche los microorganismos se multiplican como epimastigotes después de un período de 15 a 30 días se encuentran formas metacíclicas de tripomastigotes en el recto. Estas formas infectivas son defecadas y los tripomastigotes -- inician así la infección en el huésped, penetrando a través de las lesiones que pueden encontrarse en la piel cerca del lugar donde quedó la defecación, o son arrastrados por los dedos desde el lugar de la defecación a otras lesiones o a las membranas mucosas al rascarse.

Multiplicación en el huésped mamífero.

Los tripanosomas infectivos provenientes de la chinche entran en las células y se multiplican como amastigotes, la célula infectada se llena por completo de amastigotes, después se transforma en tripomastigotes, se rompen la célula y quedan libres para invadir otras células o ser ingeridas por otra chinche cuando pique a este huésped infectado y así continuar diseminando la infección a otros huéspedes.

Curso de la infección y patología de la enfermedad.

Se puede dividir en cuatro etapas, ya sea en el hombre o en los animales de experimentación:

- 1.- Período de incubación; existe una intensa proliferación de amastigotes infectando células y transformándose en tripomastigotes que pronto llegan a la circulación en donde son detectados. Esta fase dura de una a tres semanas.
- 2.- Fase aguda; se caracteriza por la aparición del chagoma y hepatoesplenomegalia. Estas lesiones se caracterizan por un infiltrado de células mononucleares, se incrementa el número de microorganismos en dos a tres semanas y existe marcada parasitemia. El tropismo que presentan los parásitos depende de la cepa y puede ser a músculo o al sistema reticulo endotelial, aunque existen también lesiones en vísceras -- como esófago, colon y corazón.
- 3.- Forma latente; no hay síntomas clínicos y hay

baja parasitemia, esto es aparentemente por - la multiplicación de los parásitos en varios órganos así como posiblemente la respuesta - inmune del huésped. Este período puede pasar a un período crónico de la enfermedad. La cura espontánea con eliminación del parásito - nunca ha sido reportada.

- 4.- Enfermedad crónica; Se presenta en personas - con diez años o más de infección. Esta fase - se caracteriza por una miocarditis progresiva y/o dilatación irreversible de vísceras. La lesión cardiaca se caracteriza por infiltra-- ción de mononucleares, destrucción de miofi-- brillas, que según Texeira y Santos Buch (5) son debidas a una reacción autoinmune por la presencia de un antígeno del parásito que -- cruza con el miocardio del huésped, además - hay fibrosis intestinal. Los parásitos son - extremadamente difíciles de demostrar. El me-- gacolon y el megaesófago se deben a disperis-- talsis por pérdida de las células de ganglios autónomos y otras causas no identificadas. - (4, 5).

Respuesta inmune celular a la enfermedad de Chagas.

Existen algunas evidencias de que durante el - curso de las infecciones por Trypanosoma cruzi se de-- sarrolla una cierta inmunidad, ya sea de tipo celular o humoral; por ejemplo, se encuentra que los tejidos daña-- dos presentan reacciones de tipo inflamatorio, lo cual - hace pensar en la actividad de la inmunidad celular, -

aunque esto no está completamente claro. Otros hallazgos han puesto de manifiesto que la inmunidad juega un papel importante en la enfermedad de Chagas, pues en animales que han sido inmunosuprimidos con rayos X, ciclofosfamida (N-N bis (2-cloroetil) tetrahidro-2 H-1,3,2 oxazofosforina-2-amina-2oxido) y corticoides se ha encontrado que aumenta la parasitemia, esto mismo se ha encontrado en animales timentomizados y tratados con suero antilinfocítico, lo que señala la importancia del sistema timo dependiente en el control de esta parasitosis. (6).

Cuando los animales irradiados con rayos X e infectados son tratados con neosalvarsán y después se les administran células linfáticas peritoneales de animales que han estado en contacto con el antígeno ya sean células singénicas o alogénicas se produce un aumento en la sobrevivencia del animal. Estos experimentos señalan que la respuesta inmune en esta parasitosis controla la enfermedad, aunque no es capaz de curarla o eliminarla. (7).

Antígenos.

Al presente no hay ninguna evidencia de que exista una variación antigénica en T. cruzi comparable a la de los tripanosomas Africanos y en paludismo; pero ésto se debe probablemente a que este aspecto no ha sido suficientemente estudiado. Se han reportado diferencias antigénicas entre diferentes cepas de T. cruzi mediante estudios serológicos (8, 9, 10).

En T. brucei se ha encontrado que la superficie contiene una fracción antigénica que contiene --

aproximadamente de 7×10^6 moléculas/parásito, esta fracción es una glucoproteína que contiene alrededor de 600 residuos de aminoácidos y 20 residuos de monosacáridos. (11).

Inmunidad humoral.

Resistencia específica. Se han encontrado -- títulos altos de anticuerpos aglutinantes contra T. cruzi en el suero de pacientes y en animales con la enfermedad de Chagas crónica. Estos anticuerpos se han demostrado por técnicas de fijación de complemento, por inmunofluorescencia directa e indirecta y por técnicas de aglutinación indirecta. Además se ha encontrado que en ratones con infección crónica por tripanosomas se produce una -- inmunosupresión para otros antígenos. La inmunosupresión se hace más evidente conforme va aumentando la parasitemia y la invasión a los tejidos. Adicionalmente -- ocurre un aumento en la actividad de la fagocitosis. No ha sido establecido el mecanismo por el cual ocurre esta inmunosupresión, aunque se habla de que células T. supresoras que impiden la expresión de la inmunidad humoral -- para los otros antígenos. (12).

Se ha demostrado que la IgM (19 S) es la primera inmunoglobulina en aparecer después del contacto -- con el antígeno de T. cruzi e inmediatamente después se producen inmunoglobulinas específicas en IgG del tipo -- (7 S), que persisten durante todo el período de la enfermedad. En las tripanosomiasis Africanas se ha encontrado el mismo efecto de aparición temprana de la IgM -- seguida después de la IgG específica. (14, 15).

Resistencia inespecífica.

Se ha demostrado la existencia de un mecanismo de resistencia natural a la inoculación de tripanosomas en algunas especies como los pollos y sapos. Se ha visto que el suero de pollos es capaz de lizar a tripomastigotes in vivo, y después se vió que también ocurría esto in vitro. Se observó que esta lisis es mediada por la vía alterna del complemento, pues cuando éste era inactivado por tres diferentes métodos, los pollos se tornan susceptibles a la infección; se encontró también que esta lisis es independiente de la acción del anticuerpo. (16).

Papel de los anticuerpos en la protección.

Actualmente apenas empieza a estudiarse el -- papel de estos anticuerpos en la resistencia y no se sabe mucho al respecto; por ejemplo, se han encontrado anticuerpos en la sangre simultáneamente con parasitemia. Hay algunos estudios in vitro que sugieren que el suero inmune en presencia de complemento es capaz de lizar a las formas tripomastigote de T. cruzi. (5, 10, 17, 18)

Es interesante además lo encontrado en Trypanosoma lewisi, en el cual se ha demostrado la producción de una fracción antigénica derivada de los productos metabólicos de tripanosomas en cultivo en (LIT) esta fracción se puede extraer de lisado de tripanosomas y del medio en el que se cultivan, es una fracción proteica al parecer compuesta de dos subunidades que juntas son antigénicas;

los anticuerpos producidos contra esta fracción (llamada "ablastinógeno") son capaces de inhibir en cierta medida la reproducción de los tripanosomas en su etapa de epimastigotes (21). Se ha comprobado que el anticuerpo ("ablastina") inhibe la reproducción de los tripanosomas in vitro, pues cuando se han cultivado en presencia de timidina tritiada para medir la incorporación de tritio como índice de reproducción y crecimiento y son puestos en contacto con la ablastina se inhibe la reproducción, pues se encuentra reducido el índice de incorporación de tritio al DNA. Se menciona que ésto es debido a que el ablastinógeno es una proteína funcional de la membrana, posiblemente una proteína de transporte y el anticuerpo es capaz de inactivarla y en consecuencia también la reproducción del parásito. (19, 20, 21).

Aprovechando esta característica de T. lewisi de tener un antígeno inmunogénico Deane y Kloetzel intentaron proteger a ratones contra la infección de T. cruzi por la inyección previa de dosis múltiples de T. lewisi sin encontrar un efecto protector significativo. El ligero efecto protector encontrado se puede deber a un estímulo no específico de la respuesta inmune del huésped por medio de la inmunidad celular, que comúnmente es activado en las infecciones por organismos intracelulares (3); además puede contribuir a esta menor respuesta a T. cruzi el efecto inmunosupresor que se presenta en la infección con T. lewisi, antes mencionado. (22).

En un novedoso modelo para observar los cambios morfológicos de T. cruzi in vivo se utilizó el mé

todo de cambios de difusión, que consiste en implantar el antígeno en el huésped sin un verdadero contacto físico, poniendo el antígeno en una cámara de filtros de 0.2 μm de poro (nucleoporefilters) sujetos por anillos de lucita, se logra sí un medio natural, sin que se produzca una infección. Además de los cambios morfológicos se ensayó la sensibilización del huésped al antígeno de T. cruzi, pero es de considerarse que no fué muy buena medida, pues los mismos autores reconocen que pudieron escapar algunos tripanosomas y producir una infección que sensibilizó al huésped y no fué en realidad algún antígeno soluble como se esperaba. (23).

Resistencia a la enfermedad de Chagas mediada por células.

Existe evidencia de que hay inmunidad mediada por células que se han encontrado en pacientes y animales con la enfermedad de Chagas, por ejemplo, se han reportado reacciones dérmicas con extractos de T. cruzi in vivo e in vitro, transformación blastoide e inhibición de la migración de macrófagos por el factor MIF. (24, 25).

Frecuentemente se ha encontrado una relación recíproca entre inmunidad mediada por células e inmunidad humoral en la que posiblemente la presencia de anticuerpos actúa inhibiendo la expresión de la inmunidad mediada por células, aunque no hay al respecto ninguna evidencia experimental. En fin, no se ha demostrado que la inmunidad celular actúe en contra de la enfermedad de Chagas en forma completamente efectiva,

solo se cree que actúe ayudando a la formación de anticuerpos.

Evasión de la respuesta inmune.

Los anticuerpos contra T. cruzi, ya sea en animales de experimentación o en el humano actúan como anticuerpos líticos en presencia de complemento; pero sin embargo, el parásito sigue reproduciéndose, pues se encuentra parasitemia y anticuerpos circulantes al mismo tiempo.

Como posibles mecanismos de defensa de los parásitos frente a la reacción inmune del huésped se han postulado:

a).- Defectos en la respuesta inmune del huésped que pueden ser debidos a factores genéticos.

b).- Se ha reportado la presencia de fracciones antigénicas en el parásito, parecidas a las del grupo sanguíneo del huésped humano que no permiten que la respuesta inmune se exprese. (24, 25).

c).- Inmunosupresión. Se ha demostrado que grandes cantidades de antígeno producen inmunosupresión, pero no se conoce el mecanismo exacto de tal inmunosupresión. (12, 13, 22).

d).- La acción de los macrófagos en la infección con T. cruzi se ve nulificada en parte por el hecho de que el parásito es capaz de reproducirse dentro del macrófago. (24) .

e).- También se ha hablado de variación antigénica que se efectúa por un pequeño cambio en la superficie de glucoproteína y residuos de monosacáridos. (11)

f).- Finalmente se postula el fenómeno de "enmascaramiento" mediante las proteínas séricas propias del huésped fijadas de alguna manera a la superficie del parásito, lo cual lo hace pasar inadvertido frente a las células encargadas de la respuesta inmune por lo menos en la etapa en la que se encuentran en la circulación, (26).

En apoyo a este último punto, sobre el recubrimiento del parásito con las proteínas séricas propias del huésped se encuentra el trabajo de Dwyer y Col, 1976 quienes con T. lewisi obtenido de sangre periférica de rata, a pesar de ser lavados varias veces, se vió que aglutinaban con sueros anti-albúmina, anti IgG y anti-alfa 2 macroglobulina, así como con suero anti-rata polivalente. Cuando estos tripanosomas fueron tripsinizados no reaccionaron frente a los sueros antes mencionados; pero si se reincubaban en suero diluido de rata adquirían nuevamente el recubrimiento de proteínas séricas y las propiedades aglutinantes. (27).

En este mismo trabajo se determinó por el método de electroforesis de Laurell, que la cantidad de proteína adsorbida constituye en peso al rededor del 5% de la cantidad total de la proteína de la superficie del parásito.

Hasta ahora no se han estudiado estas proteínas en la superficie de T. cruzi que tiene un ciclo de vida diferente a T. lewisi, para lo cual se diseñaron -

experimentos que permiten localizar proteínas en la membrana usando anticuerpos acoplados covalentemente a la enzima peroxidasa cuyo producto es visible en microscopía electrónica. Esta técnica inmunoenzimática permite localizar con gran precisión los sitios en donde se encuentra el complejo anticuerpo-peroxidasa.

Empleo de anticuerpos marcados para microscopía electrónica.

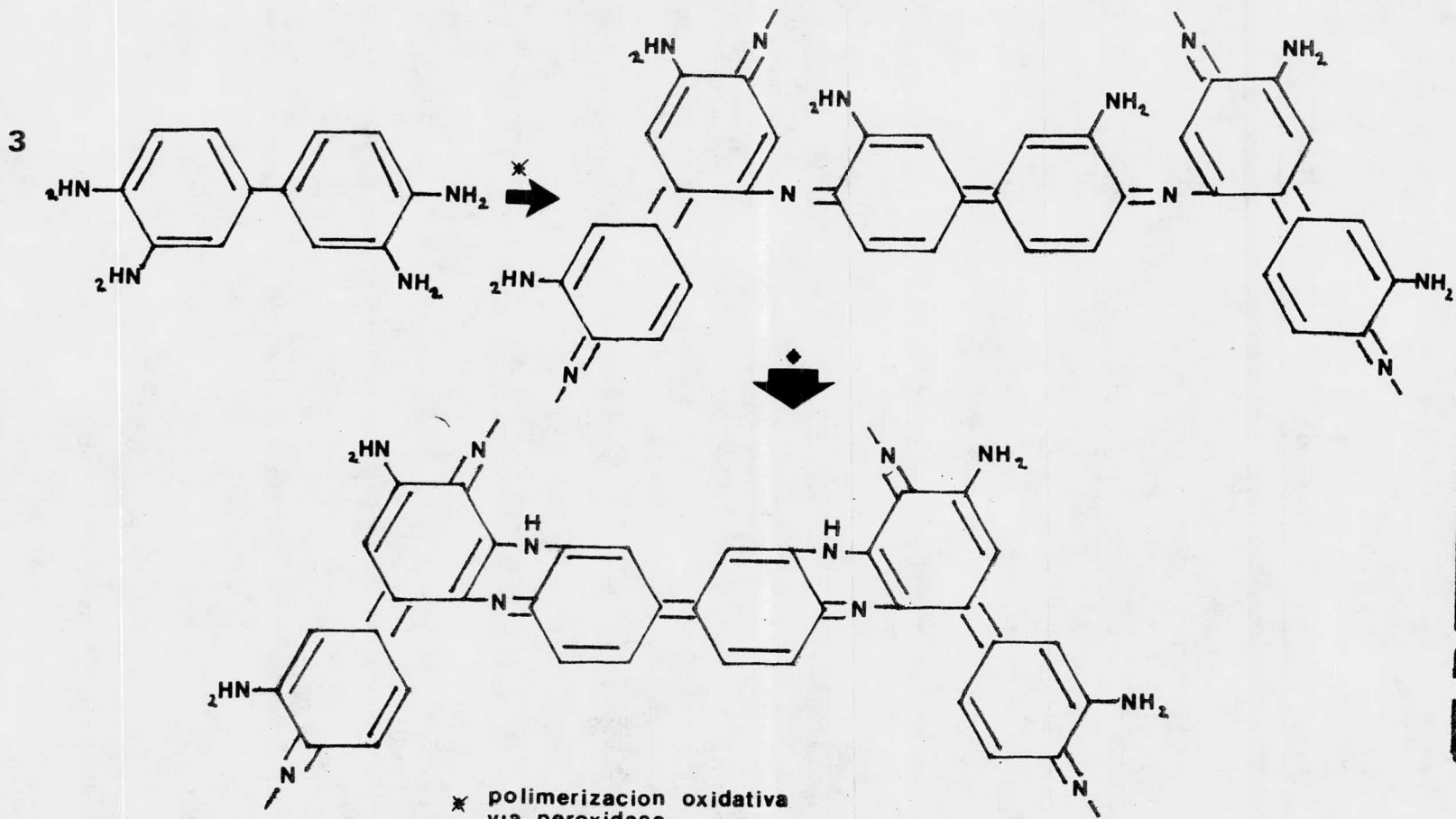
Los requerimientos para que una reacción enzimática pueda usarse como marcador acoplada a un anticuerpo son:

- a).- Que tenga un sustrato soluble que bajo la acción de la enzima forme un producto que polimerice - y que esta reacción se pueda llevar a cabo a pH casi neutro para no dañar demasiado al tejido y desnaturalizar sus antígenos.
- b).- La precipitación tiene que ser rápida, pues de no ser así el precipitado difundirá y esto resta resolución en microscopía electrónica.
- c).- La mejor resolución se logra cuando el producto precipita espontáneamente y es amorfo.
- d).- El precipitado tiene que ser poco soluble o insoluble y esto se logra cuando se forman polímeros.

El sustrato para la peroxidasa es H_2O_2 . La enzima no puede actuar si no tiene un donador de elec-

trones, este donador de electrones es oxidado en el mismo sitio de acción de la enzima y no a distancia de el lugar. El donador de electrones, en este caso, es la -- diaminobenzidina (DAB), y los dona al peróxido de hidrógeno via peroxidasa, entonces la DAB forma un intermediario oxidado que da rápidamente un precipitado amorfo que es insoluble y en esta forma puede verse en microscopía de luz.

Cuando se añade tetraoxido de osmio es reducido y quelatado rápidamente por este polímero, apareciendo ahora como un precipitado negro en el mismo sitio de la acción enzimática, este precipitado es electroopaco y se detecta en microscopía electrónica.



- * polimerización oxidativa
via peroxidasa
- ◆ ciclización oxidativa
via OsO₄

Esquema de la polimerización de DAB.

La conjugación de la peroxidasa a la inmunoglobulina se logra mediante enlaces covalentes; en algunos procedimientos se encuentra el problema de formación de enlaces cruzados con moléculas similares dando por resultado polímeros inactivos (ver material y métodos). Es necesario separar los anticuerpos acoplados a peroxidasa del resto de la inmunoglobulina y de la peroxidasa libre mediante filtración a través de una columna de Sephadex G 200. Los anticuerpos acoplados y purificados se prueban para ver si conservan la actividad de anticuerpo por inmunodifusión y la actividad de la enzima por la reacción de DAB (ver métodos).

El empleo de anticuerpos marcados con peroxidasa es de gran sensibilidad pues con ^{*}40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se obtiene una reacción que se detecta perfectamente en microscopía electrónica; se puede decir que es un micrométodo de alta sensibilidad y de gran resolución en microscopía electrónica.

El marcaje con otras enzimas como fosfatasa o acetilcolinesterasa, son también aceptables ya que reúnen las condiciones antes descritas para microscopía electrónica. El marcaje con ferritina no es muy bueno porque solo una molécula de ferritina señala el sitio de reacción, en cambio con la peroxidasa se amplifica muchas veces el sitio de reacción pues la enzima es capaz de actuar hasta que se agote el substrato y de esta manera depositar una cantidad apreciable del polímero denso a los electrones.

* 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína.

CAPITULO II

MÉTODOS.

Método de cultivo de trypanosomas.

La cepa (xxiv)+ se mantiene en forma de epimastigotes y algunos trypomastigotes por medio de cultivos seriados en los medios de LIT-suero (ii,iii,iv.v) que se mencionan en la sección de reactivos químicos y biológicos. El método para el cultivo de tripanosomas es el siguiente:

Conservación de la cepa en LIT-suero fetal. (LIT-sf).

En una botella de cultivo con 10 ml de medio LIT-sf (iv) se inocula 1.0 ml de el mismo medio con una suspensión de microorganismos de 1×10^6 a 6×10^6 , se incuban de 27 a 28°C y cada tercer día se hace una cuenta del número de microorganismos en el medio inoculado. La cuenta se hace tomando una alícuota en forma estéril de 0.1 ml con la que se hace una dilución 1:10 con solución salina 0.85% formolada al 0.02% y con esta dilución se hace la cuenta en un aparato contador de partículas (Coulter Counter mod.F Coulter Electronic Inc.).

Con los datos obtenidos se construye una curva de crecimiento, en donde se puede observar que para esta cepa el tiempo de duplicación de los microorganismos es de 24 hs y se alcanza la fase estacionaria en 8 días. (Gráfica 1A.)

Para continuar haciendo subcultivos en el mismo

+ Ver en apéndice la notación con letras romanas minúsculas.-

medio y para propagar a los otros medios LIT-suero de conejo (LIT-sc), LIT-suero humano (LIT-sh) y LIT-sin suero (LIT-ss) se utilizan tripanosomas tomados durante el cuarto día de crecimiento, etapa en la cual están aproximadamente en la mitad de la fase log y su adaptación al nuevo medio es rápida. Cuando se hacen subcultivos estando en la fase estacionaria, se retarda más el tiempo de iniciación de la fase log en el nuevo subcultivo.

Propagación de tripanosomas del medio LIT-sf a los medios LIT-sc, LIT-sh y LIT-ss.

Los tripanosomas del medio LIT-sf (iv) se siguen cultivando de la misma manera y en el mismo medio hasta que las curvas de crecimiento son aproximadamente idénticas una tras otra, esta reproducibilidad de las curvas de crecimiento se observa a partir del cuarto subcultivo.

La propagación de los tripanosomas del medio LIT-sf a los medios LIT-sc (ii), LIT-sh (iii) y LIT-ss (iv) se hace de la siguiente manera:

El octavo subcultivo en LIT-sf en su cuarto día de crecimiento con cuenta de 10^6 $\mu\text{o/ml}$ se divide en cuatro partes iguales en tijos de centrifuga estériles con tapón, se centrifugan a 2100 rpm durante 15 min a temperatura ambiente, se desecha el sobrenadante y el sedimento se lava dos veces con solución salina estéril al 0.85% (xiv). Después del último lavado se resuspenden en 1.0 ml de LIT-ss (v) y son inoculados a botellas de cultivo con 10 ml de medios LIT-sf (iv), LIT-sc (ii), LIT-sh (iii) y LIT-ss (v). El inoculo inicial a cada medio es de aproximadamente 2.5×10^6 $\mu\text{o/ml}$. Los medios se incuban a 27 - 28°C y se hacen curvas de crecimiento a cada uno en la forma antes mencionada y se hacen subcultivos

cada 6 días. Las curvas de crecimiento de los tripanosomas en los medios LIT-sf (Gráfica 1) LIT-sc (Gráfica 2) y LIT-sh (Gráfica 3) se estabilizaron despues de tres -- subcultivos, la curva de crecimiento en el medio LIT-ss (Gráfica 4) se estabilizó en el cuarto subcultivo.

Se continuó realizando subcultivos en todos los medios hasta el sexto subcultivo que es el que se utilizó para el experimento.

Cosecha y lavado de tripanosomas de los diferentes medios.

Después de el sexto subcultivo, en el séptimo día de crecimiento, se cosechan los tripanosomas de cada uno de los medios de la siguiente manera:

1º Se hace una cuenta total de microorganismos en cada uno de los cuatro medios.

2º Cada uno de los medios se pone en tubos de centrifuga y se centrifuga a 2100 rpm durante 15 min a temperatura ambiente; a los sedimentos de tripanosomas de LIT-sf y LIT-sc se les agregan 15 ml de amortiguador de caco dilato de sodio 0.2 mol/lt (vi), a los tripanosomas de los medios LIT-sh y LIT-ss se les agregan 15 ml de PBSG (ix). Se tapan bien los tubos y se agitan energicamente durante dos minutos. Se centrifugan nuevamente y el sedimento se lava de esta manera cinco veces más.

Con este tipo de lavado se asegura que no queda -- absolutamente ninguno de los componentes del medio en -- solución y que la superficie de los tripanosomas esta -- libre de componentes del medio que no esten perfectamen te adheridos a ella.

3º Se ajusta la cuenta de cada uno de los sedimentos de tripanosomas obtenidos de los diferentes medios a 10^9 µo/ml, con PBSG (ix) obteniendose:

Tripanosomas del medio LIT-sf a 10^9 $\mu\text{o/ml}$ (T-sf)
Tripanosomas del medio LIT-sc a 10^9 $\mu\text{o/ml}$ (T-sc)
Tripanosomas del medio LIT-sh a 10^9 $\mu\text{o/ml}$ (T-sh)
Tripanosomas del medio LIT-ss a 10^9 $\mu\text{o/ml}$ (T-ss)

Fijación de tripanosomas para microscopía electrónica.
Tripanosomas de los medios LIT-sf y LIT-sc.

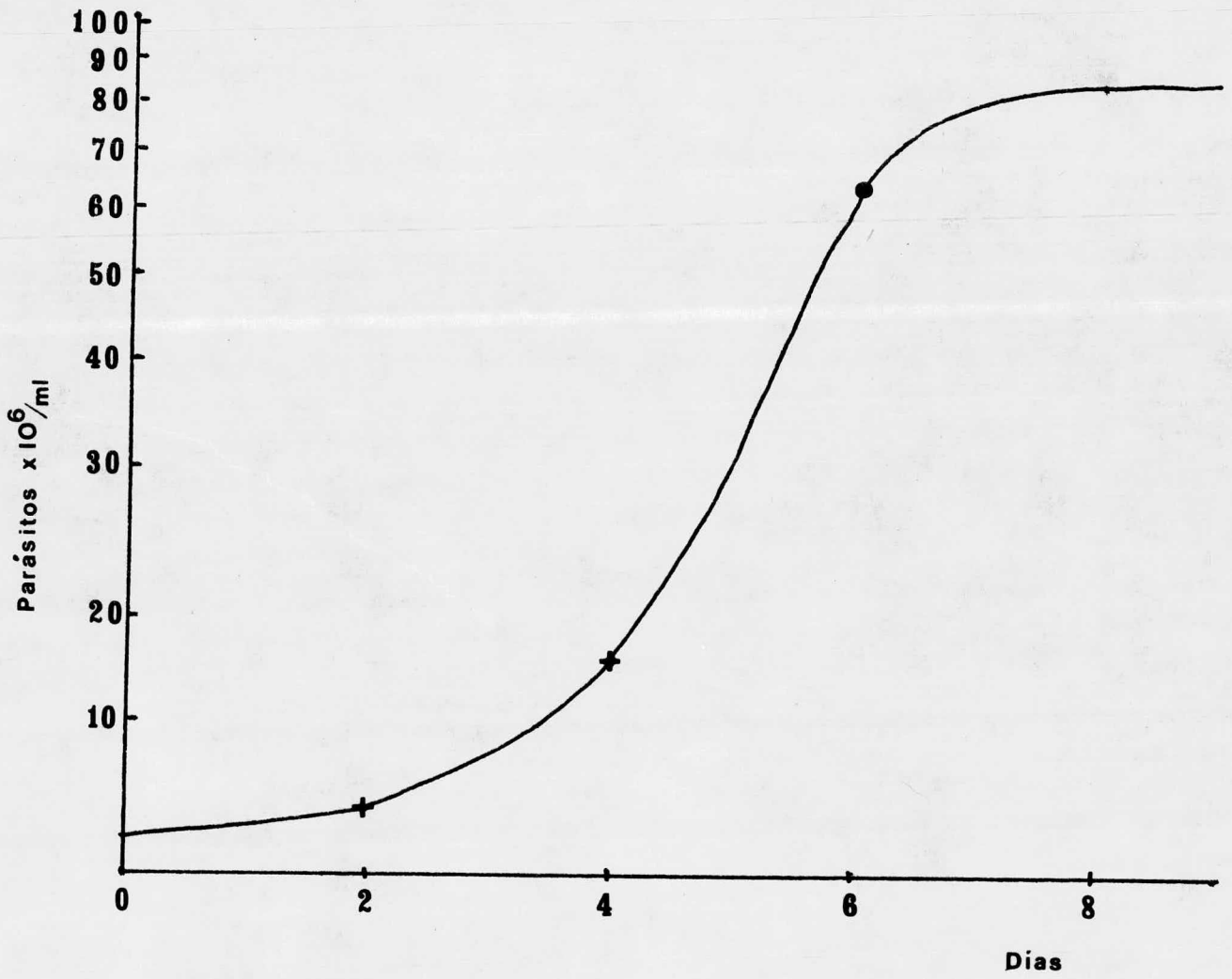
Los tripanosomas T-sf y T-sc se fijan con una mezcla 1:1 v/v de fijador Karnovsky (vii) (30) en cacodilato de sodio 0.2 mol/lt (vi), se deja actuar el fijador durante 30 min a 4°C . Después de transcurrido el tiempo de fijación se centrifugan y el sedimento se lava con diez veces su volumen de cacodilato de sodio 0.2 mol/lt tres veces; después del último lavado se ajustan a una concentración de 10^9 $\mu\text{o/ml}$ con amortiguador de cacodilato de sodio y se conservan en refrigeración.

Fijación de tripanosomas de los medios LIT-sh y LIT-ss.

Un volumen de 1.0 ml de T-sh lavados, con 10^9 $\mu\text{o/ml}$ en PBSG (ix) y 1.0 ml de T-ss lavados, con 10^9 $\mu\text{o/ml}$ en PBSG se centrifugan a ≈ 100 rpm durante 15 min a temperatura ambiente, se lavan con amortiguador de cacodilato de sodio tres veces, después del último lavado se añade una mezcla 1:1 de fijador Karnovsky y cacodilato de sodio, - se dejan fijar 30 min a 4°C . Después de transcurrida la fijación se lavan tres veces con amortiguador de cacodilato de sodio, se ajusta la concentración de microorganismos a 10^9 y se conservan en refrigeración.

GRAFICA 1

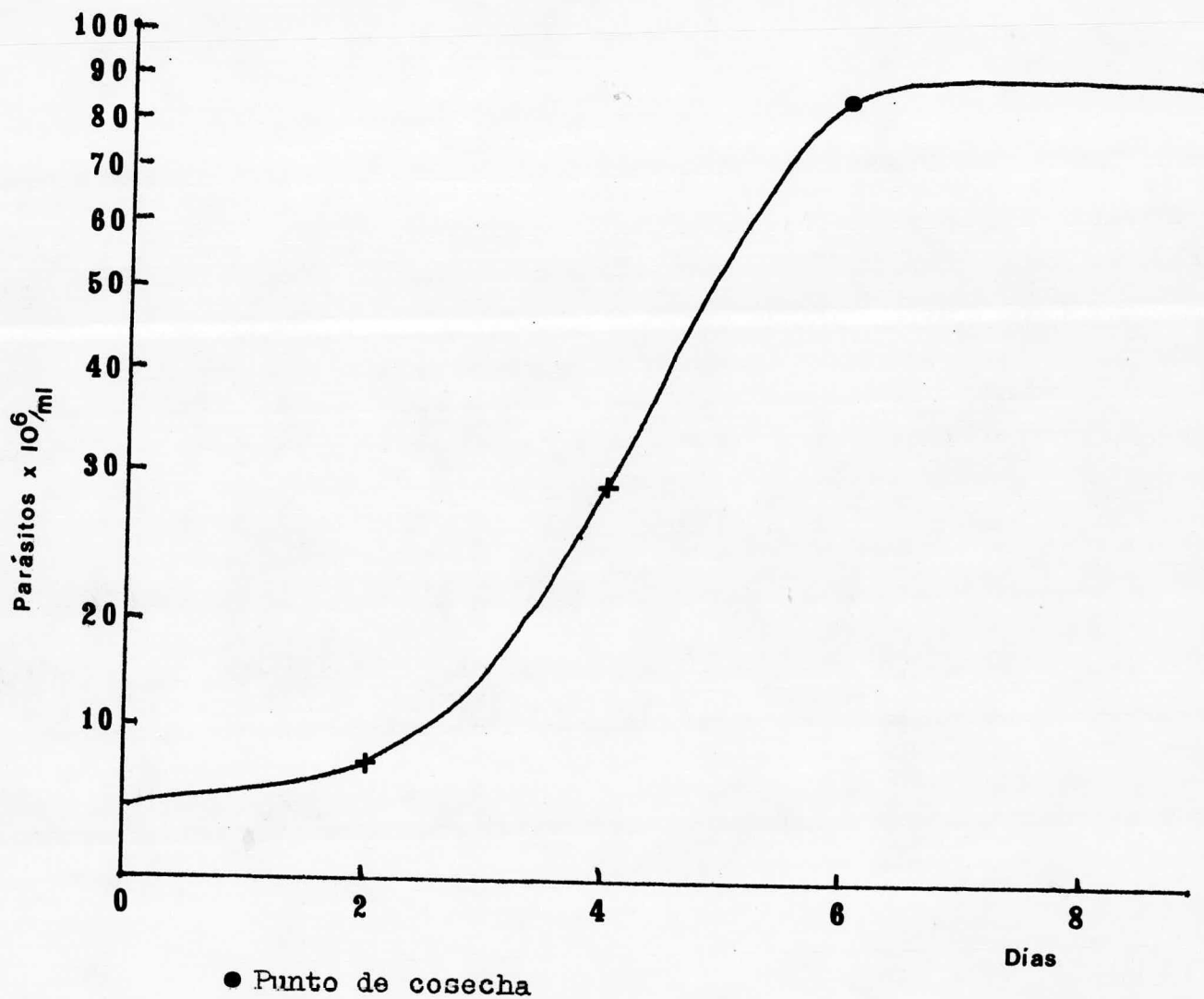
Gráfica de crecimiento de tripanosoma en el medio de LIT-sf.



● Punto de cosecha.

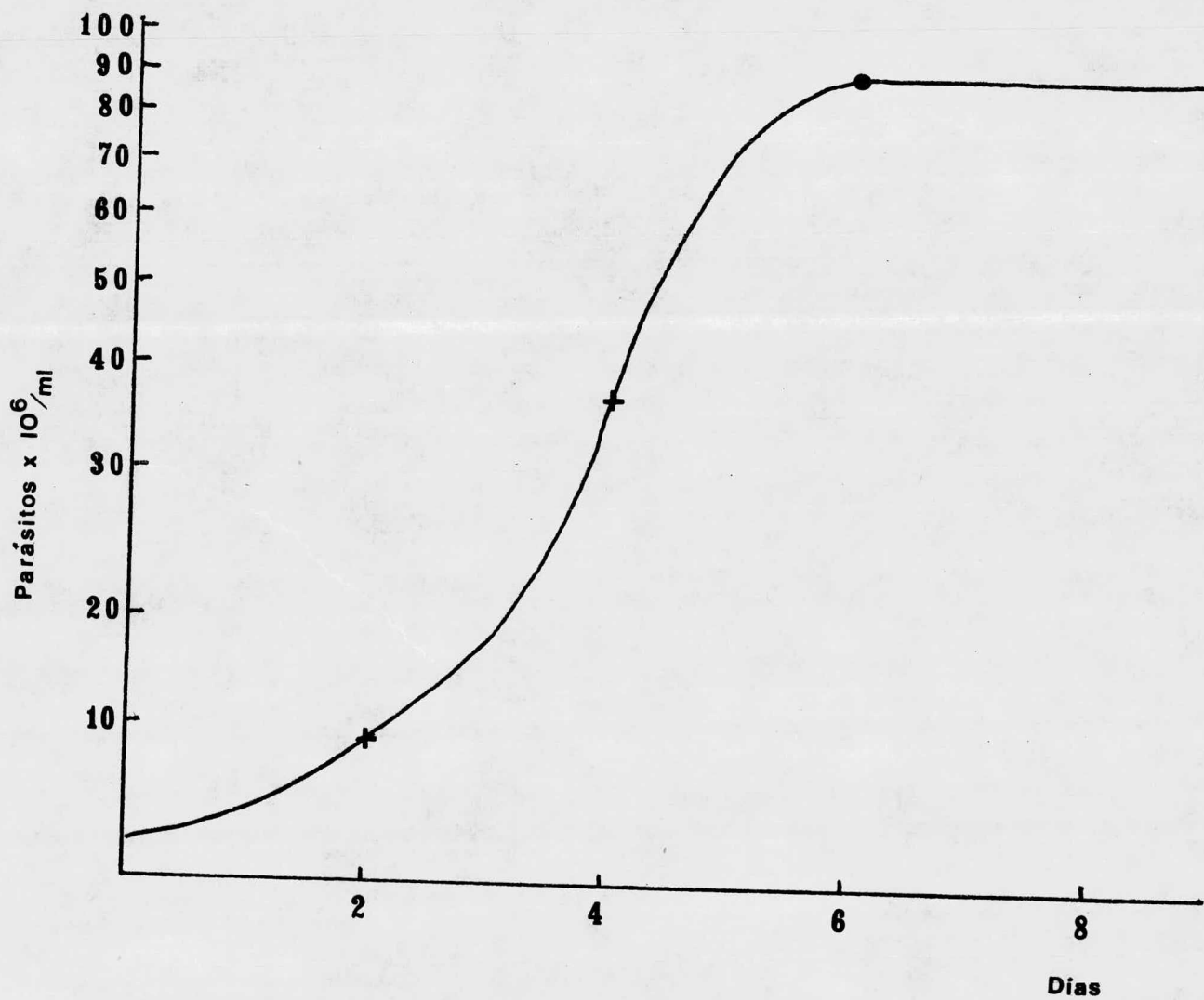
GRAFICA 2

Gráfica de crecimiento de tripanosomas en el medio LIT-sc.



GRAFICA 3

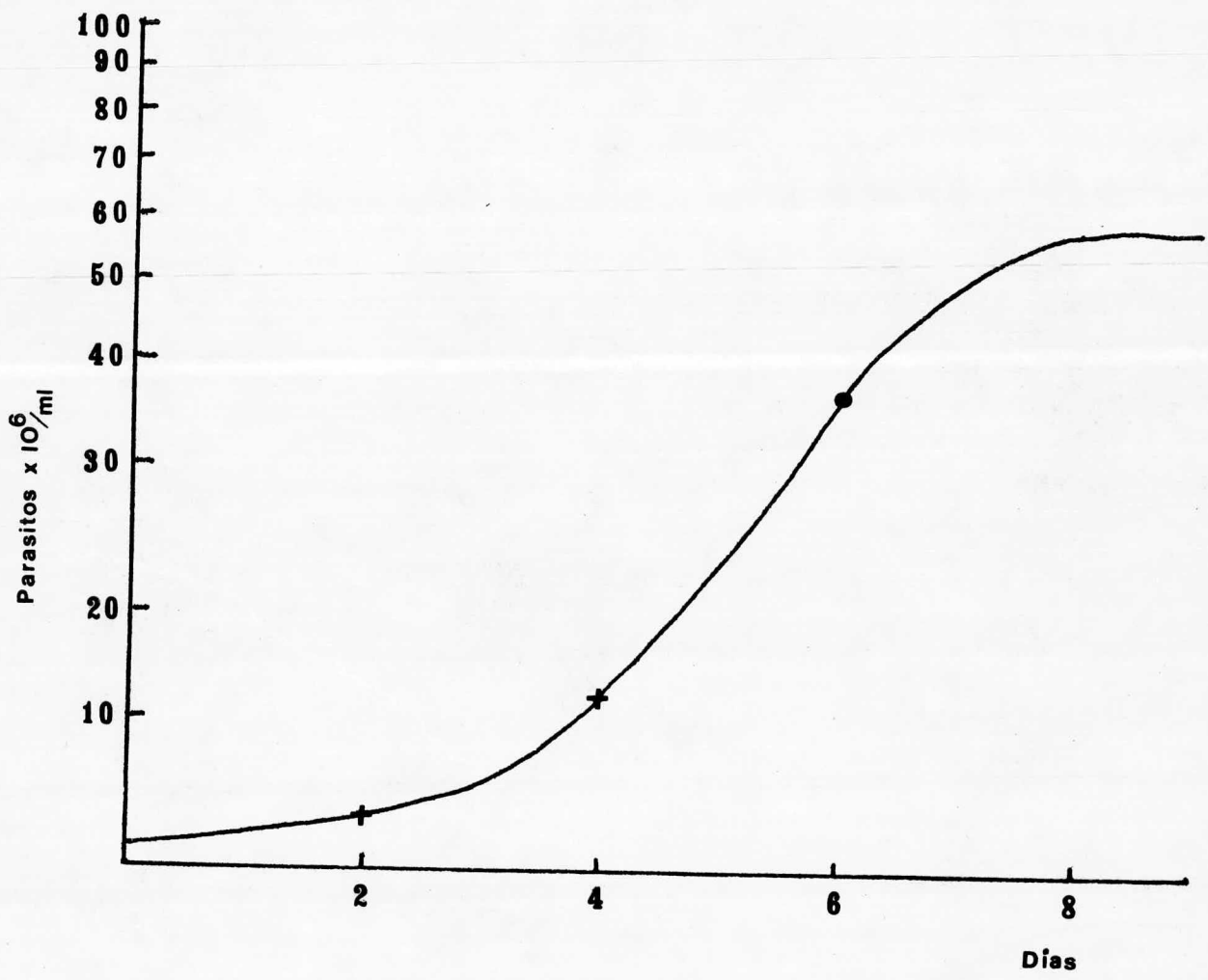
Gráfica de crecimiento de tripanosomas en el medio LIT-sh.



● Punto de cosecha

GRAFICA 4

Grafica de crecimiento de tripanosomas en el medio LIT-ss.



● Punto de cosecha.

Después de estos procesos de fijación se tiene:

T-sf lavados-fijados con 10^9 μ o/ml.

T-sc lavados-fijados con 10^9 μ o/ml.

T-sh lavados-fijados con 10^9 μ o/ml.

T-ss lavados-fijados con 10^9 μ o/ml.

Tripsinización de T-sh lavados.

Se hace una tripsinización muy ligera de los tripanosomas que se cultivaron en LIT-sh ya que se sabe que conservan proteínas del suero humano adheridas a la superficie (34) con esta tripsinización se elimina esta cubierta de proteínas séricas sin lesionar la membrana del parásito. La metodología es la siguiente: a - una suspensión de T-sh lavados con 10^9 μ o/ml en PBSG - preincubada a 37°C en baño de agua, se le agrega un volumen igual de una solución de tripsina al 0.5% p/v (x) en PBSG a 37°C (la concentración final de la enzima es de 0.25%) se incuban 10 min. a 37°C en baño de agua, - después de transcurrido el tiempo se pasan a un baño de hielo y se le agrega 15 ml de PBSG frío, se centrifugan a 2100 rpm durante 15 min a 0°C , se lavan de esta forma cuatro veces. Se ajusta la cuenta a 10^9 μ o/ml. Se toma la mitad de esta suspensión de tripanosomas y se fija - con una mezcla 1:1 de fijador Karnovsky en cacodilato - de sodio 0.2 mol/litro durante 30 min a 4°C , se lavan tres veces con amortiguador de cacodilato de sodio - - 0.2 mol/lt, se ajusta la cuenta a 10^9 μ o/ml y se conservan en refrigeración. A esta suspensión así tratada se le llamó tripanosomas-sh-tripsinizados (T-sh-t).

Incubación en suero humano diluido de los tripanosomas
T-sh-t y T-ss lavados.

A los tripanosomas (T-sh-t) que fueron tripsinizados a los que se supone se les quitó el recubrimiento de proteínas séricas y a los tripanosomas T-ss lavados que no tienen recubrimiento de proteínas séricas, se les pone en contacto con suero humano para que adquieran su cubierta de proteínas en el caso de T-sh-t y para que los tripanosomas T-ss adquieran dicha cubierta de proteínas. La metodología es la siguiente:

A 1.0 ml T-sh-t conteniendo 10^9 μ o/ml se le agregan 2.0 ml de suero humano 1:8 en PBSG preincubado a 37°C se incuba a 37°C durante 30 min. Después de transcurrido este tiempo se diluye con 15 ml de PBSG frío, se centrifuga a 2100 rpm durante 15 min. a 0°C y se repite esta operación de lavado cuatro veces. El siguiente paso es fijarlos con solución de Karnovsky de igual manera que las anteriores fracciones tratadas. A esta fracción se la llama Trypanosomas-sh-recubiertos (T-sh-r).

Con los T-ss que únicamente se han lavado y aún no están fijados se hace lo siguiente: por duplicado: A 1.0 ml de suspensión de T-ss con 10^9 μ o/ml se le agregan 2.0 ml de suero humano diluido 1:8 con PBSG preincubado a 37°C en baño de agua. Se continua incubando 30 min a 37°C . Después de transcurrido este tiempo se lavan con PBSG frío cuatro veces. Después uno de los duplicados se toma para ser fijado con solución de Karnovsky en la forma antes descrita. A esta fracción se le llama Trypanosomas-ss-recubiertos (T-ss-r).

Tripsinización de trypanosomas T-ss-r.

Con la fracción de T-ss-r que no se han fijado se procede a tripsinizarla para quitarle una parte de la cubierta de proteínas séricas que adquirió al ser incubada con suero humano; el proceso es el siguiente: a 1.0 ml de la suspensión T-ss-r conteniendo 10^9 μ o/ml se le agrega 1.0 ml de solución de tripsina al 0.5% en PBSG (x) a 37°C, se incuba 10 min. a 37°C, transcurrido este tiempo se diluye con 15 ml de PBSG frío y se centrifuga a 2100 rpm durante 15 min. a 0°C, se lavan de esta manera cuatro veces. Se ajusta la cuenta a 10^9 μ o/ml y se fijó con solución de Karnovsky por el método antes descrito. A esta fracción se le llama Trypanosomas-ss-recubiertos-tripsinizados (T-ss-r-t).

El resultado de todos estos procesos son ocho suspensiones de tripanosomas tratados y fijados que son:

T-sc-lavados-fijados.

T-sf-lavados-fijados.

T-sh-lavados-fijados.

T-sh-lavados-tripsinizados-fijados.

T-sh-lavados-tripsinizados-incubados en suero-fijados.

T-ss-lavados-fijados.

T-ss-lavados-incubados en sh-fijados.

T-ss-lavados-incubados en sh-tripsinizados-fijados.

Todas las suspensiones que han sido fijadas con solución de Karnovsky se lavan 2 veces con amortiguador de glicina 24 hrs a 4°C. Después de transcurrido -

este tiempo todas las suspensiones de tripanosomas son - lavadas cuatro veces con amortiguador de cacodilato de - sodio 0.2 mol/lt y se conservan de esta menra en refri-- geración.

El objeto de la incubación con amortiguador de glicina es bloquear los grupos aldehido libres del - glutaraldehido del fijador Karnovsky que pudieran dar -- posteriormente una fijación inespecífica de la proteína del anticuerpo a la superficie de los tripanosomas fija- dos, como se ilustra en el esquema I.

Localización e identificación de proteínas séricas en la superficie de los tripanosomas.

Demostración de proteínas séricas en tripanosomas T-sc.

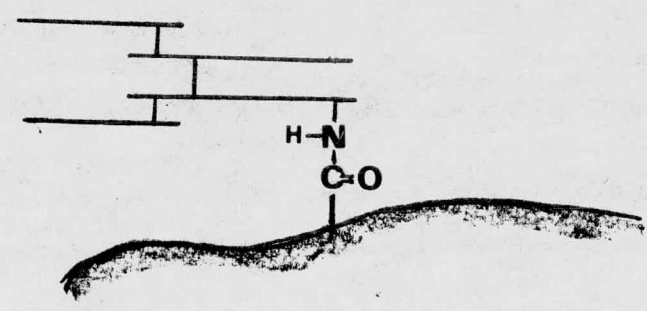
Se partió de la base de que los tripanosomas T-sc lavados y fijados que se cultivan en medio de LIT-sc adquieren supuestamente una capa de proteínas séricas - que conservan aún después de ser lavados en amortiguador de cacodilato de sodio 0.2 mol/lt.

ESQUEMA I



anticuerpo

membrana de un tripanosoma fijado con glutaraldehido de la solución de - Karnovsky, en la cual se encuentra un gpo. aldehido fijado a la proteína.

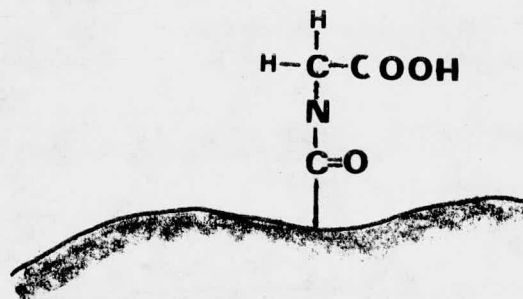


fijación inespecífica de el anticuerpo.

Reacción de la superficie de el tripanosoma tratado con amortiguador de Glicina.

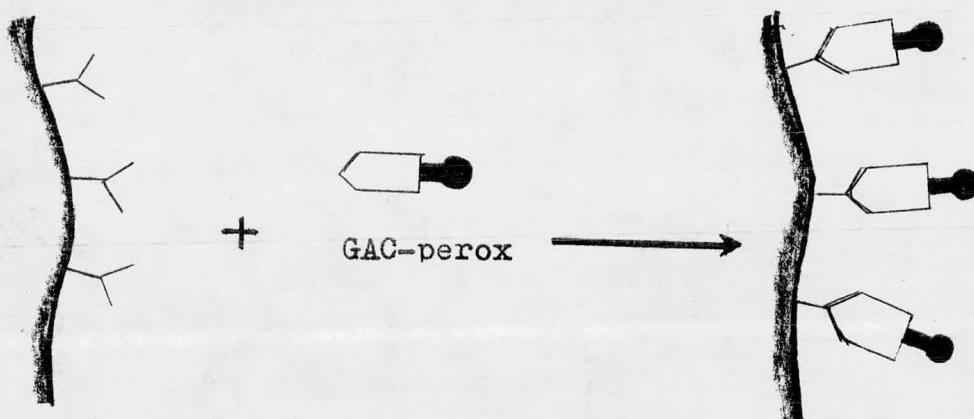


superficie del tripanosoma fijado.



grupo aldehido bloqueado por la Glicina.

Para demostrar la existencia de dicha cubierta de proteínas séricas se empleó un anticuerpo antigamma-globulina de conejo marcado con la enzima peroxidasa GAC-perox (xx). La GAC-perox reaccionará con las moléculas de gamma-globulina de conejo que se encuentran en la superficie del tripanosoma T-sc. Despues se hizo reaccionar la peroxidasa (marcador de la GAC) con 3,3,DAB, lo cual produce un compuesto electro opaco que se puede ver perfectamente en microscopía electrónica (32,33). Una representación esquemática sería la siguiente.



superficie del tripanosoma con globulinas de conejo en su superficie.

reacción Ag - Ac.



producto de la reacción enzimática

3,3.DAB.
H₂O₂

anticuerpo anti gamma globulina de conejo. ◀
enzima peroxidasa. ●

El procedimiento para demostrar lo anterior es el siguiente:

1o.- Con los T-sc se hizo la reacción con GAC-perox para identificar proteínas séricas de conejo. Como control negativo se hizo reaccionar a T-sf con GAC-perox, - en donde no debe haber reacción, pues T-sf están recu- - biertos de proteína de suero fetal de ternera y GAC-perox es específica para gamma-globulina de conejo.

2o.- Como control de la reacción enzimática para de mostrar que los tripanosomas no tienen actividad de peroxidasa por sí mismos, se hizo reaccionar T-sc y T-sf con el sustrato para la enzima peroxidasa H_2O_2 con 3,3 DAB (xvi). Con esto se aseguró que no había resultados falsos positivos debidos a actividad de peroxidasa inespe- - cífica.

La metodología fue la siguiente:

Los T-sc y T-sf lavados y fijados, se lavaron 3 veces con solución salina, conservando la concentración de microorganismos a 10^9 μ o/ml. Después en cuatro tubos se agregó:

Tubo 1) 1 ml de T-sc a $37^\circ C$ más el volumen de solución de GAC-perox (xx) equivalente a 40 μ g/ml de - proteína

Tubo 2) 1 ml de T-sf a $37^\circ C$ más el volumen de solución de GAC-perox (xx) equivalente a 40 μ g/ml de - proteína.

Tubo 3) 1 ml. de T-sc a $37^\circ C$.

Tubo 4) 1 ml de T-sf a $37^\circ C$.

Todos los tubos se incubaron a $37^\circ C$ en baño de - agua durante una hora.

Después de transcurrido el tiempo de incubación, - se pasaron los tubos a baño de hielo y se agregaron 15 ml de solución salina fría, se centrifugaron 15 min. a 2100 rpm. el sedimento se lavó seis veces con solución salina fría. Después de lavados se hizo lo siguiente:

- 1.- T-sc-GAC-perox a 37°C más 1 ml de H₂O₂-3,3,DAB (xvi).
- 2.- T-sf-GAC-perox a 37°C más 1 ml de H₂O₂-3,3,DAB (xvi).
- 3.- T-sc más 1 ml de H₂O₂-3,3,DAB.
- 4.- T-sf más 1 ml de H₂O₂-3,3,DAB.

Las mezclas se incubaron a 37°C durante 10 minutos, inmediatamente después se pasaron a un baño de hielo y se agregaron 15 ml de amortiguador de cacodilato de sodio frío, se centrifugaron 15 minutos a 2100 rpm y se lavó el sedimento seis veces con amortiguador de cacodilato de sodio 0.2 mol/lt.

Después del último lavado se agregó al sedimento 2 ml de tetraóxido de osmio (OsO₄) al 2% en amortiguador de cacodilato de sodio; se dejó que actuara el fijador durante treinta minutos a 4°C, después se centrifugó 15 minutos a 2100 rpm y se lavó el sedimento tres veces con alcohol al 70%; para después ser procesados para microscopía electrónica.

Demostración e identificación de proteínas séricas en T-sh.

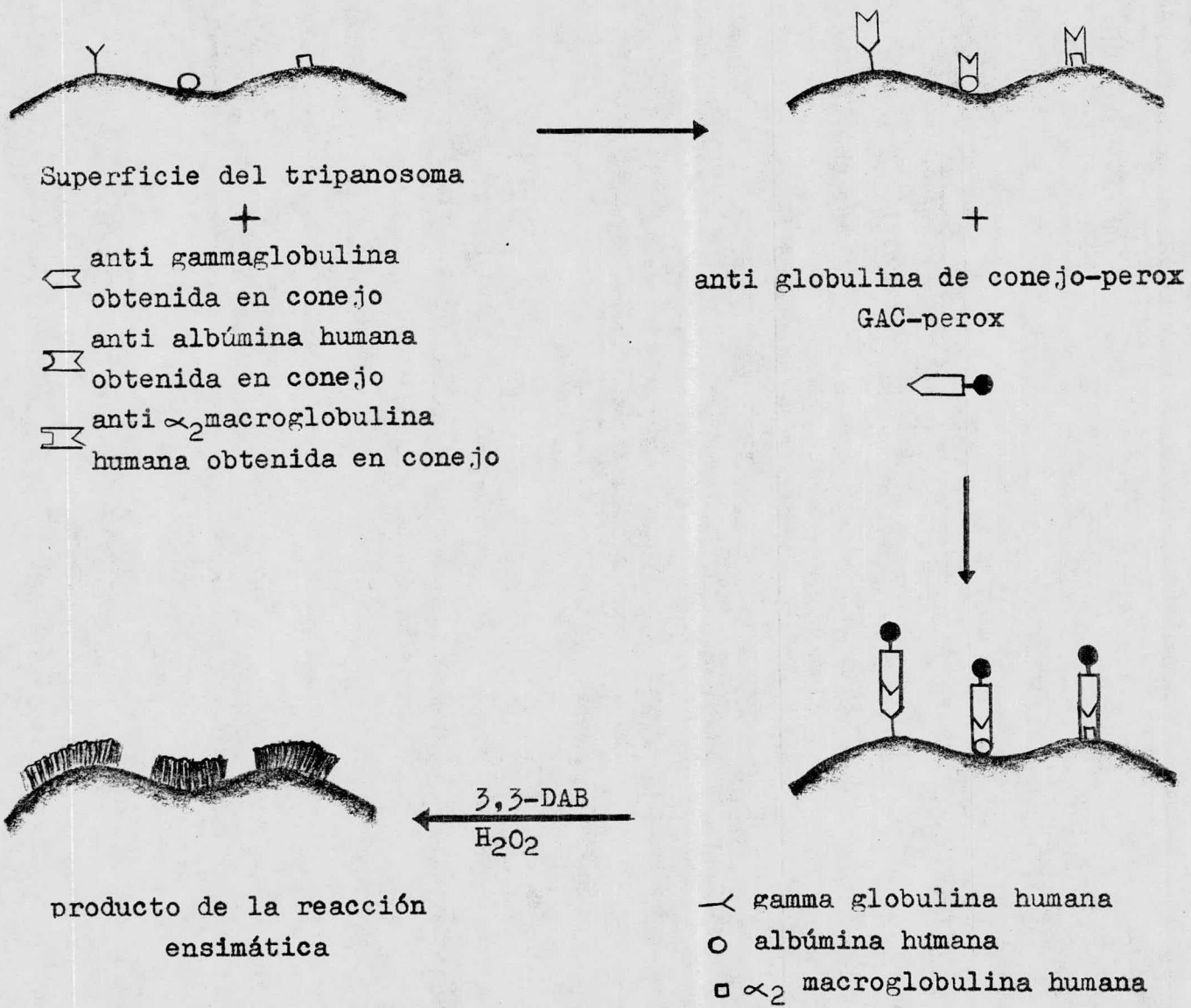
Con los trypanosomas T-sh que se cultivaron en medio LIT-sh lavados y fijados y como se supone que aún después de lavados conservan una cubierta de proteínas séricas humanas que adquirieron del medio de cultivo; se procedió a demostrar y a identificar algunas de estas

proteínas que se quieren identificar; estas fueron --
gamma-globulinas humanas, albúmina y alfa₂macroglobulina,
los tres anticuerpos que se emplearon para ello provenían
de conejo.

Después de ocurrida esta reacción Ag-Ac se --
procedió a revelarla con el anticuerpo GAC-perox que reac
cionará con las gamma-globulinas de conejo que se usaron
como primer anticuerpo. Una representación esquemática --
global de las reacciones sería la siguiente:

Ver la siguiente hoja.

Reacción de identificación de proteínas séricas



Superficie del tripanosoma

- +
- anti gammaglobulina obtenida en conejo
 - anti albúmina humana obtenida en conejo
 - anti α_2 macroglobulina humana obtenida en conejo

+

anti globulina de conejo-perox GAC-perox

producto de la reacción enzimática

- Y gamma globulina humana
- O albúmina humana
- α_2 macroglobulina humana

El procedimiento seguido fué:

Lavar con solución salina tres veces a los tripanosomas T-sh y T-ss lavados y fijados, conservando la concentración a 10^9 uo/ml. En cuatro tubos de ensayo agregar a cada uno 1 ml. de T-sh y en un quinto tubo 1 ml. de T-ss a 37°C .

Agregar a cada tubo lo siguiente:

- 1º.- anti-gammaglobulina humana (xxi) 40 $\mu\text{g/ml}$ de proteína.
- 2º.- Anti-gammaglobulina humana (xxi) 40 $\mu\text{g/ml}$ de proteína.
- 3º.- anti-albúmina humana (xxiii) 40 $\mu\text{g/ml}$ de proteína.
- 4º.- anti- α_2 macroglobulina humana(xxii) 40 $\mu\text{g/ml}$ de prot.
- 5º.- anti-gammaglobulina humana (xxi) 40 $\mu\text{g/ml}$ de proteína.

Incubarlos 60 minutos a 37°C .

Los tubos se pasaron a baño de hielo y se agregó 15 ml. de solución salina fría, se centrifugó a 2100 rpm 10 min. y se lava el sedimento seis veces con solución salina fría, - después se agregó suero anti-gammaglobulina de conejo - - - (GAC-perox) a todos los tubos; excepto al segundo al cual - se agregó GAC simple (xxiv) 40 $\mu\text{g/ml}$ de proteína. Todos los tubos se incubaron 60 minutos a 37°C .

Se lavan todos los tubos con solución salina fría - seis veces en la misma forma que en el paso anterior. Al - segundo tubo de el paso antes descrito se agregó el volúmen equivalente a 40 $\mu\text{g/ml}$ de proteína de GAC-perox, se incubó - 60 minutos a 37°C y se lavó seis veces con solución salina - fría.

Agregar a todos los tubos 0.5 ml de sustrato para la enzima peroxidasa 3,3,DAB-H₂O₂(xvi), incubar 15 min. a 37°C., se lavan inmediatamente seis veces con amortiguador de cacodilato de sodio 0.2 mol/lt. Después del último lavado se fijan con 2 ml de tetraóxido de osmio al 2% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.2 mol/lt (xvii) durante 30 min. a 4°C, después se lvan tres veces con alcohol al 70 % y se conservan en refrigeración para ser procesados en microscopía electrónica.

El proceso de el segundo tubo se usa como -- control de especificidad de la GAC-perox. El tubo 5° - se usa como control de negatividad de la fijación inespecífica de GAC-perox.

Localización e identificación de proteínas séricas en los trypanosomas T-sh y T-ss tratados con la enzima tripsina y con suero humano diluido.

Con los trypanosomas T-sh y T-ss que se trataron con la enzima y con suero diluido, como se explicó antes, se procedió a demostrar que se pudo inducir el fenómeno de fijación de proteínas séricas. Una interpretación más detallada se dará más adelante. El proceso seguido es: pasar a la siguiente página.

1 ^o	T-sh-t	1 ml. +		anti-gammaglobulina humana
2 ^o	T-sh-t-r	1 ml+		anti-gammaglobulina humana
3 ^o	T-sh-t-r	1 ml+		anti-albúmina humana
4 ^o	T-ss-r	1 ml +	un volumen equivalente a 40 µg/ml. de proteína de suero.	anti-gammaglobulina humana
5 ^a	T-ss-r	1 ml +		anti-albúmina humana
6 ^o	T-ss-r	1 ml +		anti- α_2 macroglobulina humana
7 ^o	T-ss-r-t	1 ml+		anti-gammaglobulina humana
8 ^o	T-ss-r-t	1 ml+		anti-albúmina humana

Después de transcurrido el tiempo de incubación se lavaron seis veces con solución salina fría. Se agregó a todos los tubos el volumen equivalente a 40 µg/ml de proteína de suero GAC-perox. Se incubaron a 37°C 60 min y se lavaron seis veces con solución salina. Después agregar a todos los tubos 0.5 ml de sustrato para la enzima peroxidasa (xvi). Incubar a 37°C durante 15 min. inmediatamente después lavar seis veces con amortiguador de cacodilato de sodio 0.2 M, por último se post-fijan con 2 ml de tetraóxido de osmio al 2% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.2 M (xvii) durante 30 min a 4°C. Se lavan tres veces con alcohol al 70% y se conservan en refrigeración para ser procesados en microscopía electrónica.

Procesamiento para microscopía electrónica.

Con el material que se tenía en alcohol graduado al 70 % y a 4°C se siguió primero el proceso de deshidratación con alcohol a determinadas concentraciones graduales de la siguiente forma:

Un lavado en alcohol del 80 %.
dos cambios de 15 min. con alcohol del 95 %,
tres cambios de 30 min. con alcohol absoluto,
un cambio de epon 6:4 con oxido de propileno en proporción 1:1 (xix) 30 min.,
un cambio de epon 6:4 (xix) a temperatura ambiente durante 24 hrs.

Incluir con epon fresco 6:4 en cápsulas de Been, e incubar en horno de 80-110°C durante 24 hrs.

Los bloques de inclusión fueron cortados en un micrótopo LKB III, los cortes se recogieron en rejillas de cobre de 150 mallas para microscopio electrónico. Algunos cortes se tiñeron 15 segundos con solución de citrato de plomo, solución de Reynolds, para hacer más fácil su observación en microscopio electrónico.

En la forma que se hace esta tinción no se enmascara la reacción de la peroxidasa y no se introducen artefactos al corte estudiado.

las observaciones se hicieron en microscopio electrónico Jeol, 100 B.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION.

Primeramente se dan los resultados obtenidos al trabajar con los tripanosomas T-sc y T-sf que fueron - usados para probar la técnica y obtener algunas conclusiones preliminares para proseguir después con el estudio de los tripanosomas T-sh y T-ss.

Como ya se explicó en el capítulo I la presencia de proteínas séricas en la superficie de los tripanosomas se detecta gracias a la reacción con su anticuerpo - específico marcado con la enzima peroxidasa y con la - - ayuda de la microscopía electrónica. En los tripanosomas obtenidos de LIT-sc, o sea T-sc tratados con gamma - globulina anticonejo marcada con peroxidasa, y tratada - con 3,3 DAB-H₂O₂ como se indica en la técnica , se encontró presencia de gamma globulinas de conejo en su superficie (fig. 1 y 2). Se utilizaron como control: T-sc incubados con solución salina y tratados con 3,3-DAB como control de que la membrana de T-sc no posee actividad de peroxidasa por si misma, no habiendo actividad de peroxidasa.

En los T-sf también se investigó la posibilidad de que tuvieran actividad de peroxidasa en su superficie, se trataron con solución salina y 3,3-DAB-H₂O₂ de la misma forma que los T-sc, no habiendo actividad de peroxidasa.

Como control de la especificidad de anticuerpo de GAC-perox se incubaron T-sf tratados con GAC-perox y

3,3-DAB-H₂O₂ no hubo reacción, lo que indica que el anticuerpo antigamma de conejo no cruza con las gamma-globulinas de suero fetal aunque, por otra parte, están en baja concentración, sí tiene especificidad y no hay reacción cruzada con otro antígeno. (fig. 3).

En el cuadro siguiente se resumen los resultados:

	Tratamiento c/anticuerpo			Producto de la reacción	Nº de observaciones.	
					Neg.	Pos.
T-sc +	GAC-perox	60 min a 37°C	DAB - H ₂ O ₂ 10 min	(+)	0	6
T-sc +	Sol.Salina			(-)	12	-
T-sf +	Sol.Salina			(-)	12	-
T-sf +	GAC-perox			(-)	18	0

Con estos datos se demuestra que: las proteínas de suero de conejo, por lo menos la gamma-globulina se encuentran en la superficie de T.cruzi cultivado en - LIT-sc; que tanto T-sc como T-sf solos no poseen actividad de peroxidasa endógena en su superficie, por lo cual no hay posibilidad de falsos positivos; el anticuerpo - GACperox presenta especificidad y que el tratamiento con amortiguador de glicina para evitar fijación inespecífica de proteínas a la superficie del tripanosoma es efectivo y no cabe la posibilidad de que se presenten falsos positivos a esta causa

Después de saber lo anterior se prosiguió a - trabajar con los tripanosomas T-sh y T-ss.

En los T-sh se investigó la presencia de - gamma globulinas, albúmina y alfa 2 macroglobulina humana, encontrándose los resultados de el cuadro II.

La presencia de gamma globulina, albumina y alfa 2 macroglobulina en la superficie de T.cruzi - - T-sh resultó positiva. (fig. 4 y 5).

Los controles de especificidad y no fijación inespecífica, inciso b) y a) respectivamente del - cuadro II, resultaron negativos, lo que indica que hay especificidad y no hay fijación inespecífica.

CUADRO N° II

Tratamiento con 1 ^{er} anticuerpo en conejo 60 min a 37° C	Tratamiento con 2 ^a anticuerpo 60 min a 37° C	Resultado	N° de observs	
			Pos.	Neg.
T-sh + antigamma-humana	GAC-perox	+	21	7
T-sh + antialbumina- humana	GAC-perox	+	14	4
T-sh + antialfa-2-macro- globulina-humana	GAC-perox	+	6	0
CONTROLES				
T-ss + antigamma-humana a)	GAC-perox	-	0	9
T-sh + antigamma-humana b)	GAC-simple + GAC-perox 60 min 37°	-	0	9

Tratamiento con 3,3-DAB-H₂O₂ 10 min

En los experimentos diseñados para observar la fijación de proteínas a la superficie -- del tripanosoma T-sh-tripsinizado y T-ss tratados con suero humano se encontró lo siguiente (ver cuadro III).

En los T-sh-t tratados como se indica en el cuadro III, inciso 1, se puede apreciar que fué eliminada la cubierta de gamma globulina humana, aunque únicamente se probó ésta, se tiene evidencia de que la tripsinización elimina completamente la capa protéica (27). En los tripanosomas que se tripsinizaron y luego se reincubaron en suero humano T-sh-t-r, tratados como se indica en los incisos 2 y 3 del cuadro III, se puede apreciar que son capaces de adquirir nuevamente una cubierta protéica de albúmina, la presencia de gamma globulina no se pudo detectar, lo cual hace pensar que con la tripsinización pierden la capacidad de fijar la gamma globulina o que las condiciones de el método para que la readquiera no fueron satisfactorias.

En los tripanosomas cultivados en LIT sin suero y luego tratados con suero humano T-ss-r, se encontró que son capaces de adquirir una cubierta protéica; se investigó gamma globulina, albúmina y alfa 2 macroglobulina, encontrándose únicamente a la albúmina, la gamma globulina y la alfa 2 macroglobulina no se detectaron. (fig. 7, 8, 9).

Los tripanosomas T-ss-r-t que adquieren cubierta protéica la pierden al ser tratados con tripsina, se comprobó ésto investigando presencia de gamma globulina y albúmina siendo negativas. (fig. 10).

CUADRO Nº III

	1 ^{er} tratamiento anticuerpos en conejo			Reacción	Nº observs	
					Pos.	Neg.
1) T-sh-t	anti gamma-humana	60 min a 37° C	2º tratamiento con anticuerpo G A C - perox 60 min a 37° C	-	0	8
2) T-sh-t-r	anti gamma-humana			-	0	9
3) T-sh-t-r	anti albúmina-humana			+	7	1
4) T-ss-r	anti gamma-humana			-	1	7
5) T-ss-r	anti albúmina-humana			+	21	1
6) T-ss-r	anti ₂ macroglobulina humana			-	1	7
7) T-ss-r-t	anti gamma-humana			-	0	24
8) T-ss-r-t	anti albúmina-humana			-	2	10

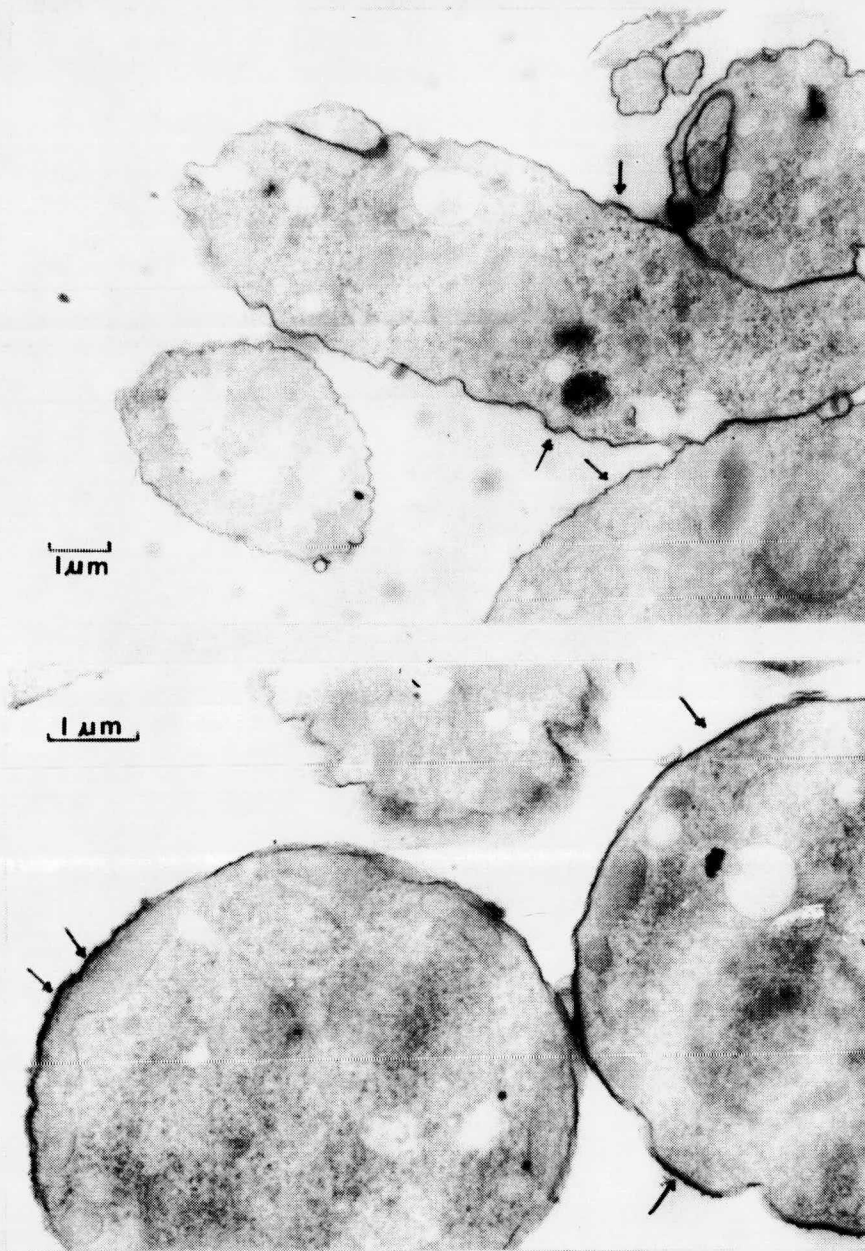


Fig. 1y2. Tripanosomas cultivados en LIT con suero de conejo tra--
tados con gamma globulina anti conejo acoplada a peroxidasa y --
tratada con 3,3 DAB-H₂O₂. Se observa producto de la reacción de
peroxidasa (flechas) en casi toda la superficie de los tripanoso--
mas, lo que indica presencia de gamma globulinas de conejo en es--
ta superficie. Aumento 9000 X y 12000 X.

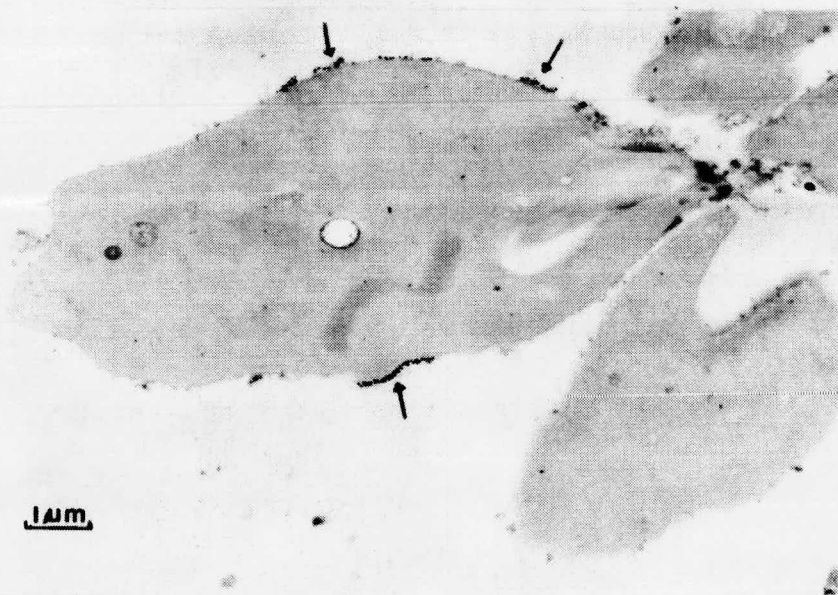
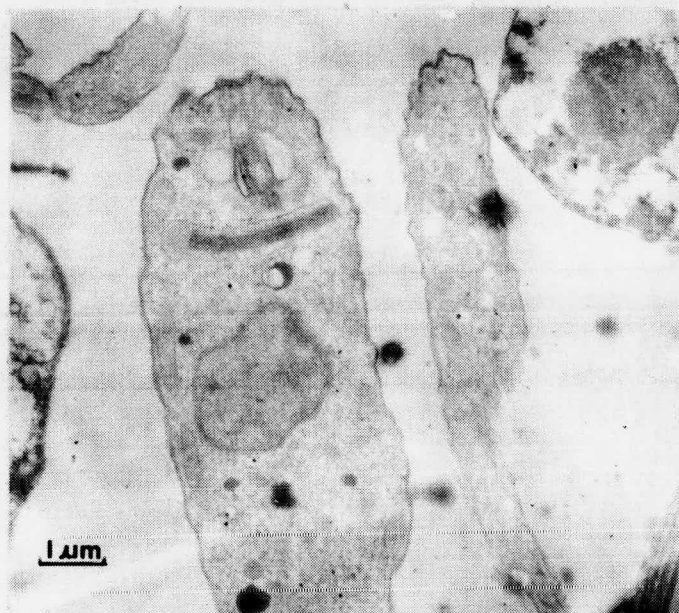


Fig. 3. Tripanosomas cultivados en LIT-suero fetal tratados con GAC-perox y 3,3 DAB- H_2O_2 . No se observa reacción, lo cual indica que la GAC-perox no cruza con las proteínas de suero fetal y que no hay fijación inespecífica del anticuerpo en este sistema. Aumento 9000 X.

Fig. 4. Tripanosomas cultivados en medio LIT-suero humano tratados anti albúmina en conejo y con GAC-perox 3,3DAB- H_2O_2 . Se puede observar producto de la reacción de peroxidasa lo que indica presencia de albúmina (flechas). Aumento 9000 X.

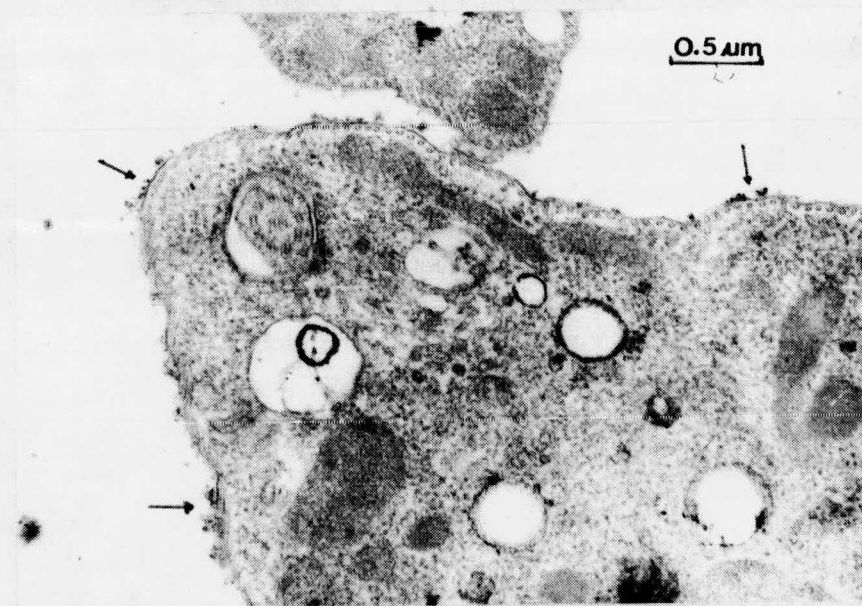
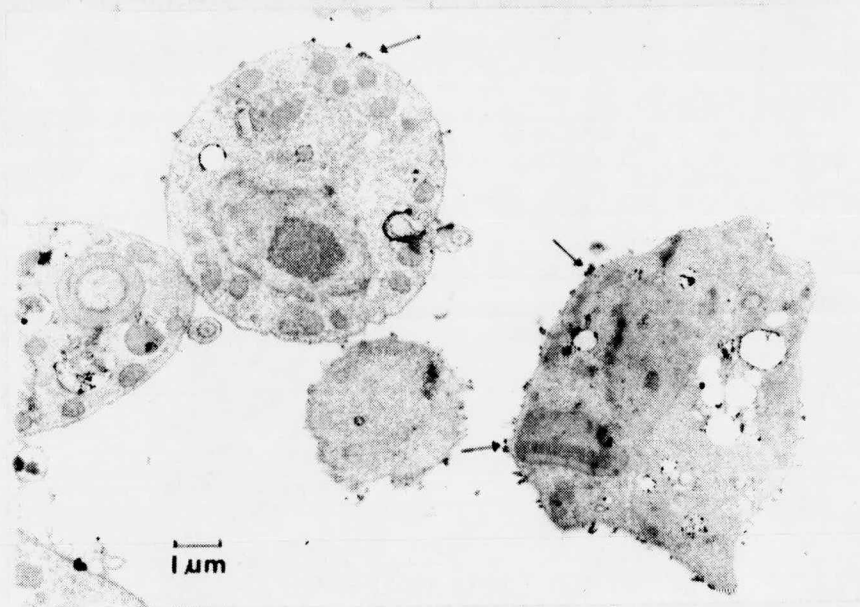


Fig. 5. Tripanosomas cultivados en medio LIT-suero humano tratados con antialbúmina humana y con GAC-perox 3,3 DAB-H₂O₂. El producto de la reacción positiva indica presencia de albúmina en su superficie. Aumento 6000 X.

Fig. 6. Tripanosomas cultivados en LIT-suero humano, tripsinizados, reincubados con suero humano, tratados con anti albúmina -- humana en conejo y GAC-perox 3,3 DAB-H₂O₂. Se puede observar que despues del tratamiento dado se adquiere nuevamente la cubierta de proteínas séricas. Aumento 24000 X.

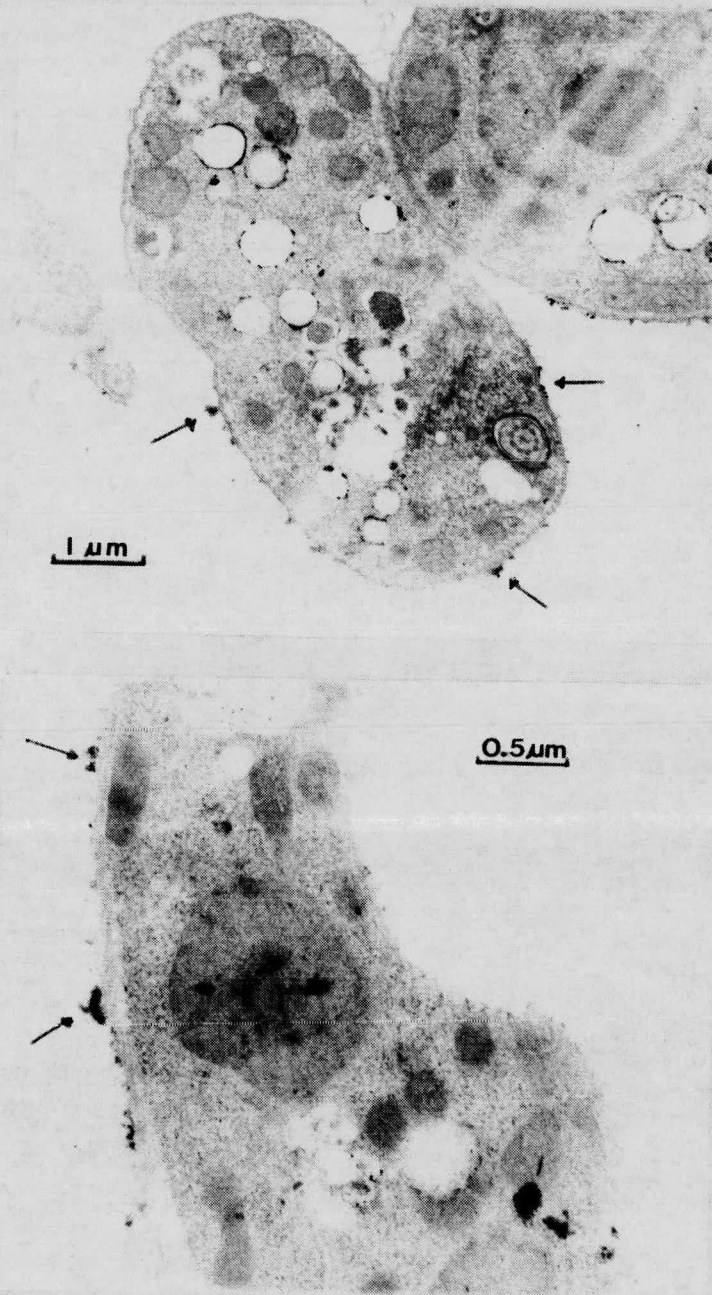


Fig. 7y8. Trypanosomas cultivados en LIT-sin suero, incubados en suero humano, tratados con anti gamma globulina humana y con anti albúmina humana respectivamente más GAC-perox 3,3 DAB-H₂O₂. Se puede apreciar producto de la reacción en su superficie lo -- que indica que adquieren estas proteínas en su superficie. Aumento 12000 X y 24000 X.

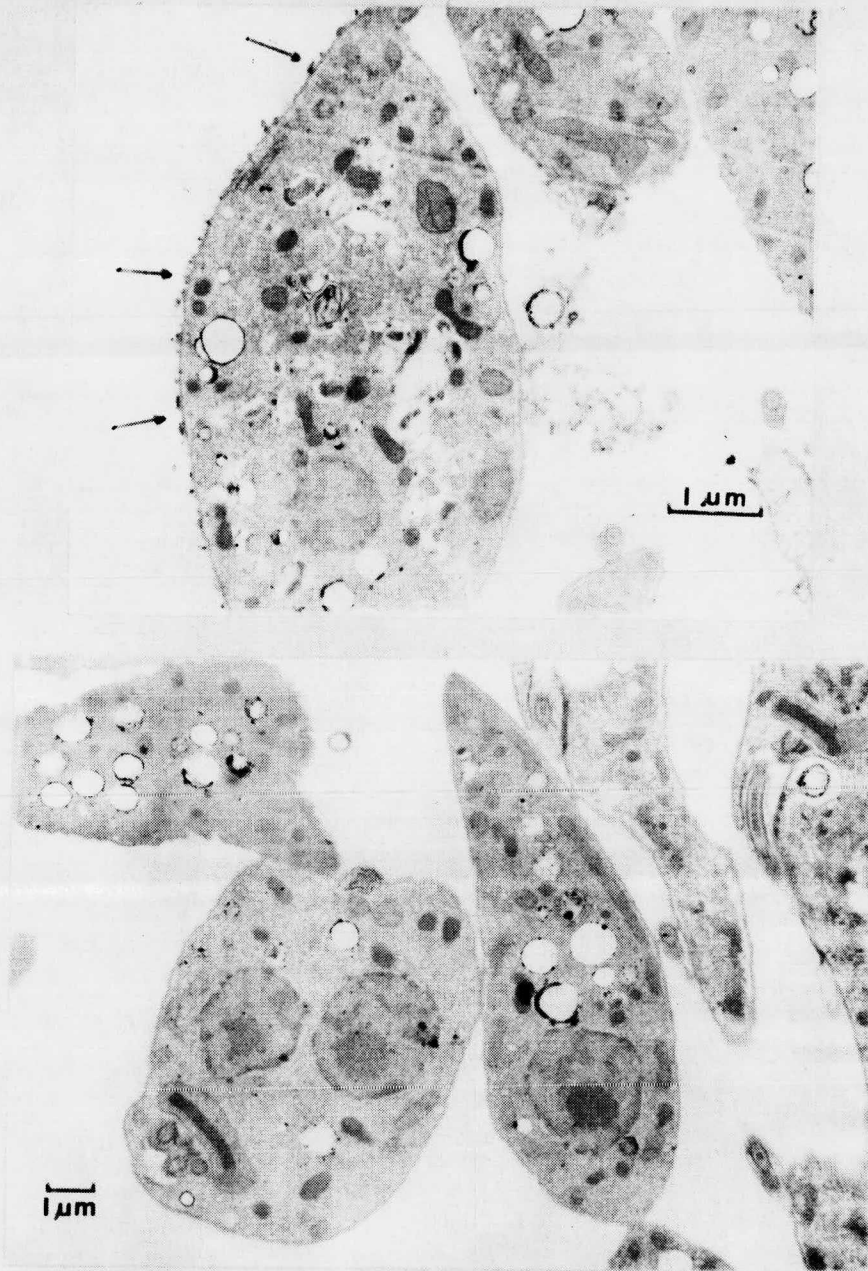


Fig. 9. Tripanosomas cultivados en LIT-sin suero, incubados en suero humano, tratados con anti alfa-2-macroglobulina humana y -GAC-perox 3,3 DAB-H₂O₂. Se observa producto de la reacción de peroxidasa lo que indica presencia de esta proteína en su superficie. Aumento 12000 X.

Fig. 10. Tripanosomas cultivados en LIT-sin suero, incubados en suero humano, tripsinizados tratados con anti gamma globulina humana y con GAC-perox 3,3 DAB-H₂O₂. No se observa reacción lo que indica que el tratamiento con tripsina eliminó el recubrimiento de proteínas séricas adquiridas durante la incubación en suero humano. Aumento 6000 X.

Discusión.

Los resultados presentados nos permiten concluir que T. cruzi al igual que T. lewisi (27) es capaz de adquirir una cubierta protéica cuando se cultiva en medios axénicos adicionados de suero. En T. lewisi se sabe que además de esto ocurre in vivo y queda por estudiar si lo mismo ocurre en T. cruzi. La forma en la que dichos parásitos adquieren esta cubierta protéica no está bien establecida, posiblemente se debe a múltiples puentes de hidrógeno entre las proteínas, ó a diferencias de carga entre la superficie del tripanosoma y las proteínas del medio. Se sabe que la superficie del tripanosoma es fuertemente aniónica, por lo cual es posible que las proteínas con menos carga negativa, o proteínas con carga positiva se adhieran a su superficie. También podría ser que tengan receptores para captar las proteínas séricas y estos podrían ser específicos o inespecíficos a una proteína. Así pues, sin importar cual sea el mecanismo es un hecho que los tripanosomas, aparentemente en todas sus formas sanguíneas adquieren una cubierta de proteínas séricas, por lo menos las tres que se estudiaron.

Haciendo una apreciación cuantitativa su distribución en la superficie es al azar y la cantidad y frecuencia con la que se encuentran parece que depende de la cantidad presente en el suero y de la naturaleza de la proteína, por lo menos parece que así ocurre con las tres proteínas estudiadas.

Ahora se postula que este recubrimiento de proteínas séricas propias del huésped sirven a el tripanosoma como un mecanismo para enmascararse de la respuesta inmune, esto se postula por el hecho de que se ha observado parasitemia y presencia de anticuerpos específicos-

simultáneamente sin que estos sean efectivos en su totalidad, como ya se mencionó anteriormente.

Esto hace pensar que el tripanosoma recubierto de proteínas pasa frente al sistema inmunológico como una partícula propia del huésped y no sería atacada, sin embargo se ha observado lisis de tripomastigotes in vitro en presencia de anticuerpos específicos y complemento. Posiblemente esto se debe a que tanto in vivo como in vitro solo son destruidos los que no alcanzan a adquirir esta cubierta protéica o la adquieren en forma incompleta y entonces pueden ser reconocidos y lizados; esta capacidad de adquirir la cubierta de proteínas séricas es posible que dependa de la morfología de el tripanosoma.

La posibilidad de que anticuerpos específicos se adhieran a la membrana de tripanosoma y no ocurra lisis, se pueden explicar de la siguiente manera:

19.- En general se ha visto que las células nucleadas no son muy susceptibles a lisis por la acción de el complemento, esta poca susceptibilidad, en este caso, es posible que se deba a que los anticuerpos contra tripanosoma no sean del tipo de anticuerpos de la subclase γ_4 de la IgM, o de IgG, que son las que activan al complemento por la vía clásica.

20.- Si la fijación de proteínas a la membrana del parásito es inespecífica, no es entonces necesario que el anticuerpo se adhiera a la superficie del tripanosoma por el fragmento captador de el antígeno Fab. y que la fracción Fc de ese anticuerpo quede bloqueada por la superficie de el tripanosoma, entonces por inhibición

estérica el complemento no podrá actuar.

Aunados a este mecanismo de resistencia están los mencionados en el capítulo I, que son: La inmunosupresión, la nulificación de la acción de macrofagos, la presencia de fracciones antigénicas comunes y la variación antigénica que juntos forman un todo para explicar la forma en que escapan estos parásitos a la respuesta inmune.

CAPITULO IV

RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN.

Se investigó la presencia de proteínas séricas en la superficie de tripanosomas cultivados en medios de -- LIT-suero de conejo y LIT-suero humano, utilizando anticuerpos anti-gammaglobulina humana, anti-albúmina humana y anti- α 2 macroglobulina humana obtenidos en conejo y anticuerpo anti-gammaglobulina de conejo marcado con la enzima peroxidasa.

En los tripanosomas cultivados en LIT-suero humano se investigó albúmina, gammaglobulina y α 2 macroglobulina, encontrándose que las tres proteínas están presentes en su superficie.

Al tratar de inducir el fenómeno en tripanosomas cultivados en medio LIT-sin suero, incubados posteriormente en suero humano, solamente se detectó albúmina en su superficie.

En tripanosomas cultivados en LIT-suero humano-trip-sinizados, incubados posteriormente en suero humano, se encontró que solamente adquirirían albúmina en su superficie.

CONCLUSIONES.

1a.- Los resultados de esta tesis comprueban que Trypanosoma cruzi es capaz de fijar en membrana -- proteínas séricas humanas in vitro y se establece la posibilidad de que lo mismo ocurra in vivo y que este fenómeno pueda funcionar como un posible mecanismo de resistencia a la respuesta inmune, como un fenómeno de "enmascaramiento".

2ª.- Esta técnica inmunoenzimática permite localizar con gran precisión y especificidad en microscopía electrónica los sitios donde se encuentra el complejo antígeno-anticuerpo-peroxidasa.

3ª.- La elaboración y el uso de este anticuerpo-peroxidasa no tiene mayor dificultad y es por lo tanto adaptable a aquellas técnicas donde se requieran anticuerpos marcados y puede ser, dependiendo de las condiciones particulares de la técnica, detectable en microscopía de luz o electrónica.

A P E N D I C E

PREPARACION DE REACTIVOS
QUIMICOS Y BIOLÓGICOS.

PREPARACION DE REACTIVOS QUIMICOS Y BIOLOGICOS

Medios de cultivo.

Medio de (LIT) infusión de hígado y triptosa.

Infusión de hígado-Bacto liver infusión broth	20 g.
NaCl	4.0 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄	8.0 g
Dextrosa	2.0 g
Triptosa-Difco	5.0 g
H ₂ O destilada1000.ml.

Se ajusta a pH 7.4 con HCl 1 N se esteriliza en autoclave a 15 libras de presión y 121°C por 15 min. Se almacena a 4°C.

Hemina:

Se disuelven 5 mg/ml de hemina en una solución al 5% de trietanolamina y se esteriliza por filtración en filtro Millipore, se añade al medio de LIT a una concentración final de 0.4 %.

Reactivos biológicos para medio de cultivo:

Suero normal de conejo inactivado a 56°C durante - 30 min. en baño de agua.

Suero humano normal inactivado a 56°C, 30 min.

Suero fetal de ternera inactivado a 56°C, 30 min.

El suero de conejo se obtiene por punción cardíaca, la sangre se pasa a un tubo de centrifuga, se deja

en reposo hasta que se forma el coágulo y después se centrifuga a 3000 rpm. durante 15 min. a 4°C. El suero así obtenido es inactivado y esterilizado por filtración, se guarda en tubos estériles en alícuotas de 2.0 ml a -20°C.

El suero humano se obtuvo de una mezcla de donadores sanos en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional IMSS, proporcionado por el doctor Rodríguez Moyado. Este suero se esterilizó por filtración.

El suero fetal de ternera es de BIOCEL, S.A., se esterilizó por filtración

Cada uno de los sueros se añade al medio LIT a manera de tener una concentración final del suero respectivo del 10%. Se guardan en botellas estériles, quedando:

- ii- Medio LIT suero de conejo al 10% (LIT-sc)
- iii- Medio LIT suero humano al 10% (LIT-sh)
- iv- Medio LIT suero fetal de ternera al 10% (LIT-sf)
- v- Medio LIT sin suero (LIT-ss)

xxv - Cepa.

La cepa de T.cruzi fué proporcionada por la doctora Cristina C. de Nava, investigador de tiempo completo del IIBM de la U.N.A.M. Fué aislada en el estado de Chiapas por xenodiagnóstico de pacientes humanos. La cepa se mantiene en forma de epimastigotes por medio de cultivos seriados en medio de LIT-sf (iv), LIT-sc (ii), LIT-sh (iii) y LIT-ss (v).

--0--

vi- Amortiguador de cacodilato de sodio.

Se prepara una solución de cacodilato de sodio -

0.2 mol/lt en agua. Se conserva en refrigeración.

Vii- Fijador Karnovsky.

Preparación.- A 25 ml de agua bidestilada a 60 - 70°C se agregan 2 g de paraformaldehído, lentamente y con agitación mecánica constante. Si la solución no queda clara se agrega una gota de NaOH 1.0 mol/lt. A la solución anterior se agregan 5 ml de glutaraldehído al 50% en agua y 45 ml de amortiguador de cacodilato de sodio (vi), se añade 25 ml de agua bidestilada y por último se añaden 50 mg de cloruro de calcio.

La solución de trabajo se prepara con 1 volumen de fijador Karnovsky y un volumen de amortiguador de cacodilato de sodio (vi). Se conserva en refrigeración y protegido de la luz.

viii- Amortiguador de Glicina.

Preparación.- Una solución de NaCl 2.0 mol/lt y NaHCO₃ 0.2 mol/lt en 100 ml se agrega a una solución de glicina 2.0 mol/lt, consérvese en refrigeración.

ix- Amortiguador de fosfatos-glucosa (PBSG).

Fosfato diácido de sodio 1.29 mMol/lt

Fosfato dibásico de sodio 5.4 mMol/lt

Cloruro de sodio 137 mMol/lt

D-glucosa 9.9 mMol/lt.

En 1000 ml de agua, ajustar el pH a 7.45 con HCl 0.1 N ó si es necesario con NaOH 0.1 N.

x- Solución de tripsina.

Preparación.- Preparar una solución al 0.5% (P/V) en PBSG (ix), la solución se filtra por Millipore de - - 0.45 μ m, y debe prepararse en el momento de usarse.

xi.- Amortiguador de carbonato de sodio pH 9.5

Preparar 1000 ml de carbonato de sodio 0.01 mol/lt y 1000 ml de bicarbonato de sodio 0.01 mol/lt; mezclarlos lentamente con agitación mecánica midiendo continuamente el pH hasta obtener el requerido.

xii- Amortiguador de fosfatos pH 7.1

Preparar.- 8.7 g de NaCl en 1000 ml de agua, 2.11g de fosfato dibásico de sodio en 100 ml y 2.07 g de fosfato diácido de sodio en 100 ml de agua, mezclar todas las soluciones y ajustar el pH con HCl 0.1 N.

xiii- Reactivo de Folin-Ciocalteus para cuantificar proteína.

Método de Lowry.

Preparación - El reactivo "C" consta de :

Sulfato de cobre pentahidratado al 1% - 0.1 ml.

Tartrato de sodio y potasio al 2% - 0.1 ml.

Carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1N - 9.8 ml.

xiv- Solución salina NaCl al 0.85% en agua.

xv- Amortiguador Tris 0.05 mol/lt pH 7.6.

Preparación.- Disolver en agua la cantidad necesaria de Tris Base (sigma No T-1503) para hacer una solución 0.05 mol/lt, se ajusta el pH a 7.6 con HCl 1.0 N.

xvi- Sustrato para la enzima peroxidasa.

Preparación.- A 9.9 ml de amortiguador Tris 0.05 mol/lit pH 7.6 se le agregan 5 mg de 3,3 Diaminobencidina - (Sigma) y 0.1 ml de H₂O₂ al 0.1%. Este reactivo se prepara en el momento de usarse.

xvii- Tetraoxido de osmio (Merk art. 245051) al 2% en - amortiguador de cacodilato de sodio 0.2 M (vi).

xviii- Alcoholes graduales.

Alcohol etílico absoluto.

Alcohol etílico al 95%.

Alcohol etílico al 80%.

Alcohol etílico al 70%.

Oxido de propileno (Eastmen 2086).

xix- Resina de inclusión 6:4

Preparación de la resina.- La mezcla A consta de 62 ml de Epon 812. y 100 ml de anhídrido dodecenil succinico (DDSA) mezclados perfectamente en un frasco de 200 ml. Con- servar en refrigeración y protegido de la humedad.

Mezcla B.- En un frasco de 200 ml se depositan 100 ml de Epon 812 y agregue 89 de anhídrido metil nadico - - (NMA) mezclar bien y guardar en refrigeración y protegido de la humedad.

Resina de inclusión.- Se prepara mezclando 6 ml de mezcla A con 4 ml de mezcla B y 0.14 ml de Tri(dimetil aminoetil) (DMP-30) como catalisador para la polimerización. Esta es la resina 6:4 que se prepara en el momento de usarse.

xx- Preparación de GAC-perox.

- 1º.- Disolver en un vaso de precipitado de 5 ml, 5.0 mg - de peroxidasa (Horseradihs Peroxidase type VI.Sigma) en - 1.0 ml de bicarbonato de sodio 0.3 M recién preparado.
- 2º.- A la solución anterior agregar 0.1 ml de 2,4 dinitro fluorobenceno al 1% en alcohol absoluto, se mezclan lenta-- mente durante una hora a temperatura ambiente. Si la pero-- xidasa no es pura se puede formar un precipitado que hay - que eliminar por centrifugación.
- 3º.- Agregar 1.0 ml de periodato de sodio 0.06 M, se mez-- clan lentamente durante 30 min. a temperatura ambiente.
- 4º.- Agregar 1.0 ml de etilen glicol 0.16 M, se mezclan - lentamente una hora a temperatura ambiente.
- 5º.- Dializar la solución anterior contra amortiguador de carbonatos 0.01 M (xi) un día a 4°C con cambios de amorti-- guador cada 8 horas.
- 6º.- Agregar la solución equivalente a 5.0 mg de immuno-- globulina (GAC) (xxiv) a 3.0 ml de la solución peroxida-- sa-aldehido y mezclar lentamente dos o tres horas con agi-- tación continua a temperatura ambiente.
- 7º.- Dializar esta solución contra PBS 0.15 mol/lt pH 7.1 (ix), a 4°C durante un día, se puede formar algo de preci-- pitado que hay que eliminar por centrifugación.
- 8º.- Para separar la inmunoglobulina marcada de la no mar-- cada y de la peroxidasa libre, se pasa el dializado anterior por una columna cromatográfica de Sephadex G 200 usando como

eluyente PBS 0.15 mol/lit pH7.1 a temperatura ambiente y - controlando el flujo de la columna a 4 gotas/min. 0.2 ml; - esta columna separa a la mezcla de proteínas por su peso molecular, permitiendo que salgan primero las de mayor peso molecular que corresponde a la GAC-peroxidasa y en las fracciones posteriores saldrán la GAC libre y la peroxidasa libre que no alcanzaron a acoplarse. Se recogen fracciones de 3 ml y seleen en espectrofotómetro a 280 nm la absorción de la proteína en solución, usando como blanco PBS 0.15 mol/lit pH 7.1 Se grafica absorción contra número de fracción y se localiza el primer pico, que corresponde a la fracción de GAC-peroxidasa. (gráfica 5).

Con el procedimiento anterior se debe acoplar del 70 - 90% de la peroxidasa con la inmunoglobulina y aproximadamente el 99% de la inmunoglobulina se marca con la peroxidasa sin que se pierda en grado apreciable la actividad de anticuerpo o de enzima.

92.- Se hace la determinación de proteína de las fracciones concentradas por el método de Lowry (31). Este es un método rápido para cuantificar proteína formando complejo con cobre alcalino y determinando la cantidad de complejo formado con reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck art 9001). El Método de Lowry se describe a continuación:

En tubos de 16 x 150 se pone 1.0 ml de solución - patrón de proteína (albúmina) de manera que quede a concentraciones de 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml y 25 μ g/ml respectivamente, en cada tubo; con estos se construirá la curva estandar.

En otro tubo se pone 0.1 ml de la solución de proteína por cuantificar y se le agregan 0.9 ml de solución salina 0.85%.

A cada tubo se añaden 4 ml de reactivo "C" (xiii) se agitan y se dejan reposar a temperatura ambiente. - A cada tubo se añaden 0.4 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu 1:2, se mezclan bien y se deja reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Leer en espectrofotómetro a 600 nm. Graficar D.O. contra concentración.

Prueba de actividad de anticuerpo y enzima de la GAC-peroxidasa.

Una vez cuantificada la proteína correspondiente a GAC-peroxidasa, se hace un Ouchterlony para conocer la dilución a la cual todavía forman bandas.

En el pozo central de la placa de agarosa al 0.8% (xxv) se coloca suero normal de conejo y en los pozos periféricos se ponen diluciones de GAC-perox en amortiguador de veronal (xxvi) de la siguiente manera:

- 1.- GAC-peroxidasa 1:1
- 2.- GAC-peroxidasa 1:2
- 3.- GAC-peroxidasa 1:4
- 4.- GAC-peroxidasa 1:8
- 5.- GAC-peroxidasa 1:16
- 6.- GAC-peroxidasa 1:32

Después de formadas las bandas se baña la placa con reactivo-substrato para la enzima peroxidasa (xvi) con el objeto de comprobar la actividad de peroxidasa, que si es positiva se torna color café.

Una vez conocida la cantidad de proteína y la máxima dilución en que hay formación de bandas, se puede almacenar el anticuerpo marcado a -20°C .

xxi- Suero anti IgG humana. Behringwerke.

xxii- Suero anti alfa 2 macroglobulina humana. Behringwerke.

xxiii- Suero anti albúmina humana.

xxv- Placas de agarosa.

Preparar agarosa al 0.8% con amortiguador de Veronal 0.1 mol/lt en baño de agua hasta que la solución sea homogénea, se vacía sobre portaobjetos para formar los geles.

xxvi- Amortiguador de Veronal.

26.6 g. dietilbarbiturato de sodio.

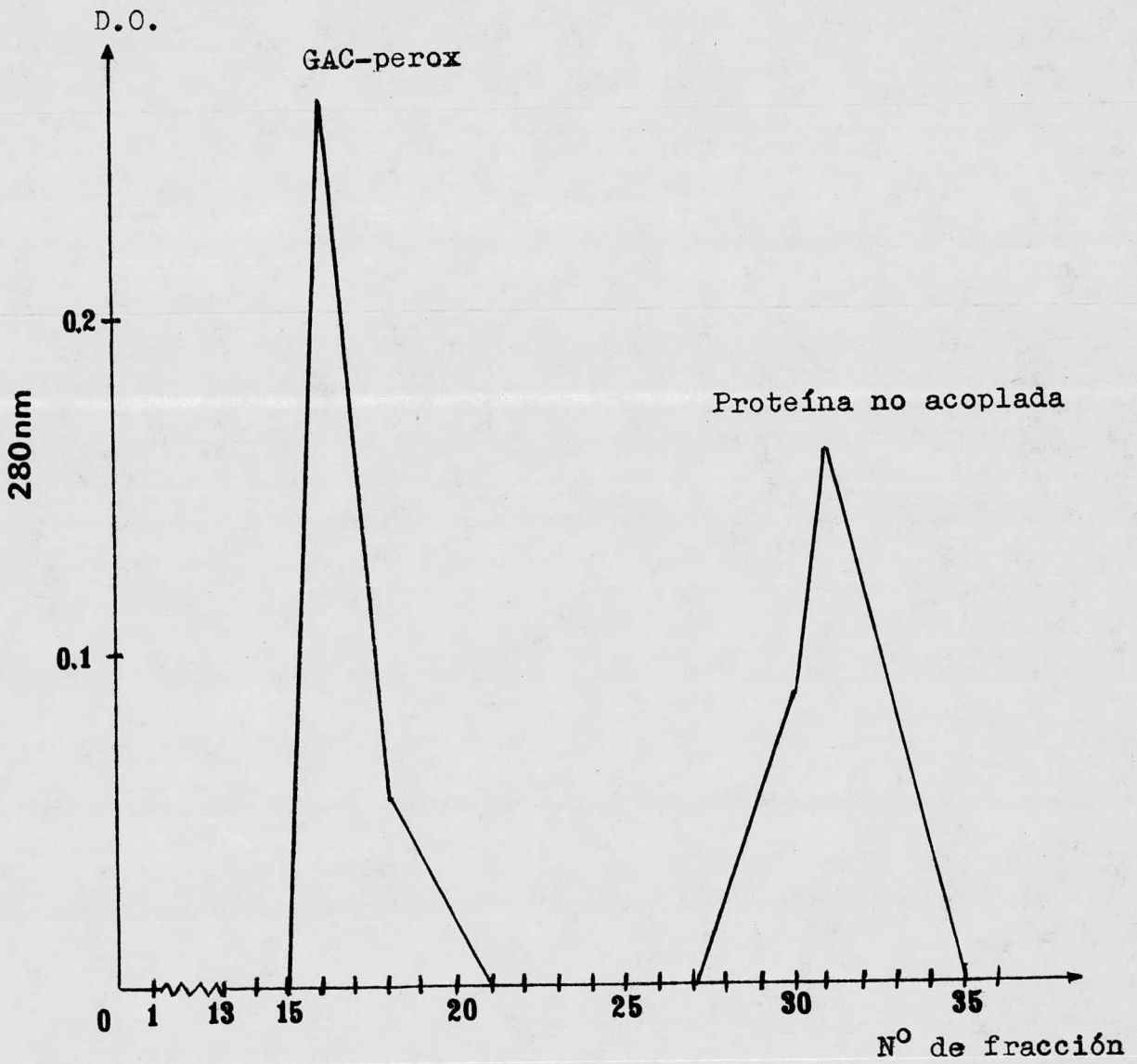
4.0 g. ácido dietil barbitúrico.

1.0 g azida de sodio

1000 ml. de agua.

Concentración final 0.1 mol/lt.

GRAFICA 5



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Brown, H. W. 1970. Parasitología Clínica.
Ed. Interamericana 3ª ed. Mex. 142.
- 2.- Biagi, F. 1970. Enfermedades Parasitarias. La --
prensa médica Mexicana. Ed. Fournier
J. A. Mex. 139
- 3.- Cheng, T. C. 1973. General Parasitology. Academic
Press. N. Y. and London. 143, 145,
858.
- 4.- Faust, E. C. Russell, P. F. Jung, R. C. 1974.
Parasitología Clínica. Salvat Editores
S.A. 8ª Ed. Mex. 107.
- 5.- Teixeira, A. R. L. L. Teixeira. and C. A. Santos Buch
1975. The immunology of experimental --
Chagas disease IV. Am. J. of Pathology.
80. 163.
- 6.- Globe, F. C. 1970. South american trypanosomas immuni-
ti to parasitic animal. Ed. G. J. Jackson
R. Herman and I. Singer Apleton. Century
Crofts N. Y. 569.
- 7.- Costache, A. T. T. and O. H. Corneci I. 1974. Restora-
tion by immunocompetent cell of chemote-
rapy efficiency abolished by total irra-
diation in experimental trypanosomiasis
of ran wistar rats. Radiat Res. 59. 164.
- 8.- Gonzales-Cappa, S. M. and Kagan, I. G. 1969. Antigenic
variation of T. cruzi detected by immune
serum. Exp. Parasit. 25. 50.
- 9.- Nussenzweig V. 1963. African trypanosomas antigens.
Exp. Parasit. 14. 221.
- 10.- Krettli, A. V. and Z. Brener. 1976. Protective effects
of specific antibodies in Trypanosoma --
cruzi infections. J. Immunol. 116. 755.
- 11.- Gross, G. A. M. 1975. Surface glicoprotei in trypanoso-
ma. Parasitology. 71. 393.

- 12.- Cliton, B.A., L.Ortiz-Ortiz, W.García., T.Martínes and R.Capín. 1975. T.cruzi early immune response in infected mice. Exp.Parasitol. 37. 417.
- 13.- Murray, P.K., F.W.Jennings., M.Murray and G.M.Urguhart 1974. The nature of immunosupresion in Trypanosoma brucei infections in mice. The role of the macrophage. Immunol. 27. 815.
- 14.- Vattuone, N.H., Gonzales-Cappa., G.A.Menes Schumuñis. 1974. Cell mediated and humoral immune response of mice infected whit Trypanosoma cruzi. Tropenmod Parasit. 25. 267.
- 15.- Marsden D., A.Goild. 1974. Trypanosomas. The Lancet. 13. 690.
- 16.- Kierszenban F., J.Ivanyi and B.Budzko. 1976. Role of complement in avian resistance to Trypanosoma cruzi infection. Immunol. 30. 1
- 17.- Budzko, D.B., M.C. Pizzimen., F.Kierszen 1975. Effects of complement depletion in experimental Chagas disease immune lisis of virulent forms of blood forms of Trypanosoma cruzi.
- 18.- Rifkin M.R. and R.Eger. 1974. Effect of human serum on the surface of Trypanosoma brucei. -- J.Cell.Biol. 63. 284.
- 19.- Curtis, L.Patton. 1975. The ablastin phenomenon: Inhibition of membrane function. Exp.Parasitol. 38. 303.
- 20.- D.Alesandro. P.A. 1975. Ablastin: The phenomenon. Exp. Parasitol. 38. 357.
- 21.- Bauden M.P. and L.A.Stamber. 1974. Trypanosoma lewisi: Characteristic of an antigen which induces ablastic antibody. Exp. Parasitol. 36. 397.

- 22.- Deane M.P. and J.Klortzel. 1974. Lack of protection against Trypanosoma cruzi by multiple doses of T.lewisi culture forms. Exp.Parasitol. 36. 406.
- 23.- Logan L.L. and W.L.Humson. 1974. Trypanosoma cruzi morphogenesis in difusion chambers in the mouse peritoneal cavity and attempted stimulation of host immuniti.Exp.Parasitol. 36. 439.
- 24.- Seah,S. 1970 Trypanosoma. Nature London. 255. 1256.
- 25.- Tschund I.,DanteF.A. and Agustin P.D. 1972. Antigens in T. cruzi. Infect.Immun. 6. 905.
- 26.- Ogilvie,B.M. and R.J.M.Wison. 1976. Evasion of the immune response by parasites. Brit.Med. Bul. 32. 177.
- 27.- Dwyer M.D. 1976. Immunologic and fine structure evidence of avidy bound host serum protein in the surface coat of a bloodstream trypanosome. Nat.Acd.Sci.USA. 73. (4). 122.
- 28.- Seligman A.M. 1972. Enzymes bound to antibodies in electron mycroscopy. J.Cell.Biol. 38. 1.
- 29.- Sternberger L.A. 1974. Immunocytochemistry. Ed.Pren-tice Hall Inc. Engle Wood Cliffs. New -- Jersey. 110.
- 30.- Karnovsky M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron mycroscopy. J.Cell.Biol. 27. 137.
- 31.- Lowry O.H.,N.J.Rosebrough.,A.L.Farr and R.J.Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J.Biol.Chem. 193. 265.
- 32.- Miller,M.H.,M.J.Karnovsky and G.H.Diamandopolous. 1974. An improved immunoperoxidase techni-que for identifying SV 40 virus by light mycroscopy. Proc.Societ.Exp.Biol.MEd. 146. 432.

- 33.- Graham, R.C. and Karnovsky M.T. 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubule of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem.* 14. 291.
- 34.- Dwyer, D.M. 1975. Cell surface sacharides of Trypanosoma lewisi. I. Polycation induced cell agglutination and fine structure cytochemistry. *J. cell. Sci.* 19. 621.