

## Tesis de Posgrado

# Uso de antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi* para el estudio de la respuesta humoral en la enfermedad de Chagas

Reyes, María Beatriz

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Reyes, María Beatriz. (1991). Uso de antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi* para el estudio de la respuesta humoral en la enfermedad de Chagas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2446\\_Reyes.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2446_Reyes.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Reyes, María Beatriz. "Uso de antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi* para el estudio de la respuesta humoral en la enfermedad de Chagas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2446\\_Reyes.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2446_Reyes.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

1 2446

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**USO DE ANTIGENOS RECOMBINANTES DE *Trypanosoma cruzi* PARA  
EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL EN LA  
ENFERMEDAD DE CHAGAS**

**MARIA BEATRIZ REYES**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO CARLOS C. FRASCH**

Tesis.  
2446  
g. 2.

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS  
FUNDACION CAMPOMAR**

**1991**

**A mi madre**

**A mi marido Fernando**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Carlos Frasch por haberme permitido trabajar en investigación científica, por sus oportunos consejos, por la confianza depositada en mí y haberme ayudado a finalizar esta tesis.

Al Dr. Roberto Macina por guiar mis primeros experimentos en Biología Molecular, por su compañerismo y su permanente buena disposición.

A mis "viejos" compañeros de laboratorio Guido Pollevick, Roberto Macina, Susana Salceda, Oscar Campetella, Susana Leguizamón, Daniel Sánchez, José Luis Affranchino, Sergio Iglesias, Javier Martínez; por su compañerismo, apoyo y los lindos momentos pasados durante todos estos años.

A mis "nuevos" compañeros de laboratorio Marcelo, Alejandro, Dévora y Martín.

A mis compañeros del IIB "Fundación Campomar", por los agradables momentos compartidos.

A todo el personal del IIB "Fundación Campomar"

A mi madre por su apoyo y afecto a lo largo de toda esta "larga" carrera en Biología

A mis hermanas Roxana, Graciela y Florencia por su amistad, compañerismo y afecto durante todos estos años.

A mi marido Fernando por su apoyo incondicional para finalizar esta tesis y estar a mi lado en todo momento.

## **TRABAJOS PUBLICADOS DURANTE EL PERIODO DE TESIS**

- *Trypanosoma cruzi* isolates from Argentina and Chile grouped with the aid of DNA probes.

Roberto A. Macina, Silvia Arauzo, María B. Reyes, Daniel O. Sánchez, Miguel A. Basombrió, Enrique Montamat, Aldo Solari & Alberto C.C. Frasch  
Molecular and Biochemical Parasitology, (1987) 25: 45-53

-Cloning of genes for antigenically relevant proteins of *Trypanosoma cruzi*.

Alberto C. C. Frasch, José L. Affranchino, Carlos Ibáñez, Roberto A. Macina, María B. Reyes, Mario E. Camargo, Lena Åslund & Ulf Pettersson  
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Suppl. (1987) Vol. 82: 238-251

-Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs.

Carlos F. Ibáñez, José L. Affranchino, Roberto A. Macina, María B. Reyes, Susana Leguizamón, Mario E. Camargo, Lena Åslund, Ulf Pettersson & Alberto C. C. Frasch  
Molecular and Biochemical Parasitology, (1988) 30: 27-34

-Identificación of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas disease

José L. Affranchino, Carlos F. Ibáñez, Alejandro O. Luquetti, Anis Rassi, María B. Reyes, Roberto A. Macina, Lena Åslund, Ulf Pettersson & Alberto C. C. Frasch.  
Molecular and Biochemical Parasitology, (1989) 34: 221-228

- *Trypanosoma cruzi* proteins which are antigenic during human infections are located in defined regions of the parasite.

Thais Souto-Padron, M. Beatriz Reyes, Susana Leguizamón, Oscar Competella, Alberto C.C. Frasch & Wanderley de Souza  
European Journal of Cell Biology (1989) 50: 272-278

-Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns.

María B. Reyes, Myriam Lorca, Patricia Muñoz & Alberto C. C. Frasch  
Proceedings of the National Academy of Science. USA (1990) 87: 2846-2850

-Diagnosis of Chagas disease using recombinant DNA technology

A. C. C. Frasch & M. B. Reyes  
Parasitology Today (1990) 6:137-139

-Bloodstream *Trypanosoma cruzi* parasites from mice simultaneously express antigens that are markers of acute and chronic human Chagas disease

M. S. Leguizamón, O. E., Campetella, M. B. Reyes, C. F. Ibáñez, M. A. Basombrio, J. Rincón, A. Örn & A. C. C. Frasch.  
Parasitology (1991) 102: 379-385

## **ABREVIATURAS**

aa	Aminoácido
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNk	ADN kinetoplástico
ARN	Acido ribonucleico
CU	Cordón umbilical
g	Aceleración de la gravedad
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	Inmunoglobulina
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
kDa	KiloDaltons
n. s. c.	Negativización por serología convencional
NK	Natural killer
NP-40	Nonidet P-40 (octilfenoxi-polietoxietanol)
p. a. s. a.	Posteriores aparición síntomas agudos
p. i.	Post infección
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RN	Recién nacido
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBS	Buffer tris salino
Tris	Tris-(hidroximetil) aminoetano
ufp	Unidad formadora de placas de lisis



**INDICE**

<b>INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Enfermedad de Chagas .....	2
1.1.1 Descripción de la enfermedad y descubrimiento del agente causal.....	2
1.1.2 Epidemiología.....	2
1.1.3 Etapas aguda y crónica de la enfermedad.....	4
1.1.4 Enfermedad de Chagas congénita .....	6
1.2 Biología de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	8
1.2.1 Generalidades.....	8
1.2.2 Ubicación sistemática.....	9
1.2.3 Heterogeneidad de las poblaciones de <i>T. cruzi</i> .....	11
1.2.4 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	12
1.3 Respuesta inmune en la enfermedad de Chagas.....	15
1.3.1 Citotoxicidad mediada por células.....	15
1.3.2 Producción de anticuerpos.....	16
1.4 Respuesta humoral fetal e infecciones congénitas .....	19
1.5 Autoinmunidad.....	22
1.5.1 Autoinmunidad mediada por anticuerpos.....	23
1.5.2 Autoinmunidad mediada por células.....	24
1.6 Antígenos de <i>T. cruzi</i> .....	25
1.6.1 Composición antigénica de <i>T. cruzi</i> .....	25
1.6.1.1 Antígenos involucrados en protección.....	26
1.6.1.2 Antígenos involucrados en diferenciación.....	27
1.6.1.3 Antígenos involucrados en la evasión de la respuesta inmune.....	28

1.6.1.4 Antígenos involucrados en la interacción y penetración de la célula huésped.....	29
1.6.2 Clonado de genes que codifican antígenos de <i>T. cruzi</i> .....	32
1.7 Diagnóstico.....	34
1.8 Quimioterapia.....	36
1.9 Vacunación.....	37
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>42</b>
2.1 Materiales.....	43
2.1.1 Origen y calidad de los reactivos utilizados.....	43
2.1.2 Anticuerpos y proteína A.....	43
2.1.3 Medios de cultivo.....	44
2.1.4 Antibióticos.....	44
2.1.5 Cepas de bacterias utilizadas:.....	45
2.1.6 Cepas y aislamientos de parásitos.....	45
2.1.7 Cepas de ratones.....	46
2.1.8 Sueros utilizados.....	46
2.1.8.1 Sueros de origen animal.....	46
2.1.8.2 Sueros de origen humano.....	47
2.1.9 Antígenos recombinantes usados.....	49
2.2 Inducción y purificación de proteínas de fusión.....	49
2.2.1 Preparación de bacterias para infectar.....	49
2.2.2 Obtención de fagos con alto título de infección.....	49
2.2.3 Inducción de proteínas de fusión.....	50
2.2.4 Purificación de proteínas de fusión.....	51
2.2.5 Cuantificación de las proteínas de fusión.....	51

2.3 Obtención de sueros policlonales contra proteínas de fusión.....	52
2.4 Análisis de sueros de infección usando antígenos recombinantes	52
2.4.1 Preparación de lisado de bacterias <i>E. coli</i> Y-1090 .....	52
2.4.2 Adsorción de los sueros .....	52
2.4.3 Obtención de proteínas recombinantes sobre filtros de nitrocelulosa.....	53
2.4.4 Marcaciones de proteína A y anticuerpos.....	53
2.4.4.1 Marcación de proteína A con <sup>125</sup> I.....	53
2.4.4.2 Marcación de anticuerpos con <sup>125</sup> I.....	54
2.4.5 Detección de anticuerpos en sueros de infección.....	54
2.4.5.1 Usando <sup>125</sup> I-proteína A o <sup>125</sup> I-anticuerpos.....	54
2.4.5.2 Usando anticuerpos acoplados a peroxidasa.....	55
2.4.6 Autorradiografías .....	55
2.5 Análisis estadístico.....	55
<b>RESULTADOS</b> .....	56
3 Obtención de anticuerpos policlonales contra antígenos recombinantes de <i>T. cruzi</i> .....	57
3.1 Antecedentes y objetivos.....	57
3.2 Obtención de proteínas de fusión. ....	57
3.3 Producción de anticuerpos policlonales en conejo.....	59
3.3.1 Análisis de especificidad .....	59
3.3.2 Utilización de los anticuerpos policlonales.....	60
4 Respuesta humoral en pacientes con enfermedad de Chagas .....	63
4.1 Antecedentes y objetivos.....	63
4.2 Etapas aguda y crónica de la enfermedad .....	66
5 Análisis de sueros de pacientes con infección congénita.....	77

6	Análisis de sueros provenientes de pacientes sometidos a tratamiento quimioterapéutico .....	90
7	Análisis de sueros de pacientes con diferentes patologías.....	98
8	Análisis de sueros de personas no infectadas con <i>T. cruzi</i> .....	102
9	Análisis de la respuesta humoral murina.....	104
9.1	Antecedentes y objetivos.....	104
9.2	Infección de diferentes cepas de ratones con distintas cepas y aislamientos de parásitos.....	105
9.3	Estudio de la respuesta humoral murina a diferentes tiempos post-infección .....	107
	<b>DISCUSION</b> .....	110
10	Análisis de especificidad de anticuerpos policlonales contra SAPA .....	111
11	Etapas aguda y crónica de la enfermedad de Chagas.....	114
12	Análisis de sueros de pacientes con infección congénita.....	117
13	Análisis de sueros provenientes de pacientes sometidos a tratamiento quimioterapéutico.....	121
14	Análisis de sueros de pacientes con diferentes patologías. ....	123
15	Análisis de sueros de personas no infectadas con <i>T. cruzi</i> .....	124
16	Análisis de la respuesta humoral murina .....	125
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	129
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	133

**INDICE DE TABLAS Y FIGURAS**

**Figura 1** Formas celulares de *T. cruzi*.....13

**Figura 2** Electroforesis de proteínas de fusión inducidas.....58

**Figura 3** Reactividad de sueros, hechos en conejo, anti-proteína de fusión SAPA y anti péptido SAPA contra antígenos recombinantes de *T. cruzi* y péptidos sintéticos.....61

**Figura 4** Secuencia de aas. de las estructuras repetitivas de SAPA, el clon #36 y el péptido sintético SAPA.....62

**Figura 5** Metodología usada para incubar los diferentes sueros con los antígenos recombinantes de *T. cruzi*.....65

**Tabla 1** Reactividad de sueros humanos de la etapa aguda de la enfermedad de Chagas con los antígenos recombinantes de *T. cruzi*.....67

**Tabla 2** Reactividad de sueros humanos, correspondientes a pacientes chagásicos con cardiopatías, con los antígenos recombinantes.....69

**Tabla 3** Reactividad de sueros humanos correspondientes a pacientes chagásicos con alteraciones digestivas, con los antígenos recombinantes .....70

**Tabla 4** Reactividad de sueros humanos correspondientes a pacientes chagásicos con patologías múltiples, con los antígenos recombinantes .....71

**Tabla 5** Reactividad de sueros humanos correspondientes a pacientes chagásicos sin sintomatología detectable, con los antígenos recombinantes .....73

**Tabla 6** Resumen de los resultados obtenidos con los sueros de las etapas aguda y crónica de la enfermedad de Chagas.....74

<b>Figura 6</b>	Reactividad de sueros de las etapas aguda y crónica de la enfermedad de Chagas con los antígenos recombinantes.....	75
<b>Tabla 7</b>	Reactividad de los sueros de la etapa crónica, agrupados según el sexo de los pacientes.....	76
<b>Tabla 8</b>	Descripción de los recién nacidos congenitamente infectados y sus correspondientes madres.....	78
<b>Tabla 9</b>	Descripción de los recién nacidos no infectados y sus correspondientes madres con enfermedad de Chagas.....	79
<b>Tabla 10</b>	IgG e IgM específicas presentes en sueros de recién nacidos congenitamente infectados y sus madres.....	81
<b>Tabla 11</b>	Resumen de IgG e IgM específicas detectadas en sueros de recién nacidos con infección congénita, no infectados y sus madres.....	82
<b>Tabla 12</b>	IgG específicas detectadas sólo en sueros de recién nacidos con infección congénita y sin infección.....	83
<b>Figura 7</b>	IgG e IgM específicas presentes en los sueros de recién nacidos con infección congénita y en sus correspondientes madres.....	84
<b>Figura 8</b>	IgG específicas presentes en diferentes diluciones de sueros de los recién nacidos con infección congénita y sus respectivas madres.....	86
<b>Figura 9</b>	IgG e IgM específicas presentes en los sueros de recién nacidos no infectados y en sus correspondientes madres.....	87
<b>Tabla 13</b>	IgG e IgM específicas presentes en los sueros de recién nacidos no infectados y en sus correspondientes madres.....	88
<b>Figura 10</b>	Resumen de los resultados del análisis de sueros correspondientes a pacientes chagásicos resistentes a tratamiento quimioterapéutico.....	92

**Figura 11** IgM e IgG específicas presentes en sueros de casos de enfermedad de Chagas resistente al tratamiento quimioterapéutico.....93

**Figura 12** IgM e IgG específicas presentes en sueros de casos de enfermedad de Chagas sensible al tratamiento quimioterapéutico.....96

**Tabla 14** IgM e IgG específicas presentes en sueros de casos de enfermedad de Chagas sensible al tratamiento quimioterapéutico .....97

**Tabla 15** Sueros de la etapa crónica de la enfermedad de Chagas agrupados según las patologías que presentaron.....100

**Tabla 16** Sueros de la etapa crónica de la enfermedad de Chagas agrupados según la presencia o ausencia de patología.....101

**Tabla 17** Sueros correspondientes a pacientes con leishmaniasis y a personas no infectadas.....103

**Tabla 18** Anticuerpos específicos presentes en sueros de distintas cepas de ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*.....106

**Tabla 19** Anticuerpos específicos presentes a diferentes períodos post-infección en ratones.....108



## **INTRODUCCION**

## **1.1 Enfermedad de Chagas**

### **1.1.1 Descripción de la enfermedad y descubrimiento del agente causal.**

En 1909, realizando estudios en la zona de Minas Gerais (Brasil), Carlos Chagas descubre, en el intestino del insecto hematóforo *Pastrongylus megistus* un parásito flagelado. Este último era el causante de una enfermedad, en esa época no descrita, que se caracterizaba fundamentalmente por anemia y daño cardíaco. Llamó a este parásito *Trypanosoma cruzi* en honor a su maestro Oswaldo Cruz. El mismo autor también demostró la existencia de este protozoo en la sangre de un niño y un gato, descubriendo de esta manera, primero el agente etiológico y luego la enfermedad causada por él (Chagas, 1911). Poco después de su descubrimiento se conoció la amplia distribución de *T. cruzi* en América Central y del Sur (Chagas, 1909). En estudios posteriores, el mismo Carlos Chagas describió detalladamente las manifestaciones clínicas de la enfermedad a la cual denominó "tripanosomiasis americana" y que hoy se conoce como Enfermedad de Chagas (Chagas, 1909a; Chagas, 1916; Chagas, 1916a). En 1926, Salvador Mazza y otros médicos argentinos (Mazza, 1926; Niño, 1926) contribuyeron al conocimiento y a la divulgación de la existencia de la enfermedad de Chagas, lo cual estimuló la investigación de la misma en otros países latinoamericanos.

### **1.1.2 Epidemiología**

La enfermedad de Chagas es una de las parasitosis más importantes de América Latina. Abarca desde México hasta la provincia de Rio Negro en

nuestro país, encontrándose la mayor prevalencia en Brasil, Venezuela y Argentina. Se calcula que en las áreas donde la endemidad es muy alta, hay aproximadamente 90 millones de personas en peligro de ser infectadas por *T. cruzi*. En la provincia de Santiago del Estero, en Argentina, y en algunas zonas de Bolivia, la prevalencia excede el 70% de la población. Recientemente, debido a estudios serológicos realizados en el área de Washington DC, en EEUU, se han encontrado inmigrantes centroamericanos infectados con *T. cruzi*, a pesar de no ser ésta una zona endémica (Kirchhoff y col., 1987). Actualmente se calcula una incidencia de 200.000 casos nuevos por año.

La transmisión de *T. cruzi* por sus vectores naturales es aún el mecanismo más importante de infección humana en las zonas endémicas. Los vectores de la enfermedad pertenecen a la familia *Reduviidae* y, en Argentina, la especie más significativa es *Triatoma infestans* (Abalos, 1972). El insecto vector es de hábitos domiciliarios y peridomiciliarios, habitando fundamentalmente en los pajonales y en los techos de paja de las viviendas precarias. La causa de la alta incidencia y prevalencia de la enfermedad en el hombre está basada, principalmente, en las condiciones de extrema pobreza y miseria en las que vive un alto porcentaje de la población de Latinoamérica. El hombre puede infectarse con *T. cruzi* mediante diversos mecanismos; el más importante es a través de las deyecciones del insecto vector. Al picar éste en zonas descubiertas de la piel del hombre, elimina sus heces con los tripomastigotes metacíclicos, los cuales penetran por el sitio de la picadura o por las mucosas. *T. cruzi* también puede transmitirse transplacentariamente, lo cual determina infecciones congénitas, y por transfusiones de sangre, esto último debido a que la supervivencia del parásito puede llegar hasta los 20 días posteriores a la extracción (Pinto Díaz, 1984). También se han descrito

casos de infección por trasplante de órganos (Pinto Díaz, 1984) y de infecciones accidentales en laboratorios (Hofflin y col., 1987). Existe un alto riesgo de transmisión por transfusión en áreas donde los dadores de sangre tienen altas probabilidades de estar infectados. Todo esto hace que sea importante poseer un método de diagnóstico confiable. Actualmente no se dispone de vacunas efectivas ni de drogas adecuadas para la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Para controlar esta enfermedad, es necesaria la prevención de la infección a través del desarrollo de campañas que incluyen el mejoramiento y la desinsectación de las viviendas, educación de los habitantes de zonas endémicas y un diagnóstico temprano.

### **1.1.3. Etapas aguda y crónica de la enfermedad**

La manifestación de la enfermedad puede producirse a través de una gran variedad de formas clínicas y patologías, cada una de ellas con características muy particulares. Cuando el parásito infecta al huésped, se produce un período de latencia que dura aproximadamente 7 a 10 días. Luego, aparecen los primeros síntomas de la infección, tales como fiebre, irritabilidad, cefalgias y mialgias. Estos síntomas aparecen en la etapa aguda de la enfermedad, la cual se caracteriza por una gran proliferación intracelular del parásito y una parasitemia muy elevada. Debido a esto último, los parásitos pueden ser detectados fácilmente en tejidos y en circulación. Generalmente, las manifestaciones clínicas más severas ocurren principalmente en niños de hasta 2 años de edad. La mortalidad en la enfermedad de Chagas durante la etapa aguda, siempre se encuentra relacionada con grupos de corta edad. En los casos fatales, generalmente se observan severos daños cardíacos y/o meningoencefalitis chagásica, principalmente en el primer mes de la

enfermedad (Pinto Diaz, 1984). La infección también puede producirse sin que se detecten manifestaciones clínicas durante el período agudo. Se estima que solamente se manifiestan síntomas clínicos en un 5% de los individuos afectados. En el 95% restante de los casos, no se puede detectar la enfermedad durante su etapa aguda, y éstos desarrollan, directamente, una forma crónica de la misma.

La evolución de la etapa aguda dura entre 40-60 días, volviendo luego los síntomas a la normalidad. La parasitemia disminuye hasta niveles prácticamente indetectables, entrando en el período crónico. Durante esta etapa, la infección puede permanecer durante años o décadas sin manifestarse clínicamente. Algunos pacientes pueden desarrollar una forma crónica progresiva, caracterizada por la aparición de miocarditis y/o hipertrofia y dilatación del tubo digestivo en la porción proximal o distal, lo cual resulta en megaesófago y/o megacolon respectivamente (Galvao-Castro y col., 1984). En nuestro país la patología crónica más frecuente es la miocarditis chagásica, siendo los pacientes crónicos sintomáticos aproximadamente un 25% de los individuos afectados. En Brasil, de tanta trascendencia como el daño cardíaco es el compromiso de los órganos digestivos, especialmente en los estados de Goiás, Sao Paulo y Minas Gerais, lugares en los que es más frecuente la observación de megaesófago que de megacolon. En Chile son frecuentes las formas crónicas, la cardiopatía y las megaformaciones digestivas; en cambio, las formas agudas son excepcionales, salvo las congénitas. En Bolivia, las formas cardíacas y las megaformaciones digestivas serían las más frecuentes. En Colombia se han descrito casos humanos de cardiopatía y de transmisión congénita. En Ecuador se han comunicado casos agudos, principalmente en la región costera, y también se han descrito casos de miocarditis crónica. En

Panamá y Venezuela, si bien existe compromiso cardíaco, no se han encontrado megaformaciones digestivas (Atías, 1991). Los factores que determinan las diferentes manifestaciones clínicas y su relación con diferentes áreas geográficas, no están bien definidos. Se supone que se debe a la existencia de distintas cepas del parásito en diferentes regiones, interactuando con poblaciones de huéspedes que difieren en muchos aspectos (nutricionales, genéticos, etc.). La interacción huésped-parásito depende de las diferencias en uno u otro componente, y de la asociación que se da entre una determinada población de parásitos y una población particular de huéspedes.

#### **1.1.4 Enfermedad de Chagas congénita**

La enfermedad de Chagas congénita se produce por el pasaje de *T. cruzi* a través de la placenta y posterior infección del feto. La madre puede encontrarse en cualquier etapa de la enfermedad. *T. cruzi* alcanza la circulación fetal por vía hematógena, atravesando las vellosidades placentarias. Se ha estimado que en regiones endémicas la incidencia de esta infección es alrededor del 5% del total de madres chagásicas.

El diagnóstico de los casos sintomáticos es esencialmente clínico. La confirmación de éste, se basa en la demostración de los tripomastigotes en la sangre circulante del recién nacido; para lo cual se observa directamente al microscopio una muestra de sangre fresca. Sin embargo, si el resultado de este examen es negativo, no se puede descartar el diagnóstico, porque puede coincidir con una baja parasitemia y, en estos casos, el xenodiagnóstico es de gran utilidad. Por otro lado, el hallazgo de IgM específica certifica el diagnóstico clínico, pero su ausencia no lo descarta (Atías, 1991a).

En la búsqueda de las infecciones congénitas asintomáticas, el estudio se inicia con la detección serológica de la infección materna en muestras de sangre de embarazadas y sangre de cordón. Todo resultado positivo indica riesgo de transmisión congénita y, en estos casos, debe estudiarse al niño desde su nacimiento. Dicho estudio implica un examen clínico completo, búsqueda del parásito en muestras de sangre, aplicación de xenodiagnóstico y estudios serológicos (IgG e IgM específicas) seriados. Aquellos niños con demostración de parásitos o detección de IgM específica, en fecha del nacimiento, serán sometidos a estudios clínicos especializados, tratamientos y controles clínico-serológicos durante varios años. Los recién nacidos con serología positiva al nacer, sin demostración de presencia del parásito; seguirán en observación con controles serológicos y clínicos durante los primeros meses de vida. Si la serología se vuelve negativa durante dicho período, se descarta la infección congénita (Atías, 1991a). En el caso de que aquella continúe siendo positiva, se confirma ésta y se comienza con el tratamiento adecuado, el cual es similar al que se lleva a cabo durante la etapa aguda de la enfermedad. Al ser este tratamiento efectivo, solamente durante la etapa inicial de la enfermedad, el retardo en el diagnóstico de casos de infección congénita, puede llevar a que el tratamiento resulte ineficaz. Sería, por lo tanto, necesario poder disponer de técnicas que permitan confirmar, en el menor tiempo posible, este tipo de infecciones.

## 1.2 Biología de *Trypanosoma cruzi*

### 1.2.1 Generalidades

Tanto en Africa como en América Latina, los tripanosomas y las leishmanias son los agentes causales de serias enfermedades, tanto en el hombre como en los animales silvestres y domésticos. Pertenecen al orden *Kinetoplastida* (Honigberg, 1963). Las especies de este orden se caracterizan por poseer una región especializada, el kinetoplasto, dentro de su única mitocondria. Dentro de esta región se localiza el ADN mitocondrial (ADN<sub>m</sub>) de estos organismos. Los miembros de este orden son protozoos flagelados, en su mayoría parásitos. Algunos géneros son patógenos de plantas (*Phytomonas*). Otros, como *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* y *Herpetomonas*, son parásitos de insectos, monogénéticos, presentan un ciclo de vida simple y se alojan sólo en un huésped invertebrado. Sin embargo, hay especies de vida libre tales como las pertenecientes a la familia *Bodonidae*. Los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* son flagelados digenéticos y presentan un ciclo de vida complejo en el cual se alternan un huésped invertebrado y uno vertebrado. En este último, dependiendo de la especie considerada, se alojan en el torrente sanguíneo o intracelularmente, en músculo cardíaco, células del sistema nervioso autónomo, sistema digestivo o sistema inmune. Debido a la importancia sanitaria que presentan, la mayoría de las investigaciones realizadas se centraron en los últimos géneros mencionados. Los habitantes de las áreas tropicales y sub-tropicales de todo el mundo, son afectados por estas enfermedades. La tripanosomiasis africana o "enfermedad del sueño", es producida por distintas sub-especies de *Trypanosoma brucei*. En el hombre



*T. brucei rhodesiense* produce una enfermedad aguda y *T. brucei gambiense* una enfermedad crónica. Por otro lado, *T. brucei brucei* produce una enfermedad equivalente (nagana) en animales domésticos y silvestres. Todas las enfermedades mencionadas anteriormente afectan a millones de personas, especialmente en los países en vías de desarrollo. La importancia médica y sanitaria de estos parásitos ha impulsado a varios grupos de investigación a invertir grandes esfuerzos para lograr un conocimiento más amplio en el área de la biología molecular y la bioquímica clásica de estos organismos.

Varias características peculiares de los tripanosomas se han descubierto durante las últimas décadas. Se han encontrado estructuras nuevas como la presencia de una organela denominada glicosoma que posee enzimas glicolíticas, normalmente encontradas en el citoplasma de otras células (Opperdoes y col., 1977), y la presencia de ADN kinetoplástico (ADN<sub>k</sub>) formando una gran malla de moléculas de ADN concatenadas (Borst y col., 1979). También se han descrito mecanismos nunca vistos anteriormente tales como un sistema de transcripción discontinua (De Lang y col., 1984), el mecanismo de variación antigénica en tripanosomas africanos (Cross, 1978; Vickerman, 1978) y la edición de ARN mensajero (Benne y col., 1986).

### **1.2.2 Ubicación sistemática**

Según una revisión realizada por el Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoología (Levine y col., 1980), los tripanosomas son protozoos cuya ubicación taxonómica es la siguiente:

Phylum Sarcomastigophora: un tipo de núcleo; flagelo, pseudopodios o ambos.

Subphylum Mastigophora: uno o más flagelos; reproducción por fisión binaria; en algunos grupos reproducción sexual.

Clase Zoomastigophora: cloroplastos ausentes; uno o más flagelos.

Orden Kinetoplastida: uno a cuatro flagelos que emergen de una depresión; una única mitocondria que se extiende por toda la célula semejando un tubo o una red de tubos; usualmente poseen una organela autorreplicante, el kinetoplasto; aparato de Golgi en la región de la depresión flagelar; hay especies parásitas y otras de vida libre.

Suborden Trypanosomatina: un solo flagelo libre o con membrana ondulante; kinetoplasto pequeño y compacto; parásitos.

Familia Trypanosomatidae: incluye varios géneros monogénéticos: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* y *Herpetomonas* todos parásitos de invertebrados. Otros géneros son digenéticos, como *Leishmania* y *Trypanosoma* que alternan un huésped vertebrado y otro invertebrado. Los miembros del género *Trypanosoma* han sido divididos en dos grandes grupos según el sitio de producción de tripomastigotes metacíclicos en el insecto vector y el método de infección en el huésped vertebrado (Hoare, 1964).

Sección Salivaria: incluye tripanosomas cuyo ciclo de desarrollo en el vector invertebrado se completa en las glándulas salivales del insecto. Se transmite por inoculación mediante la picadura del insecto. Ej: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense*

Sección Estercoraria: comprende tripanosomas que completan su desarrollo en la región posterior del tubo digestivo del vector. Se transmiten por contaminación a través de las heces del insecto (excepto *T. rangeli*) Ej: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma lewisi* La única especie de este grupo patógena para el hombre es *Trypanosoma cruzi*

### 1.2.3 Heterogeneidad de las poblaciones de *Trypanosoma cruzi*

Existen numerosas evidencias que indican que esta especie no es un grupo homogéneo de parásitos, sino que estaría compuesta por un conjunto de poblaciones heterogéneas de organismos con diferentes características biológicas, bioquímicas e inmunológicas.

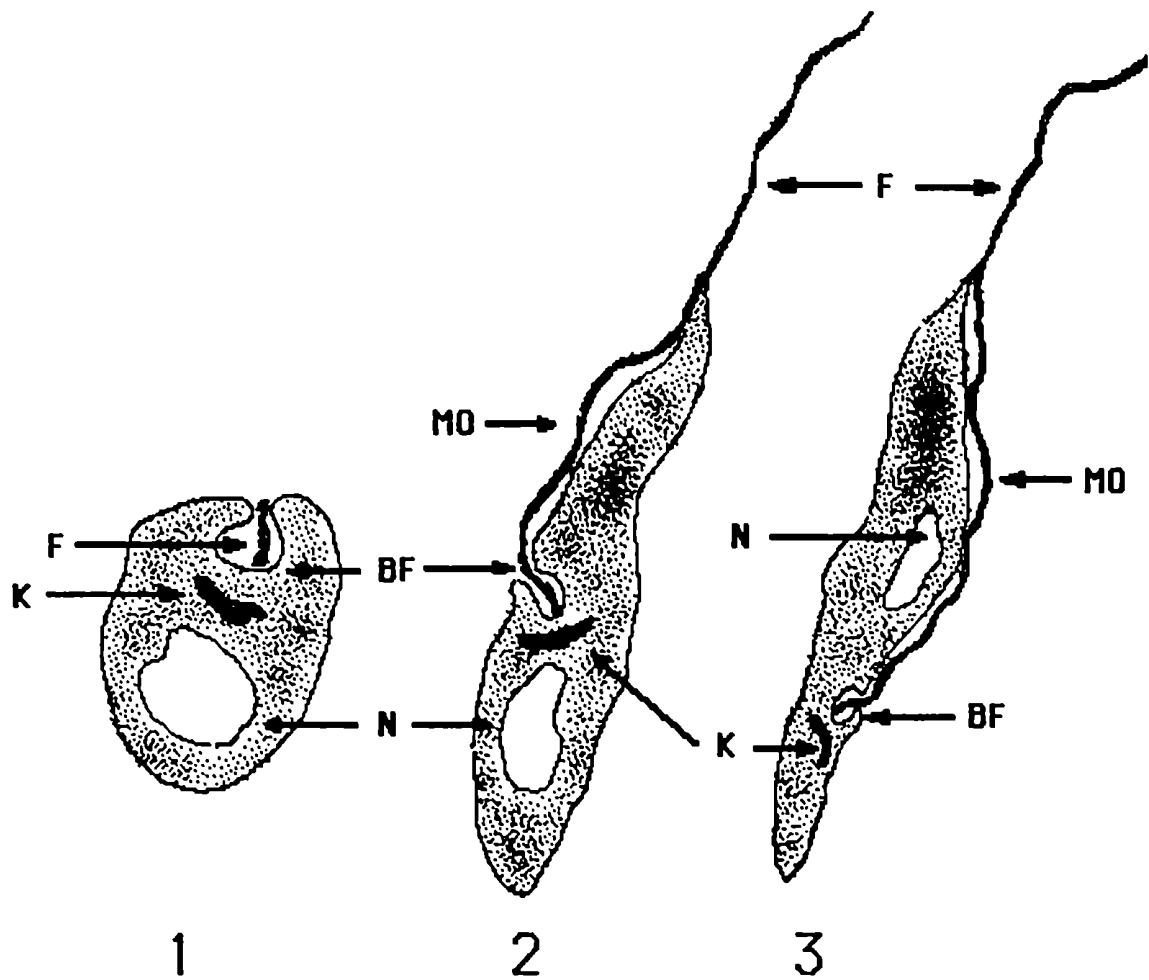
Al poco tiempo de su descubrimiento, se conoció la amplia distribución geográfica de *T. cruzi* (Chagas, 1909). Se tenía conocimiento sobre la reproducción intracelular del parásito, en varios tejidos diferentes de mamíferos, así como el desarrollo completo del ciclo biológico en distintos huéspedes vertebrados y vectores (Miles, 1979). Luego de muchos estudios y muchos trabajos publicados sobre la enfermedad de Chagas, se han obtenido y acumulado gran cantidad de datos sobre las características biológicas y epidemiológicas de *T. cruzi*. A través de esta información se detectó la existencia de distintas variedades de *T. cruzi* en la naturaleza. Comparando formas sanguíneas de distintas cepas se detectaron diferencias en la morfología (Brener, 1965; Brener, 1973), las cuales podrían llegar a denotar diferencias fisiológicas (Brener, 1973). También se detectaron diferencias en la infectividad a distintos tipos de células (Doyle y col., 1984), en las curvas de parasitemia (Brener y col., 1974; Avila y col., 1981), en la patogenicidad en ratones (Postan y col., 1983), en las características de unión a anticuerpos monoclonales (Kirchhoff y col., 1984), en la cinética de crecimiento (Dvorak y col., 1980) y en la sensibilidad a diferentes drogas (Brener y col., 1976; Freeman y col., 1975; Avila y col., 1981). En cuanto a las características bioquímicas, se encontraron diferencias en la composición antigénica (Nussensweig y col., 1963; Ketteridge, 1975; González y col., 1984; Kirchhoff y

col., 1984), en el metabolismo oxidativo y el contenido de diferentes enzimas (Engel y col., 1990), en los patrones de isoenzimas (Miles y col., 1977; Tibayrenc y col., 1988), en los patrones de fragmentos de restricción del ADN kinetoplástico (Morel y col., 1980), en el contenido de ADN por organismo (Dvorak y col., 1982; Kooy y col., 1989) y en el cariotipo y localización cromosómica de distintos genes (Gibson y col., 1986; Engman y col., 1987; Henriksson y col., 1990).

Como consecuencia de estos estudios, distintas variedades de *T. cruzi* han sido descritas, lo cual no debe resultar sorprendente tratándose de un parásito con una extensa distribución geográfica y una gran diversidad de hábitats, huéspedes y vectores. Por ello, el estudio de las variaciones intraespecíficas, tiene importancia para el desarrollo de métodos de diagnóstico y de tratamientos quimioterapéuticos e inmunológicos contra la enfermedad. Probablemente no todas las variedades del parásito sean susceptibles a una determinada droga o anticuerpo (Brenner, 1985).

#### **1.2.4 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***

*T. cruzi* es un parásito digenético. Durante su ciclo de vida se aloja en dos huéspedes diferentes: un insecto hematófago (intermediario) y un vertebrado (definitivo). El primero está representado por numerosas especies pertenecientes, en su mayoría, a los géneros *Triatoma*, *Pastrongylus* y *Rhodnius* (Chagas, 1909a). Existen especies domiciliarias (*T. infestans*, *R. prolixus*, *P. megistus*), peridomiciliarias (*T. sordida*, *T. brasiliensis*) y selváticas (*P. geniculatus*, *T. rubrovaria*). El vector se infecta por ingestión de tripomastigotes presentes en la sangre periférica de un vertebrado infectado. Las formas sanguíneas llamadas tripomastigotes (Figura 1), son ingeridas por



**Figura 1.**

Formas celulares de *Trypanosoma cruzi* 1. Amastigote. 2. Epimastigote. 3. Tripomastigote. Bolsillo flagelar (BF), Flagelo (F), Kinetoplasto (K), Membrana ondulante (MO) y Núcleo (N).

el insecto, pasan a lo largo del tubo digestivo de éste, donde sufren una serie de transformaciones morfológicas irreversibles y se diferencian a epimastigotes (Figura 1). En el intestino, estos últimos se encuentran en activa división y mantienen un estado permanente de infección en el insecto. Los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en la ampolla rectal del vector. Estos últimos, muy similares a los tripomastigotes sanguíneos, son los que poseen la capacidad infectiva para el huésped mamífero. El vector infectado se alimenta sobre un huésped vertebrado, elimina sus heces durante o después de la ingesta de sangre y, a través de las heces, se transmiten los tripomastigotes metacíclicos (Brener, 1973).

En 1968 se comunicó la existencia de una forma redondeada provista de un flagelo a la que se llamó esferomastigote (Brack, 1968). Según este autor, la diferenciación de tripomastigotes sanguíneos en esferomastigotes ocurriría en el estómago del vector. Los tripomastigotes metacíclicos eliminados con las heces del insecto penetran en el huésped vertebrado a través de microescoriaciones de la piel o de mucosas como la conjuntiva. Invaden luego las células por un proceso de endocitosis, iniciando así la etapa intracelular de su ciclo biológico. *T. cruzi* puede penetrar un amplio rango de células del huésped, siendo las más comunmente infectadas las fibras musculares y las células de la glía (Brener, 1973).

Luego de la penetración celular, los tripomastigotes se diferencian a formas redondeadas, carentes de flagelo, llamadas amastigotes, que se multiplican por fisión binaria cada 12 horas aproximadamente (Figura 1). Luego de un dado número de divisiones, se produce la diferenciación hacia la forma tripomastigote. Estos son liberados a la circulación por ruptura de la célula y de esta manera pueden invadir nuevas células reiniciando el ciclo

amastigote-tripomastigote, perpetuándose la infección en el huésped vertebrado (Brenner, 1973). Se han detectado infecciones en varios mamíferos de diferentes ordenes, tanto en seres humanos como en monos, ratones, ratas, conejos, hamsters y perros. Por otro lado, tanto anfibios como aves son refractarios a las infecciones con este parásito.

### **1.3 Respuesta inmune en la enfermedad de Chagas**

Los parásitos inducen en el huésped mamífero una compleja respuesta inmune. Infecciones experimentales con *Leishmania* (Campos-Neto y col., 1982), *Plasmodium* (Falanga y col., 1987) y *Trypanosoma cruzi* (D'Imperio Lima y col., 1985), llevaron a la conclusión de que los protozoos parásitos originaban una activación policlonal de células B de tipo antígeno-inespecífico (Minoprio y col., 1988). En la enfermedad de Chagas, sólo 1 de 51 hibridomas de células B, obtenidas de ratones con infección aguda, secretaba anticuerpos que reaccionaban con el parásito (Minoprio y col., 1988). Esta activación policlonal de células B ocurriría en etapas tardías de la infección (D'Imperio Lima y col., 1986). Por otro lado, hay varias evidencias que muestran la existencia de anticuerpos específicos contra el parásito, tanto en infecciones naturales como experimentales (Araujo y col., 1984; Israelsky y col., 1988; Tarleton y col., 1983).

#### **1.3.1 Citotoxicidad mediada por células**

En ausencia de complemento, los tripomastigotes pueden ser lisados *in vitro* por eosinófilos y neutrófilos, pero requieren la presencia de anticuerpos específicos constituyendo lo que se ha dado en llamar citotoxicidad mediada

por células dependiente de anticuerpos (CCDA) (Okabe y col., 1980; Kipnis y col., 1981).

Existen controversias sobre el papel del interferón y de las células "natural killer" (NK). Algunas evidencias indican que los niveles de interferón sérico y la actividad de células NK, regulada por los niveles de interferón, se incrementan muy rápidamente luego de la infección con *T. cruzi* (Hatcher y col., 1982). Tanto epimastigotes como tripomastigotes pueden ser destruidos por células NK, generadas en el ratón durante la infección experimental (Hatcher y col., 1982). Sin embargo, otros autores encontraron que el bloqueo de la actividad NK con anticuerpos anti-interferón no produjo diferencias en la resistencia a la infección (Storino y col., 1985)

La importancia de las células T en la resistencia a la infección ha sido puesta de manifiesto por numerosos autores. Un incremento de la susceptibilidad a la infección ha sido demostrada en animales congénitamente atímicos (Segura y col., 1981) o deficientes en células T por tratamiento con anticuerpos anti-linfocitos T o por timectomía (Schmunis y col., 1971; Kierszenbaum y col., 1979). Otros autores lograron transferir pasivamente inmunidad por inoculación de células de bazo o células T inmunes (Trischman y col., 1978; Scott y col., 1981; Wrightsman y col., 1982).

### **1.3.2 Producción de anticuerpos**

El ingreso de *T. cruzi* en el hombre desencadena la producción de anticuerpos de la clase IgM e IgG (Vattuone y col., 1973; Hanson, 1977). El papel de los anticuerpos en la resistencia a la infección ha sido puesto de manifiesto por varios autores (Scott, 1981; Kierszenbaum, 1980) quienes, en ensayos de transferencia pasiva de sueros conteniendo anticuerpos específicos,



lograron cierta protección al desafío con formas infectantes del parásito. Se obtuvieron otras evidencias sobre el papel desempeñado por los anticuerpos, en la inmunidad contra *T. cruzi* cuando ratones seleccionados por tener baja capacidad formadora de anticuerpos, mostraron ser más susceptibles a la infección que los ratones que poseen esta capacidad altamente desarrollada (Kierszenbaum y col., 1976). Resultados similares se obtuvieron en ratas cuyas células B habían sido extraídas mediante un tratamiento previo con suero anti cadena  $\mu$  (Rodríguez y col., 1981; Krettli y col., 1982).

Se han detectado anticuerpos con capacidad para lisar *in vitro* formas sanguíneas de *T. cruzi* (Budzko y col., 1973; Powell y col., 1980). Algunos investigadores han reportado la existencia, en la enfermedad de Chagas, de dos tipos de anticuerpos con diferentes actividades (Krettli y col., 1982). Según estos autores, el suero de ratones inmunizados con distintos antígenos de *T. cruzi* (formas de cultivo sometidas a ruptura a través de varios ciclos de congelamiento y descongelamiento, formas fijadas con glutaraldehído, etc.) presentan solamente anticuerpos detectables por técnicas serológicas convencionales, como por ejemplo, inmunofluorescencia. Estos anticuerpos detectan epimastigotes o tripomastigotes fijados, no detectan formas sanguíneas vivas y son muy poco protectores contra infecciones de *T. cruzi*. Por el contrario, ratones en la etapa crónica de la infección, presentan, además, anticuerpos contra formas sanguíneas vivas del parásito que pueden ser detectadas por ensayos de lisis mediada por complemento y de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, además de las técnicas convencionales (Krettli y col., 1982; Krettli, 1984). Estos anticuerpos no se detectan en sueros de ratones inmunizados con parásitos muertos o fracciones antigénicas, por lo que se asume que estarían dirigidas contra componentes de la superficie del

parásito o contra antígenos liberados por el tripanosoma (Krettli, 1984). La razón por la que sólo los anticuerpos líticos son capaces de detectar tripomastigotes vivos no está clara aún, pero podría estar relacionada con sus diferentes afinidades por las células blanco. En relación con la actividad lítica, se ha encontrado que los fragmentos  $F(ab)_2$  de la IgG, son tan efectivos como la molécula intacta para transformar a los tripomastigotes de sangre en activadores de la vía alternativa del sistema complemento (Kipnis y col., 1985). Este fenómeno sugiere que la IgG específica se une a componentes de membrana del parásito que normalmente inhiben la activación del complemento; induciendo de esta forma, la lisis por la vía alternativa. El estudio de fracciones del suero por cromatografía de afinidad, mostró que la actividad lítica estaba correlacionada con picos de  $IgG_2$ , mientras que los tests de inmunofluorescencia con parásitos fijados fueron positivos con todas las fracciones (Sánchez y col., 1982). Los anticuerpos capaces de transferir pasivamente resistencia a ratones y de lisar formas sanguíneas de *T. cruzi* fueron identificados como inmunoglobulinas  $IgG_{2a}$  e  $IgG_{2b}$  (Takehara y col., 1981).

Los mecanismos por los cuales los anticuerpos confieren protección no están claros, pero podrían incluir, además del efecto lítico mediado por complemento y la neutralización de la infectividad de tripomastigotes, el aumento de la fagocitosis por macrófagos y la participación en la CCDA.

Por otro lado, ha quedado demostrada la importancia diagnóstica de la presencia de anticuerpos específicos, y se han desarrollado numerosas técnicas de laboratorio para poder detectarlos. Entre ellas estarían: fijación de complemento (FC), inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemoaglutinación pasiva (HA) y reacciones enzimáticas (Camargo y col., 1979).

#### **1.4 Respuesta humoral fetal e infecciones congénitas**

La inmunidad pasiva es la adquisición de anticuerpos específicos o linfocitos sensibilizados, provenientes de otros individuos, sin que exista exposición previa al antígeno. Este tipo de inmunidad es, usualmente, transiente pero puede otorgar una protección importante, sobre todo durante el primer año de vida (Madani y col., 1989). Durante el desarrollo, a partir de la décima semana de gestación, aparecen células B maduras que presentan en su superficie inmunoglobulinas de tipo IgM, IgG, IgA e IgD. A partir de la decimoquinta semana de gestación, existe una variedad completa de células B maduras, incluyendo la presencia de múltiples clases de la inmunoglobulina IgG con la misma especificidad (Miller y col., 1983). Las células B maduras, en colaboración con las células T, pueden diferenciarse a células de memoria, células circulantes sensibles al antígeno, etc. La inmunoglobulina IgM es la que primero comienza a sintetizarse, a partir de la decimoprimer semana de gestación y permanece con niveles bajos durante todo el periodo fetal. Los fetos normales poseen la síntesis de IgM lo suficientemente bien establecida como para que, prácticamente todos los fetos, tengan niveles detectables de IgM en su suero a partir de la trigésima semana de gestación (Stiehn, 1975). Previamente, se habían obtenido evidencias de que células fetales serían capaces de sintetizar *in vitro* IgM e IgG a partir de la mitad del periodo de gestación (Lawton y col, 1972). La síntesis de IgA comienza a partir de la trigésima semana y se produce en forma tan limitada que la IgA sérica no es detectada hasta varios días después del nacimiento. La IgA secretoria, compuesta por dos moléculas de IgA sérica y un componente secretor, no se

detecta en el feto. Sin embargo, el componente secretor libre podría ser sintetizado por el feto, ya que se ha detectado su presencia en la orina de niños prematuros (Remington y col., 1968).

Las inmunoglobulinas de tipo IgM, IgE e IgA no atraviesan la placenta (Whitelaw y col., 1988; Madani y col., 1989), por lo tanto su presencia en la sangre de cordón umbilical es consecuencia de su producción por parte del feto. La detección de estas clases de anticuerpos sugiere la presencia de una infección activa y ha sido de gran utilidad para el diagnóstico de infecciones congénitas. Como ejemplos están: la detección de IgE para el diagnóstico de filariasis (Weil y col., 1983), detección de IgM en el diagnóstico de sífilis (Alford, 1971; Dobson y col., 1988) y detección de IgM e IgA para el diagnóstico de toxoplasmosis (Cederqvist y col., 1977; Remington y col., 1985; Decoster y col., 1988). La situación con los anticuerpos de tipo IgG es diferente. Esta inmunoglobulina es transferida a través de la placenta a partir de la octava semana de gestación. Los mecanismos principales, a través de los cuales se lleva a cabo la transferencia de IgG de la madre al feto, son dos (Gitlin y col., 1964; Gitlin, 1971). El primero es una transferencia pasiva, en la cual, la IgG fetal es proporcional al nivel materno de IgG; este mecanismo sufre una maduración con el incremento de la edad gestacional para permitir que cantidades mayores de IgG atraviesen la placenta durante la gestación. El segundo es un mecanismo enzimático activo, que transfiere activamente IgG de la madre al feto; presumiblemente a través de receptores Fc (Kohler y col., 1966). Este mecanismo, inhibido por altos niveles maternos de IgG y activado por bajos niveles maternos de IgG, sirve para llevar los niveles de IgG fetales a niveles normales. Los niños que nacen de madres con niveles altos o bajos de IgG, tienden a tener niveles de IgG casi normales (Stiehn, 1975). Las subclases

de IgG en el cordón umbilical son similares a aquellas presentes en la madre: 70% IgG1, 20% IgG2, 3% IgG3, 3% IgG4 (Miller y col., 1983). Luego del nacimiento, los niveles de IgG decrecen, con una vida media de 25 días. De acuerdo a esto, el fenotipo IgG Gm del recién nacido es siempre similar al de su madre (Madani y col., 1989; Mellbye y col., 1973). Sin embargo, estudios previos mostraron que células provenientes de bazo fetal, cultivadas *in vitro* eran capaces de sintetizar IgG a partir de la mitad de la etapa gestacional (van Furth y col., 1965; Lawton y col., 1972). Más aún, en suero de cordón umbilical se encontraron cantidades muy pequeñas de IgG que portaban marcadores alotípicos de IgG (Gm) que no estaban presentes en el suero materno correspondiente (Mellbye y col., 1973; Martensson y col., 1965). Esta pequeña fracción de moléculas de IgG podría representar el Gm del niño y probablemente sería sintetizada por el feto *in utero* (Adinolfi y col., 1971; Stiehn, 1975). La contribución de la fracción producida por el feto a los niveles séricos de IgG sería muy pequeña, por lo tanto la mayoría de la IgG detectada en el cordón umbilical sería de origen materno (Whitelaw y col., 1988; Madani y col., 1989; Cederqvist, 1983; Black y col., 1988). Debido a todo lo mencionado anteriormente, no sería fácil la detección de IgG fetal específica en sangre de cordón umbilical de recién nacidos, que estén congenitamente infectados. Se ha tratado de detectar en sangre de cordón umbilical, IgG específica contra patógenos, que no estén presentes en los sueros maternos. Esto se ha realizado en infecciones congénitas de toxoplasmosis, utilizando inmunoelectroforesis (Griscell y col., 1973) y experimentos de "Western Blot" con proteínas totales del parásito (Remington y col., 1985). También se llevó a cabo en casos congénitos de sífilis, realizando experimentos de "Western Blot" (Dobson y col., 1988). Sin embargo, usando estos métodos es muy difícil confirmar la

presencia de reacciones antígeno-anticuerpo específicas en recién nacidos infectados (Remington y col., 1985).

Por todo lo mencionado anteriormente, podría resultar de gran utilidad el uso de antígenos recombinantes de *T. cruzi* para analizar las inmunoglobulinas específicas, presentes en los sueros correspondientes a niños nacidos de madres con enfermedad de Chagas.

### **1.5 Autoinmunidad**

La respuesta inmune desencadenada por *T. cruzi* que incluye una gran variedad de componentes humorales y celulares, debería ser suficiente para detener y eliminar al parásito y restituir el estado de salud del huésped. Sin embargo, luego de un período de latencia, la enfermedad se convierte en crónica afectando fundamentalmente al corazón y al tracto intestinal. Un mecanismo obvio de daño tisular sería el de ruptura celular por parte de los amastigotes y como en la infección chagásica aguda se han demostrado nidos de amastigotes en el corazón, se estableció una relación entre la presencia de parásitos y las lesiones inflamatorias locales (Andrade y col., 1979; Andrade, 1983). Sin embargo, en la miocarditis chagásica crónica no se ha logrado demostrar la presencia de parásitos (Andrade y col., 1979; Andrade, 1983), así como tampoco se han encontrado en el tracto gastrointestinal de pacientes con formas digestivas de la enfermedad. Frente a estos hechos, se ha intentado establecer la causa por la cual un individuo infectado, si supera la etapa aguda, se convierte en chagásico crónico y porqué aparecen lesiones tisulares, prácticamente en ausencia de parásitos, ya que éstos son detectables en

algunos casos y sólo si se emplean técnicas de cultivo (xenodiagnóstico o hemocultivo).

### 1.5.1 Autoinmunidad mediada por anticuerpos

Existen numerosos reportes de presencia de autoanticuerpos en pacientes chagásicos y animales infectados experimentalmente. Se reportó que autoanticuerpos contra tejido endotelial-vascular-intersticial (autoanticuerpos-EVI), reconocían tanto tejido cardíaco humano, murino, bovino, como epimastigotes de *T. cruzi* (Schmunis, 1987). Por otro lado, se encontraron anticuerpos cross-reactivos, similares en el 90% de los pacientes con patología chagásica crónica (Petry y col., 1989). El posible rol de estos anticuerpos fue objeto de numerosos debates (Kierszenbaum y col., 1985; Khouri y col., 1983). Sin embargo, los autoanticuerpos-EVI también se detectaron en otras enfermedades infecciosas (malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis africana, etc.), por lo tanto no serían específicos para la enfermedad de Chagas y tampoco serían la causa primaria de la patología (Petry y col., 1989).

También se han reportado anticuerpos que dan reacción cruzada con nervios periféricos, células de Schwann y *T. cruzi* (Khouri y col., 1979). Este tipo de anticuerpos se ha encontrado en pacientes con enfermedades musculares degenerativas, lo cual sugiere que su presencia sería el resultado de la destrucción tisular (Acosta y col., 1985). Se ha descrito un anticuerpo monoclonal, CE5, que reconoce no solo neuronas de mamíferos y músculo cardíaco, sino también a *T. cruzi* (Wood y col., 1982). En infecciones experimentales de ratones con *T. cruzi* se han detectado autoanticuerpos que detectan tanto al parásito como al tejido cardíaco murino (McCormick y col., 1989). También se han obtenido evidencias de que los niveles de

autoanticuerpos en ratones, infectados experimentalmente con *T. cruzi* son más elevados que los observados en ratones no infectados (Ternynck y col., 1990).

### 1.5.2 Autoinmunidad mediada por células

La naturaleza de los eventos que conectan la respuesta inmune del huésped contra *T. cruzi* y el subsiguiente daño inflamatorio al tejido cardíaco, es desconocida. Una hipótesis propone que linfocitos autoinmunes, que reaccionen con tejido cardíaco, podrían surgir durante el curso de una respuesta inmune hacia antígenos que den reacción cruzada con *T. cruzi* como ocurre en enfermedades autoinmunes órgano-específicas (Hudson, 1985; Wood y col., 1982). Se ha reportado que células cardíacas podrían ser dañadas *in vivo* por la generación de células T autorreactivas, debido a la modificación de las células huésped por parte del parásito (Ribeiro Dos Santos y col., 1980). Respecto a esto, no ha sido posible detectar una respuesta proliferativa de células T específicas contra antígenos cardíacos (Todd y col., 1983), o la proliferación de una posible célula T, que autorreaccionen contra el tejido cardíaco (Gattass y col., 1988). Sin embargo, cuando se comparó la transformación blástica de linfocitos de pacientes con o sin miocarditis chagásica, empleando antígenos de corazón de rata, no fue posible encontrar diferencias significativas (Mosca y col., 1981; Mosca y col., 1983).

Tampoco se han encontrado evidencias de que células T o macrófagos, se unieran específicamente al tejido cardíaco infectado con *T. cruzi* para iniciar un proceso autorreactivo (Mortatti y col., 1990)



## 1.6 Antígenos de *T. cruzi*

### 1.6.1 Composición antigénica de *T. cruzi*

Durante el ciclo de vida de *T. cruzi*, cada estadio tiene diferente medio ambiente, morfología y estilo de vida; es probable que estas diferencias se reflejen en variaciones funcionales y antigénicas en su superficie. En todos los estadios del parásito ha sido probada la presencia de carbohidratos en la superficie de *T. cruzi* (Alves y col., 1974; Pereira y col., 1980). Se han descrito y caracterizado numerosos receptores para lectinas (proteínas de origen vegetal que presentan afinidad por azúcares) (Pereira y col., 1980; Katzin y col., 1983). La mayoría de las proteínas de superficie detectadas en *T. cruzi* serían presumiblemente glicoproteínas, debido a su probada afinidad por diferentes lectinas (Andrews y col., 1984). A través de varios trabajos se ha demostrado que son varias las glicoproteínas importantes en la membrana de *T. cruzi* (Snary y col., 1979; Snary, 1980; Andrews y col., 1984; González y col., 1984; Kirchhoff, 1987) y que la organización antigénica difiere considerablemente en las distintas formas del parásito (Araujo y col., 1981; Lanar y col., 1983; Dragon y col., 1985), encontrándose algunos componentes comunes y otros específicos de estadio (Nogueira y col., 1981; Contreras y col., 1985; Kirchhoff y col., 1987).

Se han descrito glicoproteínas asociadas a la penetración celular (Zingales y col., 1985), a la evasión de la respuesta inmune (Rimoldi y col., 1988), y otras con función de receptor de moléculas del huésped (Ouaissi y col., 1986a). También han sido descritas moléculas que, reconocidas por el sistema

inmune, permiten la destrucción del parásito (Zweerink y col., 1984; Yoshida, 1986; Norris y col., 1989).

#### **1.6.1.1 Antígenos involucrados en protección**

Se han realizado una gran cantidad de estudios para tratar de identificar antígenos asociados a la protección contra la infección con *T. cruzi* correlacionando la resistencia al parásito con la presencia de anticuerpos que reconozcan anticuerpos específicos. En animales experimentales se pueden inducir distintos grados de protección parcial contra la infección con *T. cruzi*. Son varios los protocolos de inmunización utilizados; entre ellos se puede mencionar el uso de parásitos vivos atenuados (Basombrio y col., 1982), parásitos inactivados (Mc Hardy y col., 1978), fracciones subcelulares del parásito (Ruiz y col., 1990) y fracciones de glicoproteínas (Scott y col., 1979).

En sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas en la etapa crónica, se ha observado que, aunque éstos reconocían muchos antígenos de *T. cruzi* había una correlación entre anticuerpos contra una proteína de 160 kDa y la capacidad del suero para producir lisis de los parásitos mediada por el sistema complemento. Estudios realizados sugerirían que esa proteína sería un "blanco" para los anticuerpos líticos y por lo tanto, desempeñaría un papel importante en la protección del huésped (Martins y col., 1985). Recientemente se ha purificado esa proteína de 160 kDa y se ha observado que anticuerpos contra esta proteína, se unen a parásitos vivos y que sólo se expresa en el estadio infectivo del parásito, no encontrándose ni en epimastigotes ni en tripomastigotes (Norris y col., 1989).

### 1.6.1.2 Antígenos involucrados en diferenciación

A lo largo de su vida, *Trypanosoma cruzi* sufre un gran número de diferenciaciones. Como se describió anteriormente, en el intestino del vector proliferan los epimastigotes; mientras que en el recto éstos se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. De distintas regiones del tracto intestinal se han podido aislar varias lectinas capaces de unir al parásito (Pereira y col., 1980). Se ha propuesto que la morfogénesis de *T. cruzi* en el intestino del insecto, estaría regulada por la interacción de estas lectinas y las glicoproteínas de superficie del parásito.

Se reportó la inhibición de la diferenciación *in vitro* de epimastigotes en tripomastigotes metacíclicos usando un anticuerpo monoclonal contra la porción de carbohidratos de una glicoproteína de superficie de 72 kDa (gp72) (Sher y col., 1982). También se estudió la transformación *in vitro* de epimastigotes en tripomastigotes metacíclicos, en condiciones químicamente definidas. Se reportó que, bajo estas condiciones, los epimastigotes en diferenciación se adhieren a la superficie del envase de cultivo antes de la transformación a tripomastigotes metacíclicos (Bonaldo y col., 1988). Aparentemente, la adhesión de los epimastigotes sería un requisito necesario pero no suficiente para la diferenciación a la forma infectante (Bonaldo y col., 1988).

### **1.6.1.3 Antígenos involucrados en la evasión de la respuesta inmune**

A lo largo del proceso evolutivo, los parásitos protozoarios han desarrollado una gran variedad de mecanismos para poder evadir la respuesta inmunológica del huésped. En aquellos no sensibilizados, los mecanismos de inmunidad natural que operan son, el efecto citolítico de la vía alternativa del sistema complemento y el reconocimiento, anticuerpo-dependiente, por parte de las células fagocíticas. Es interesante notar que los estadios que están presentes en el huésped vertebrado, generalmente son resistentes a la destrucción directa por suero y también evaden la ingestión y destrucción por medio de las células fagocíticas. Sin embargo, las formas no infectantes presentes en el insecto vector, generalmente son susceptibles a la lisis directa por suero y a la fagocitosis y destrucción por monocitos y macrófagos. Se ha probado que sueros de individuos no infectados provocan la lisis de epimastigotes de *T. cruzi* a través de la vía alternativa del sistema complemento, mientras que los tripomastigotes son resistentes a la lisis en ausencia de anticuerpos específicos (Nogueira y col., 1975). Probablemente, se producirían modificaciones en la superficie del parásito durante el proceso de diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes que lo harían resistente a la lisis por suero de personas no infectadas.

Se han realizado estudios donde se muestra que tratando tripomastigotes con tripsina y otras proteasas, éstos se convierten en activadores de la vía alternativa del sistema complemento y, por lo tanto, sensibles a la lisis en ausencia de anticuerpos específicos (Kipnis y col., 1981). En este caso también se observa un aumento de la fagocitosis por parte de macrófagos, lo cual

sugeriría que habría componentes responsables del efecto antifagocítico (Kipnis y col., 1981; Nogueira y col., 1981).

Se ha demostrado que la lisis de tripomastigotes por medio del sistema complemento, ocurre también a través de la vía alternativa (Budzko y col., 1975). También se observó que los fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de la IgG, son capaces de desencadenar la lisis por la vía alternativa, lo que descartaría la participación de dominios Fc en la activación del proceso (Kipnis y col., 1985). Se reportó que la glicoproteína de 72 kDa mayoritaria en las formas del insecto, gp72, sería el sitio aceptor para el componente C3 del sistema complemento en epimastigotes (Joiner y col., 1985).

También se reportó la purificación de un componente de 58/68 kDa, liberado específicamente por tripomastigotes, que aparentemente contribuye a la evasión de la lisis por la vía alternativa del sistema complemento (Fischer y col., 1988).

#### **1.6.1.4 Antígenos involucrados en la interacción y penetración de la célula huésped**

La infección con *Trypanosoma cruzi* es iniciada por los tripomastigotes metacíclicos que provienen del insecto vector. Esta forma del parásito es capaz de invadir células del huésped y resistir el ataque de los lisosomas. No están claros aún los factores involucrados en la interacción célula-huésped-*T. cruzi* que llevan a la infección. Se supone que proteínas y glicoconjugados presentes en la superficie de los tripomastigotes tendrían un rol importante en el proceso de reconocimiento e invasión de las células del huésped por parte del parásito.

Se ha sugerido que una glicoproteína de 84 kDa podría servir como un ligando que mediaría el reconocimiento célula-huésped-parásito *in vitro*

(Zingales y col., 1985a; Alves y col., 1986). Se ha observado que tripomastigotes obtenidos de células en cultivo contiene una proteína de 83 kDa que se uniría a la superficie de fibroblastos *in vitro* (Boschetti y col., 1987). Otra molécula que podría estar asociada a la capacidad infectiva de *T. cruzi* es un polipéptido de 90 kDa específico del estado metacíclico identificado por el anticuerpo monoclonal 1G7 (Texeira y col., 1986). Este anticuerpo es capaz de reducir la infectividad en ratones (Araguth y col., 1988) y de inhibir la adhesión y penetración de tripomastigotes metacíclicos en células Vero (Yoshida y col., 1990). Se ha reportado una glicoproteína de superficie de la forma metacíclica de aproximadamente 35-50 kDa, identificada por el anticuerpo monoclonal 10D8, el cual neutraliza parcialmente la infectividad del parásito en células Vero (Yoshida y col., 1989).

También fue sugerida la participación de neuraminidasas del parásito en la adhesión y penetración en células del huésped. Esta actividad resultó ser 7-15 veces mayor en tripomastigotes que en los demás estadios (Pereira, 1983). Se ha propuesto que esta enzima estaría involucrada en un control negativo sobre el crecimiento del parásito, a través de la remoción de ácido siálico de las moléculas de los parásitos o de las células huéspedes, las cuales serían necesarias para la internalización (Prioli y col., 1991). Recientemente se ha descrito una actividad trans-sialidasa sobre la superficie del parásito (Schenkman y col., 1991). Esta enzima transfiere ácido siálico de macromoléculas del huésped a un epítipo de tripomastigotes denominado Ssp-3 (Andrews y col., 1987). Se ha observado que los anticuerpos que reconocen a los residuos de ácido siálico del Ssp-3, inhiben la unión de tripomastigotes a células huéspedes (Schenkman y col., 1991). Por otro lado, trabajos previos han demostrado que *T. cruzi* no puede sintetizar ácido siálico

y que, por lo tanto, lo toma del medio (Previato y col., 1985; Zingales y col., 1987). Todos estos resultados, sugerirían que el ácido siálico es relevante para la internalización del parásito.

Se estudió la interacción de la fibronectina plasmática con *T. cruzi* (Ouaissi y col., 1984; Ouaissi y col., 1985). La fibronectina es una glicoproteína multifuncional de alto peso molecular presente en sangre, tejido conectivo y en la superficie celular. Está compuesta por dominios altamente estructurados que contienen sitios de unión para las macromoléculas que interaccionan con ella. Estos autores demostraron que la fibronectina se une específicamente a tripomastigotes y que estaría involucrada en la adhesión del parásito a la superficie de la célula huésped. En otra serie de trabajos, los mismos autores localizaron una proteína de superficie específica de tripomastigotes de 85 kDa con características de receptor de fibronectina (Ouaissi y col., 1986a). Además, la proteína purificada inhibió la infección de fibroblastos con tripomastigotes lo que sugiere que ésta se uniría a la fibronectina de la superficie celular impidiendo la adhesión del parásito. El sitio de unión parecería coincidir con el dominio definido por la secuencia Arg-Gly-Asp-Ser, caracterizado previamente como la región de la fibronectina que interacciona con células de mamífero (Ouaissi y col., 1986b). Los autores concluyen que los dímeros de fibronectina actuarían como puente entre las superficies de las células del huésped y del parásito, a través de la secuencia hidrofílica de cuatro aminoácidos (Ouaissi, 1988). Recientemente se ha demostrado que una neuraminidasa de *T. cruzi* tendría secuencias similares a las de los módulos de tipo III de la fibronectina (Pereira y col., 1991)

### 1.6.2 Clonado de genes que codifican antígenos de *T. cruzi*

Durante los últimos años, se han clonado varios genes que codifican para antígenos de *T. cruzi*. Esto se ha llevado a cabo a través de búsquedas inmunológicas en genotecas de expresión de DNA, utilizando sueros obtenidos de animales o personas infectadas (Dragon y col., 1987; Ibañez y col., 1987; Frasch y col., 1991). El uso de técnicas de ADN recombinante permite disponer de antígenos de *T. cruzi* en forma individual y, además, tener la posibilidad de obtenerlos en grandes cantidades. De esta manera, se podrían realizar estudios para comprender mejor las alteraciones que se producen en la respuesta inmune del huésped, incluyendo posibles procesos de autoinmunidad, los cuales podrían estar involucrados en la patogénesis de la etapa crónica de la enfermedad (Petry y col., 1989). También se podría tratar de mejorar los métodos serológicos usados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y, eventualmente, buscar antígenos que puedan ser utilizados para la inmunoprofilaxis.

Sólo algunos de los antígenos recombinantes analizados hasta el momento han sido completamente secuenciados (Dragon y col., 1987; Requena y col., 1988; Engman y col., 1991; Schijman y col., 1990; Åslund y col., 1991; Pereira y col., 1991; Cooper y col., 1991; Takle y col., 1991). Analizando las secuencias se observó que la mayoría de ellos posee una estructura común, en la cual parte de su secuencia está formada por unidades repetidas de aminoácidos, las cuales serían inmunodominantes en infecciones naturales. Este tipo de estructura también ha sido observada en proteínas antigénicas en *Trypanosoma brucei* (Schneider y co., 1988; Roditi y col., 1987). Comparando los mismos genes entre diferentes cepas de *T. cruzi* se ha visto que las



unidades repetidas son casi idénticas, aún cuando fueran identificadas a partir de diferentes aislamientos de parásitos (Ibañez y col., 1988, Lafaille y col., 1989; Levin y col., 1989; Hoft y col., 1989). No se han observado homologías entre las unidades repetidas de *T. cruzi* y las de otros parásitos. Sin embargo, la región repetida de 38 aminoácidos del antígeno 36 (Ibañez y col., 1988)/JL9 (Levin y col., 1989), es idéntica en tamaño y similar en secuencia a una proteína asociada a microtúbulos, descrita en *Trypanosoma brucei* (Schneider y col., 1988). La presencia de unidades repetidas parecería ser un fenómeno general entre los parásitos protozoos, los cuales tienen que estar evadiendo continuamente la respuesta inmune del huésped. La presencia de epitopes de unidades repetidas de aminoácidos podría tener posibles implicaciones en la evasión de la respuesta inmune (Kemp y col., 1987).

Algunos de los antígenos de *T. cruzi* identificados son internos (Lafaille y col., 1989, Schijman y col., 1990; Bontempi y col., 1989). En el caso de la cisteín proteínasa de *T. cruzi* (Cazzulo y col., 1990) además de localizarse en lisosomas (Bontempi y col., 1989), se han encontrado evidencias que sugieren que podría localizarse también en la superficie celular (Souto-Padrón y col., 1990). Otros antígenos han sido localizados en el flagelo (Lafaille y col., 1989; Levin y col., 1989) Estos últimos podrían ser utilizados para estudios de serología y de inmunoprotección, ya que se ha observado protección en ratones, inyectados con dosis fatales de parásitos, cuando se utiliza la fracción flagelar (Ruiz y col., 1985)

Con respecto a la función que cumplen estos antígenos de *T. cruzi* sólo se conoce para muy pocos de ellos. Se sabe que las proteínas de "heat-shock" son antigénicas en las infecciones naturales (Dragon y col., 1987, Requena y col., 1988, Engman y col., 1989). La proteína P, la cual se sugiere que podría estar

involucrada en el proceso de autoinmunidad, es un componente ribosomal (Levin y col., 1989). Se ha reportado (Murta y col., 1990) que una glicoproteína antigénica denominada gp57/51 (Scharfstein y col., 1985), es una cisteín proteínasa de *T. cruzi* denominada "cruzipaina" (Cazzulo y col., 1990). Recientemente se ha clonado el gen y obtenido la secuencia completa de una neuraminidasa de *T. cruzi* (Pereira y col., 1991). También se ha descrito una segunda familia de genes que expresan antígenos de 85 kDa y que posee regiones conservadas correspondientes a neuraminidasas bacterianas (Kahn y col., 1991; Takle y col., 1991).

### **1.7 Diagnóstico**

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas está basado tanto en los signos clínicos como en los síntomas de afección cardíaca, megaesófago, megacolon y en la demostración de la presencia de parásitos en sangre. La baja proporción de casos con manifestaciones clínicas en etapas tempranas y la naturaleza imprevisible de la patología en infecciones crónicas, determinan la importancia del desarrollo de métodos de diagnóstico que permitan una detección precisa de la infección y que, además, sirvan para pronosticar sus consecuencias. Para la detección de infecciones de *T. cruzi* en humanos, han sido desarrollados varios métodos de laboratorio (Storino, 1985). En la fase aguda de la enfermedad, el método de elección es la búsqueda del parásito en sangre periférica. Para esto, existen métodos tanto directos como indirectos. Entre los métodos directos, el más utilizado es el examen de una película gruesa de sangre entre portaobjetos y cubreobjetos. El grado de sensibilidad de este método es variable y depende, fundamentalmente, del nivel de parasitemia

del paciente y del cuidado y dedicación durante la observación. En cuanto a los métodos indirectos, el más empleado es el xenodiagnóstico, el cual consiste en alimentar vinchucas no infectadas sobre pacientes que se sospechen infectados y, luego de un cierto tiempo, analizar las heces de los insectos para detectar la presencia de *T. cruzi*. La efectividad ha demostrado ser casi el 100% en casos agudos y sólo un 50% en casos crónicos. Este método tiene desventajas de orden práctico, pues se requiere de una costosa infraestructura para la crianza de los insectos no infectados y de muchas horas-hombre para el estudio de los preparados (Storino, 1985).

Otro método utilizado es el inmunodiagnóstico, el cual se basa en la detección de anticuerpos específicos anti *T. cruzi* generados en el curso de la infección y se utiliza, especialmente, durante la etapa crónica de la infección. Las técnicas más usadas son la reacción de fijación de complemento, las reacciones de hemoaglutinación, reacciones de inmunofluorescencia y las reacciones inmunoenzimáticas o ELISA. Estas dos últimas han probado ser las más sensibles de las técnicas mencionadas (entre el 70% y el 95% de los casos crónicos). Para que el diagnóstico con estos métodos tenga valor, deben utilizarse por lo menos dos de las reacciones serológicas mencionadas (Storino, 1985).

En los métodos de inmunodiagnóstico, se utilizan poblaciones de antígenos heterogéneas y no estandarizadas, como extractos acuosos, suspensiones de parásitos, etc. (Krettli, 1982). Esto ocasiona la aparición de falsos positivos y reacciones cruzadas con otras enfermedades parasitarias como leishmaniasis y toxoplasmosis (Kirchhoff y col., 1987). En la actualidad, varios laboratorios están dedicados a la búsqueda de antígenos específicos de *T. cruzi* que sean reconocidos únicamente por sueros de pacientes chagásicos (Schechter y

col., 1983; Araujo, 1985; Scharfstein y col., 1985; Ibañez y col., 1987; Lemsre y col., 1986; Levin y col., 1989). El uso de anticuerpos monoclonales ha mostrado ser una buena herramienta en la búsqueda de un método de diagnóstico efectivo (Lemsre y col., 1986; Tachibana y col., 1988). Los ensayos capaces de detectar la presencia de componentes del parásito en la sangre, utilizando anticuerpos monoclonales, proveen una evidencia de infección en el momento del estudio. En cambio, los métodos para detectar anticuerpos anti *T. cruzi* mencionados previamente, pueden no discernir entre una infección en curso y un caso de remisión por quimioterapia (Araujo y col., 1984a)

Actualmente se está estudiando la posibilidad de utilizar sondas de ADN total de parásito en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Ashall y col., 1988). También se están considerando las sondas de ADN kinetoplástico (ADNk), ya que *T. cruzi* posee gran cantidad de minicírculos (Morel y col., 1984; Sánchez y col., 1984). En éstos se han encontrado secuencias repetidas que están conservadas en cepas que presentan una gran diversidad biológica. La abundancia de estas secuencias las hace susceptibles de ser utilizadas en estudios de diagnóstico (Degrave y col., 1988). Otro método que en la actualidad se está evaluando es el de PCR (polymerase chain reaction), en el cual se amplifican selectivamente fragmentos de las regiones conservadas de los minicírculos del ADNk de *T. cruzi* (Sturm y col., 1989).

## **1.8 Quimioterapia**

Actualmente no existe ninguna droga enteramente adecuada para la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. El tratamiento específico en humanos ha resultado ser de gran utilidad en los casos agudos

que ocurren en zonas endémicas, en los casos agudos inducidos por transfusión sanguínea, en los casos congénitos y en las infecciones accidentales en los laboratorios. Las únicas drogas utilizadas en la actualidad, son dos compuestos nitroheterocíclicos conocidos como "nifurtimox" (derivado de un nitrofurano) y "benznidazol" (derivado de un nitroimidazol). Ambas drogas no son efectivas en los casos crónicos, requieren un largo período de administración y tienen severos efectos colaterales tales como, reacciones de hipersensibilidad, neuritis periférica, pérdida de peso y trastornos gastrointestinales. El tratamiento se recomienda en los casos agudos en los cuales ha sido posible eliminar la parasitemia totalmente. La eficacia de ambas drogas es baja y sólo un pequeño porcentaje de los pacientes tratados son curados (Brener, 1984)

La medicación ideal para el tratamiento de la enfermedad de Chagas debe curar tanto los casos agudos como los crónicos, debe ser efectiva por vía oral y en una única y pequeña dosis, debe carecer de efectos colaterales y teratogénicos, no debe requerir hospitalización y no debe generar resistencia en el parásito (WHO, 1981).

### **1.9 Vacunación**

La prevención de la enfermedad de Chagas se basa, fundamentalmente, en el control del vector mediante el uso de insecticidas (Oliveira-Filho, 1988), en la detección de muestras infectadas en los bancos de sangre en áreas endémicas, la eliminación de los parásitos por adición de cristal violeta a esa sangre (Docampo y col., 1988), y en el mejoramiento de las viviendas para la erradicación del vector de ellas.

Numerosos estudios realizados por diferentes laboratorios durante varios años indican que, en modelos experimentales, es posible obtener un control inmunológico de la parasitemia y de la muerte causada por *T. cruzi*. Para este propósito se han utilizado diferentes preparaciones de antígenos, tales como parásitos atenuados (Basombrío y col., 1987), parásitos muertos (Okonla y col., 1982) y fracciones del parásito, como por ejemplo la porción flagelar (Ruiz y col., 1985). En todos estos casos la protección obtenida ha sido variable; sin embargo, podría ser mejorada utilizando mejores antígenos, adyuvantes y/o protocolos para inmunizar animales. La posibilidad de una respuesta autoinmune no sólo impide la utilización de mezclas complejas de antígenos como componentes de una posible vacuna (Frasch y col., 1990), sino que también indica la necesidad de usar preparaciones antigénicas más definidas, en lo posible antígenos puros, ya sea solos o mezclas de ellos (Frasch y col., 1991). El principal problema respecto a esto es la obtención de cantidades adecuadas de antígenos purificadas, ya que la mayoría de estos antígenos se encuentran en el parásito en muy pequeñas cantidades. Este problema puede ser superado, obteniendo antígenos por medio de la tecnología del DNA recombinante.

Para una vacuna efectiva, sólo deberían considerarse aquellos antígenos que generen una protección en el tiempo y que no produzcan ningún tipo de agresión autoinmune (Brener, 1986).

## **OBJETIVOS**

Los objetivos de este estudio fueron los siguientes:

- Obtener anticuerpos policlonales contra antígenos recombinantes de *T. cruzi* y analizar la especificidad de reacción del suero policlonal obtenido contra uno de ellos. Para lograr ésto, en una primera etapa, se procedió a inducir las proteínas de fusión correspondientes.

-Determinar la relevancia de estos clones, desde el punto de vista antigénico. Para realizar ésto, se estudiaron sueros de pacientes correspondientes a las etapas aguda y crónica de la enfermedad de Chagas y se compararon los resultados obtenidos, con la finalidad de poder determinar algún/os antígeno/s característico/s de cada etapa. También se realizó una comparación considerando el lugar de origen y el sexo de los pacientes.

- Estudiar la respuesta, contra estos antígenos, de sueros correspondientes a recién nacidos con infección congénita; infantes sanos nacidos de madres chagásicas, y las madres de los niños de ambos grupos. Comparar los resultados obtenidos para tratar de establecer diferencias entre los dos grupos.

- Analizar sueros correspondientes a seguimientos, obtenidos a diferentes tiempos post-infección, de pacientes con enfermedad de Chagas. Dos grupos fueron analizados, uno sensible y otro resistente al tratamiento quimioterapéutico. La finalidad fue determinar diferencias entre ambos grupos, en cuanto a la respuesta humoral.



- Estudiar la respuesta de sueros correspondientes a diferentes patologías de la enfermedad con la finalidad de poder determinar, algún/os antígeno/s recombinante/s característico/s de una patología dada.

- Analizar sueros correspondientes a pacientes con leishmaniasis y personas no infectadas, para poder estimar el uso potencial de estos antígenos con fines diagnósticos.

- Analizar sueros de ratones infectados con *T. cruzi* a fin de determinar la respuesta humoral de éstos, contra las proteínas recombinantes. Establecer una comparación entre la respuesta humoral en infecciones humanas y aquella observada en el modelo experimental murino.

## **MATERIALES Y METODOS**

## 2.1 Materiales

### 2.1.1 Origen y calidad de los reactivos utilizados

El grado de pureza de los reactivos utilizados fue analítico, salvo en los casos en que fuera necesario un grado de pureza mayor, lo que se indica a continuación.

Acrilamida	BRL (purificada especialmente para electroforesis)
Agarosa	Sigma o BRL
Ampicilina trihidrato	Sigma
Bactotripton	Difco
Extracto de levadura	Difco
Agar	Difco
N'N'-metilenbisacrilamida	BRL (purificada especialmente para electroforesis)
IPTG	Sigma o BRL
Sephadex	Pharmacia
Sodio Dodecil Sulfato	BDH (especialmente puro)
Trizma Base (Tris)	Sigma
Imidazol	Aldrich
4 Cloro 1 Naftol	Aldrich

### 2.1.2 Anticuerpos y proteína A

Proteína A	Sigma
IgG hecha en conejo anti IgG humana	Sigma

IgG hecha en conejo anti IgM humana    Sigma  
Peroxidasa-IgG hecha en cabra  
anti IgG humana                                DAKO

### **2.1.3 Medios de cultivo**

Los medios de cultivo para las bacterias se prepararon de la siguiente manera (Maniatis y col., 1982):

-LB (Luria broth): 10 gr. de Bacto triptona, 5 gr. de extracto de levadura y 10 gr. de cloruro de sodio en 1 lt. de agua destilada; se ajustó el pH a 7.5 con hidróxido de sodio.

-LB agar: Al medio descrito anteriormente se le agregó 15 gr. de agar por cada litro de cultivo.

-LB top agorosa: Al medio descrito anteriormente se le agregó 7 gr. de agarosa por cada litro de cultivo.

### **2.1.4 Antibióticos**

Para la selección de bacterias se utilizó ampicilina trihidrato (Maniatis y col., 1982). Se preparó una solución madre de ampicilina de 100 mg/ml en agua destilada, luego se esterilizó por filtración a través de membranas Millipore de 0.44  $\mu\text{m}$  de poro y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Esta solución se agregó a los medios de cultivo, previamente esterilizados por autoclave. Para evitar que el antibiótico se dañe por calor excesivo, luego de esterilizar los medios de cultivo, se enfriaron hasta llegar a una temperatura aproximada de  $50^{\circ}\text{C}$ , antes de agregar el antibiótico. La concentración final de ampicilina utilizada en los medios de cultivo fue de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### 2.1.5 Cepas de bacterias utilizadas:

Las cepas fueron de la familia *Escherichia coli* K-12:

Y-1089 (Young y col., 1983):	araD139 $\Delta$ lacU169 proA <sup>+</sup> $\Delta$ lon rpsL hf1A 150 [chr: :Tn 10 (tet <sup>r</sup> ) pMC9
Y-1090 (Young y col., 1983):	supF hsdR $\Delta$ lon $\Delta$ lacU169 rpsL trpC22::Tn 10 (tet <sup>r</sup> ) pMC9

### 2.1.6 Cepas y aislamientos de parásitos

Las cepas y aislamientos de parásitos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

RA: aislada en la provincia de La Pampa, Argentina, en 1978, de un paciente con infección aguda (González Cappa, 1981).

Tulahuén (Tul): aislada de un triatomineo de Chile (Pizzi, 1956).

TCC: variante atenuada derivada de la cepa Tulahuén (Basombrío, 1982).

CA1: aislada en diciembre de 1974 de un paciente con miocarditis chagásica crónica de la provincia de San Luis, República Argentina. Esta cepa no produce infecciones letales en ratón; produce la máxima parasitemia entre los 25-30 días post-infección, siendo detectable la presencia de parásitos aún 12-18 meses post-infección (González Cappa, 1980).

G8: aislamiento a partir de un perro en Santiago del Estero, República Argentina.

G9: aislamiento a partir de un paciente.

G1: aislamiento a partir de un paciente.

G2: aislamiento a partir de un paciente.

### **2.1.7 Cepas de ratones**

Las cepas de ratones usadas fueron:

Swiss: cepa exocriada

Rockland: cepa exocriada

Balb/cJ: cepa endocriada

C57BL/6J: cepa endocriada

### **2.1.8 Sueros utilizados**

#### **2.1.8.1 Sueros de origen animal**

Los sueros de ratones infectados con la cepa Tul se obtuvieron luego de aplicar dos dosis intraperitoneales de  $10^3$  a  $10^4$  tripomastigotes de sangre. En el caso de los ratones infectados con CA1 y RA, la dosis fue de  $10^6$  tripomastigotes. Los sueros anti TCC fueron obtenidos de animales infectados con  $10^6$  epimastigotes de cultivo de los cuales el 8% eran tripomastigotes. La infección con los aislamientos de *T. cruzi*, G1, G2, G8 y G9 se realizó inoculando heces de vinchucas provenientes de xenodiagnósticos positivos para cada uno de los aislamientos. Todos los sueros utilizados consistieron en un "pool" de suero de varios ratones.

### 2.1.8.2 Sueros de origen humano

Los sueros de casos correspondientes a las etapas aguda y crónica fueron obtenidos de pacientes diagnosticados en Brasil. Los sueros correspondientes a los recién nacidos y sus respectivas madres fueron obtenidos de pacientes diagnosticados en Chile. En este caso se tomaron cuarenta y cuatro muestras de suero. Veinte muestras fueron tomadas del cordón umbilical en el momento del nacimiento, ocho correspondientes a casos de infecciones congénitas y doce sin infección. Las otras dos muestras de casos con infección congénita fueron obtenidas de los niños dos días (caso 21) y dos meses (caso 22) luego del nacimiento. Los sueros de las veintidós madres correspondientes, todas con enfermedad de Chagas en la etapa crónica, fueron tomados al mismo tiempo que los sueros de los niños. Se utilizaron dos métodos serológicos para examinar las diluciones seriadas de las muestras de suero. Para la técnica ELISA (Voller, 1975) se usaron como antígenos extractos solubles obtenidos a partir de epimastigotes de cultivo de *T. cruzi* y como anticuerpo secundario IgG hecha en conejo, acoplada a peroxidasa, contra IgG o IgM humana. La técnica de inmunofluorescencia indirecta se aplicó según lo descrito anteriormente (Camargo, 1966), usando como antígeno epimastigotes de cultivo fijados y IgG acoplada a isotiocianato de fluoresceína contra IgG o IgM humana. En el momento del nacimiento, a los recién nacidos se les aplicaron dos xenodiagnósticos y éstos luego fueron examinados a los 30, 60 y 90 días (Schenone y col., 1974). Los xenodiagnósticos consisten en permitir que varios insectos *Triatoma infestans* de laboratorio succionen sangre de los pacientes y luego examinar el contenido del triturado intestinal algunas semanas después (Thiermann y col., 1985). Todos los infantes con infección congénita fueron

positivos para el xenodiagnóstico a los días indicados, mientras que los recién nacidos no infectados fueron negativos (Tablas 8 y 9). También se realizó una investigación clínica en el momento del nacimiento. Ocho casos con infección congénita presentaron manifestaciones clínicas, cinco presentaron hepatoesplenomegalia (casos 14, 17, 19, 20 y 22), tres tuvieron signos de encefalitis (casos 14, 19 y 21) y dos presentaron anemia (casos 16 y 22). Los niños no infectados estaban sanos al momento de nacer.

Los sueros correspondientes a casos con tratamiento quimioterapéutico, y su seguimiento a lo largo del tiempo, fueron obtenidos de pacientes diagnosticados en Brasil. En este caso, a dieciséis pacientes se les diagnosticó la enfermedad enseguida de la aparición de síntomas agudos. El diagnóstico se realizó a través de la detección de parásitos en gotas de sangre fresca y por medio de los tests serológicos convencionales mencionados anteriormente. Luego del diagnóstico de la enfermedad, todos los pacientes fueron tratados durante 60 días con benznidazol. La dosis utilizada fue de 5-10 mg/kg/día. Se tomaron muestras de suero de todos los pacientes, antes y después del tratamiento, con el fin de obtener un seguimiento de cada caso a lo largo del tiempo. De los dieciséis pacientes, ocho continuaron presentando resultados positivos por serología convencional y tuvieron al menos un xenodiagnóstico positivo; por lo tanto fueron considerados resistentes al tratamiento. El resultado obtenido de los sueros del seguimiento de un paciente (caso 69) es considerado dudoso, ya que los sueros de su seguimiento fueron negativos o debilmente positivos. Los otros siete pacientes presentaron resultados negativos, luego del tratamiento, tanto para los metodos serológicos convencionales como para el xenodiagnóstico; por lo tanto, se los consideró sensibles al tratamiento.



Los sueros de diferentes patologías fueron obtenidos de pacientes diagnosticados tanto en Brasil como en Chile

Los sueros provenientes de Brasil fueron suministrados por los Drs. Alejandro Luquetti y Anis Rassi. Los originarios de Chile, fueron enviados por la Dra. Myriam Lorca.

### **2.1.9 Antígenos recombinantes usados**

Los antígenos recombinantes de *T. cruzi* usados son el resultado de una búsqueda inmunológica, hecha con un suero de un paciente chagásico, en una genoteca de expresión construida, con DNA genómico de *T. cruzi* en lambda gt11 (Ibañez y col., 1987). Los productos de los genes clonados se obtienen en forma de proteínas de fusión con  $\beta$ -galactosidasa.

## **2.2 Inducción y purificación de proteínas de fusión**

### **2.2.1 Preparación de bacterias para infectar**

Se sembró un inóculo de bacterias *Escherichia coli* Y-1090 en medio LB con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 0.2% de maltosa. Esto se cultivó toda la noche a 37°C con agitación. Al día siguiente, el cultivo se centrifugó a 2000 g durante 20 minutos y posteriormente las bacterias se resuspendieron en 0.4 volúmenes de  $\text{SO}_4\text{Mg}$  10 mM.

### **2.2.2 Obtención de fagos con alto título de infección**

Se infectaron células *E. coli* Y-1090 con fagos recombinantes para obtener lisis confluyente en placas de Petri. Se dejaron incubando durante 20 minutos y luego se procedió a sembrar las bacterias infectadas en top agarosa y

posteriormente en la placa de Petri con LB agar y 100 µg/ml de ampicilina. Una vez solidificado el top agarosa, ésta se puso a incubar a 42°C durante toda la noche. Al día siguiente, se colocó SM (0.6% NaCl, 0.2% MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.01% gelatina) sobre la placa de Petri con lisis confluyente y se dejó incubando durante 4-5 horas a temperatura ambiente con agitación. Luego se colocó la suspensión de fagos obtenida, en un tubo, y se le agregó una gota de cloroformo.

### 2.2.3 Inducción de proteínas de fusión

Se cultivaron bacterias *E. coli* Y-1089 en medio LB con 100 µg/ml. de ampicilina, 10 mM SO<sub>4</sub>Mg y 0.2% de maltosa, durante toda la noche a 37°C con agitación. De ese cultivo se tomaron bacterias, las cuales se infectaron con fagos recombinantes con alto título (10<sup>9</sup> ufp/ml). Se dejaron incubando 20 minutos a 37°C y luego se agregaron a 300 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina y 10 mM SO<sub>4</sub>Mg. Esto se incubó primero 3 horas a 35°C con agitación y luego 20 minutos a 45°C para producir la lisis de las bacterias. A continuación se sacó una alícuota del medio de cultivo y se puso en otro recipiente. Al resto del cultivo se le agregó IPTG hasta llegar a una concentración final de 5 mM y se lo incubó a 37°C durante 3 horas, para producir la inducción de las proteínas de fusión. A la alícuota separada previamente se la sometió al mismo tratamiento pero sin agregarle IPTG. Finalizadas las tres horas de incubación se centrifugaron ambos cultivos a 2000 g durante 10-15 minutos. El precipitado fue resuspendido en el siguiente buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-mercaptoetanol, 0.2 mM PMSF. Luego de resuspender los precipitados se hicieron dos ciclos de congelamiento y descongelamiento a -70°C o nitrógeno líquido para romper las bacterias. Posteriormente se trató la

muestra con DNAasa. Luego se tomó el equivalente a 1 ml del medio de cultivo original y se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5 % en condiciones desnaturalizantes (Laemli, 1970). En caso de haber inducción de la proteína de fusión, se observó una banda en la calle correspondiente al cultivo con IPTG y no se observó en la calle correspondiente al cultivo sin IPTG.

#### **2.2.4 Purificación de proteínas de fusión**

Para purificar las proteínas recombinantes ya inducidas, se efectuaron electroforesis preparativas en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes (Laemli, 1970). Una vez finalizada la corrida electroforética se cortó la zona del gel donde se encontraba la proteína que se quería purificar. Para extraer las proteínas del gel se usó el método de la electroelución. Para esto se usó el *Elutrap*<sup>®</sup>. Luego de ser extraída, se procedió a su cuantificación.

#### **2.2.5 Cuantificación de las proteínas de fusión**

Luego de la purificación de las proteínas de fusión, éstas se cuantificaron mediante el micrométodo de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizó gamma globulina bovina como estándar (Bio-Rad Protein Assay). Debido a que las muestras estaban disueltas en el buffer Laemli, fue necesario quitar el SDS para eliminar la interferencia que éste produce en este método. A 50  $\mu$ l de muestra se le agregaron 450  $\mu$ l de KCl 100 mM; ésta se dejó precipitar a temperatura ambiente y luego se centrifugó 5 minutos a 10000 g. Las determinaciones se realizaron usando el sobrenadante.

### **2.3 Obtención de sueros policlonales contra proteínas de fusión**

El esquema de inmunización utilizado para inyectar a los conejos consistió en, dar una primera dosis de 100 µg de proteína recombinante purificada, emulsionada con adyuvante completo de Freund; a los 15 días, dar una segunda dosis con la misma cantidad de proteínas pero esta vez emulsionada con adyuvante incompleto de Freund. A los quince días de aplicada la segunda dosis, se sacó un poco de sangre de la oreja para determinar la presencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína recombinante inoculada.

### **2.4 Análisis de sueros de infección usando antígenos recombinantes**

#### **2.4.1 Preparación de lisado de bacterias *E. coli* Y-1090**

Se sembró un inóculo de la cepa Y-1090 de *E. coli* en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina. Se cultivó toda la noche a 37°C con agitación. Al día siguiente, el cultivo se centrifugó 10 minutos a 4000 g y el precipitado se resuspendió en 1 ml de agua destilada por cada 100 ml de medio de cultivo. Luego de la resuspensión, se calentó durante 10 minutos a 100°C y luego se guardó a -20°C.

#### **2.4.2 Adsorción de los sueros**

Los sueros fueron diluidos con TBS + 3% leche descremada en polvo + 2% glicina. Luego fueron preadsorbidos con el lisado preparado a partir de la cepa huésped (*E. coli* Y-1090) para los fagos. Para preadsorber los sueros, se usó 1 ml de lisado de bacterias por cada 100 ml de suero diluido y se dejó

durante 3 horas con agitación suave a 4°C. Luego se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se guardó a -20°C.

### **2.4.3 Obtención de proteínas recombinantes sobre filtros de nitrocelulosa**

Con las bacterias *E. coli* preparadas, se sembró un césped sobre placas de Petri. Sobre éste, se colocó una pequeña gota, con alto título ( $10^9$  ufp/ml), de cada uno de los fagos recombinantes en suspensión. Como control se usó lambda gt11 sin inserto. Esto se incubó a 42°C hasta obtener placas de lisis. Una vez obtenidas éstas, se colocó sobre ellas un filtro de nitrocelulosa, previamente embebido en IPTG 10 mM, y se incubó a 37°C durante 2-3 horas, para lograr la inducción de los antígenos recombinantes. Luego del periodo de inducción, se retiraron los filtros de nitrocelulosa de las placas de Petri, para luego ser incubados con los sueros.

### **2.4.4 Marcaciones de proteína A y anticuerpos**

#### **2.4.4.1 Marcación de proteína A con $^{125}\text{I}$**

En un tubo de iodogén se colocaron 50 µg de proteína A, 40 µl de buffer fosfato 50 mM pH 7.4 y 1 mCi de  $^{125}\text{I}$ . Se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación ocasional. Luego se pasó la mezcla de reacción a un tubo que contenía una solución 10% de β-mercaptoetanol. Al tubo de iodogén se le agregó un poco de INa 1M para lavarlo y luego, éste se agregó al tubo que contenía la proteína A iodada. Todo esto se pasó a través de una columna de Sephadex G-50, para separar el  $^{125}\text{I}$  libre de la proteína A

iodinada. La columna se eluyó con PBS y se recogieron fracciones de 0.5 ml, a las cuales se les determinó la cantidad de material radiactivo presente. Las muestras contenidas en el primer pico de elución se juntaron y fueron utilizadas posteriormente para detectar anticuerpos.

#### **2.4.4.2 Marcación de anticuerpos con $^{125}\text{I}$**

Los anticuerpos que se iodinaron fueron IgG, hecha en conejo, anti IgG humana e IgG, hecha en conejo, anti IgM humana. La metodología empleada para iodinar estos anticuerpos fue la misma que la usada para la proteína A. La única variación efectuada fue que por cada 50  $\mu\text{g}$  de anticuerpo se usaron 0.5 mCi de  $^{125}\text{I}$ .

#### **2.4.5 Detección de anticuerpos en sueros de infección**

##### **2.4.5.1 Usando $^{125}\text{I}$ -proteína A o $^{125}\text{I}$ -anticuerpos**

Los filtros se lavaron cinco minutos en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, NaCl 150 mM). Luego se incubaron en una solución de bloqueo (TBS + 3% leche descremada +2% glicina) durante 30 minutos. A continuación se procedió a incubar los filtros con los sueros, previamente adsorbidos con lisado de *E. coli* y diluidos en solución de bloqueo, durante 60 minutos; lavar cuatro veces con TBS (15 minutos cada una); incubar con la  $^{125}\text{I}$ -proteína A o  $^{125}\text{I}$ -anticuerpo diluída en solución de bloqueo ( $10^6$  cpm/ml) durante una hora. Luego se hicieron tres lavados con TBS (10 minutos cada uno), 1 lavado con TBS-NP-40 0.1% (10 minutos) y 2 lavados con TBS (10 minutos cada lavado). Finalmente los filtros se dejaron secar a temperatura ambiente.

#### 2.4.5.2 Usando anticuerpos acoplados a peroxidasa

La metodología usada fue la misma que la mencionada anteriormente. Las diferencias son las siguientes: en lugar de incubar con anticuerpos iodados, la incubación se realizó con los anticuerpos acoplados a peroxidasa diluïdos en la solución de bloqueo. Para revelar la presencia de peroxidasa, se preparó una solución 15% metanol, 0.05% 4 cloro 1 naftol, 10 mM imidazol. Por cada 20 ml de esta solución se agregaron 30 µl de agua oxigenada. Los filtros se ponían en contacto con esta solución y se dejaba revelar color. Se consideraron positivas aquellas señales más intensas que el control sin inserto.

#### 2.4.6 Autorradiografías

Los filtros de nitrocelulosa incubados con  $^{125}\text{I}$ -proteína A o  $^{125}\text{I}$ -anticuerpos se cubrieron con *Saran Wrap*<sup>®</sup>, se introdujeron en un cassette y se expusieron en contacto con películas KODAK X-OMAT<sup>®</sup>. Las exposiciones fueron realizadas a temperatura ambiente o a  $-70^{\circ}\text{C}$  en presencia de pantallas intensificadoras (*Dupont-Cronex*<sup>®</sup>), para aumentar la sensibilidad del proceso.

### 2.5 Análisis estadístico

Se utilizó el test de Chi cuadrado para el análisis de los datos obtenidos a partir de los sueros de las etapas crónica y aguda (Bancroft, 1960). Este test también se usó para comparar los resultados obtenidos con sueros pertenecientes a diferentes patologías, diferente ubicación geográfica y diferentes sexos.

## **RESULTADOS**



### **3 Obtención de anticuerpos policlonales contra antígenos recombinantes de *T. cruzi***

#### **3.1 Antecedentes y objetivos**

Se llevó a cabo una búsqueda inmunológica en una genoteca de DNA genómico de *T. cruzi*, construida en el vector  $\lambda$ gt11, usando un suero de un paciente chagásico en la etapa crónica de la enfermedad (Ibañez y col., 1987). A partir de ésta se clonaron varios genes que codificaban para antígenos de *T. cruzi*. Estos genes fueron secuenciados y, analizando su secuencia, se observó que la mayoría de ellos contenía una estructura formada por unidades repetidas de aminoácidos (Ibañez y col., 1988). A uno de ellos se lo denominó SAPA (Shed Acute Phase Antigen) (ver más adelante).

El primer objetivo de este trabajo fue obtener anticuerpos policlonales contra estos antígenos recombinantes para luego realizar distintos estudios. En primer lugar determinar su localización celular por medio de técnicas tales como inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunomicroscopía electrónica. Por otra parte, también se utilizaron para realizar estudios de protección en diferentes cepas de ratones. Para esto se procedió, en primer lugar, a la obtención de proteínas de fusión.

#### **3.2 Obtención de proteínas de fusión.**

Los antígenos recombinantes se obtuvieron fusionados a  $\beta$ -galactosidasa, por lo tanto, para obtenerlos, hubo que inducir su síntesis con IPTG. Para determinar si la inducción se había llevado a cabo, se corrieron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. En éstos se



**Figura 2**

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de los extractos de *E.coli*, previamente infectados con los fagos lambda gt11 recombinantes, inducidos (i) y sin inducir (si) con IPTG.

sembró una alícuota de cultivo sin inducir y otra de cultivo inducido. En la Figura 2 se observan las bandas de inducción correspondientes a las diferentes proteínas utilizadas (#1, #2, SAPA, #10, #13, #26, #30 y #36). Luego de inducidas, las proteínas fueron purificadas por medio de una electroelución y finalmente cuantificadas a través del método de Bradford. Una vez obtenidas, las proteínas fueron utilizadas para realizar varios estudios. Una porción se utilizó para inmunizar conejos y, de esta manera, obtener anticuerpos policlonales contra ellas. Otra porción se usó para realizar estudios de protección en ratones Swiss (realizado en colaboración con el Dr. Basombrío) y en ratones Balb/c (en colaboración con la Dra. Segura y el Dr. Ruiz). Ambos estudios se están llevando a cabo actualmente.

### **3.3 Producción de anticuerpos policlonales en conejo**

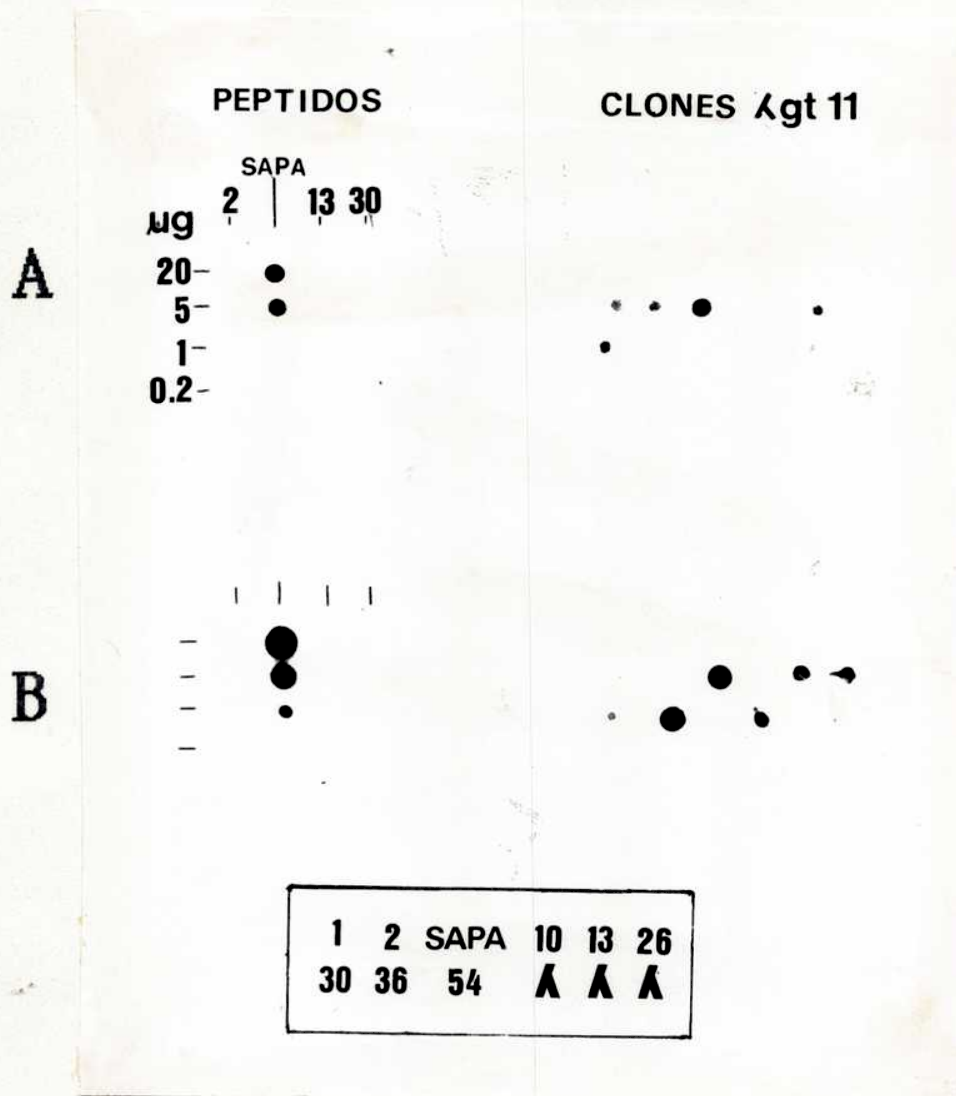
#### **3.3.1 Análisis de especificidad**

Los antígenos recombinantes #1, #2, SAPA, #13, #30 y #36 fueron utilizados para producir anticuerpos en conejo. Estos últimos fueron producidos según lo descrito en Materiales y Métodos. En resumen, a cada conejo se le inocularon dos dosis de la proteína recombinante. La primera se emulsionó con adyuvante completo de Freund y la segunda con adyuvante incompleto de Freund. Posteriormente se obtuvo suero de cada conejo y se analizó la presencia de anticuerpos específicos contra la proteína recombinante utilizada. Todos los anticuerpos policlonales producidos, salvo uno, reconocieron específicamente al antígeno recombinante que había sido utilizado para la inmunización (Ibañez, 1989). El único que mostró, además, reacción contra otro

clon fue SAPA. La reacción cruzada que se observó fue contra el clon #36 (Figura 3B). Analizando la secuencia de ambos clones se encontró que los dos compartían una secuencia de tres aminoácidos (PVD). Estos se encuentran contenidos en las unidades repetidas del clon #36 (Figura 4B); sin embargo, en el clon SAPA estos aminoácidos están distribuidos entre los extremos de cada unidad repetida, de tal manera que sólo se obtiene esa secuencia al unirse dos unidades repetidas en forma cabeza-cola (Figura 4A). Por análisis de secuencias se observó que todos los clones obtenidos presentaban polimorfismos en las estructuras repetidas (Ibañez y col., 1988; Affranchino y col., 1989). En particular, el clon SAPA presentaba cuatro estructuras repetidas que diferían ligeramente en sus respectivas secuencias (Figura 4A). Para determinar si la secuencia de aminoácidos PVD podía ser la causa de esta reacción cruzada observada con el antígeno #36, se fabricó un péptido sintético con una de las secuencias de aminoácidos correspondiente a SAPA, que no contuviera el grupo de aminoácidos compartidos con el clon #36 (Figura 4C). Lo que se observó es que los anticuerpos hechos en conejo, obtenidos a partir de la inmunización del animal con el péptido sintético, reconocía tanto a éste, como al antígeno recombinante SAPA (Figura 3A); sin embargo, no reconocían al clon #36 (Figura 3A). Por otro lado, también puede observarse que el anticuerpo producido mediante inmunizaciones con el antígeno recombinante SAPA, también reconoce al péptido sintético con la secuencia de SAPA (Figura 3B).

### **3.3.2 Utilización de los anticuerpos policlonales**

Una vez confirmada la especificidad de reacción, estos sueros fueron utilizados para realizar varios estudios. En primer lugar se determinó la



**Figura 3**

Reactividad contra diferentes péptidos sintéticos y proteínas de fusión de: (A) suero hecho en conejo anti-proteína de fusión SAPA y (B) suero hecho en conejo anti-péptido sintético SAPA. El recuadro indica la disposición de las proteínas de fusión. λ indica lambda gt 11 religado sin inserto.

**A**

DSSAHGTPSTPQ  
 --T-----R  
 -----S-----  
 -----S-----

**B**

ALPQEEQEDVGPRHVDPDFRSTTQDAYRPVQPSAYKR  
 -----U-E-----H-----

**C**

NH<sub>2</sub>-YDSTAHGTPSTPQDSSAHSTPSTPA-COOH

**Figura 4**

Secuencia de aminoácidos de: (A) estructuras repetidas del antígeno SAPA, (B) estructuras repetidas del antígeno #36 y (C) péptido sintético SAPA

localización celular de estos antígenos; para ésto se utilizaron dos técnicas: inmunofluorescencia e inmunomicroscopía electrónica. Se observó que los antígenos #1 y #30 estaban localizados en el bolsillo flagelar, el antígeno #2 no mostraba una ubicación preferencial, el antígeno #13 se localizaba en la superficie del parásito, el antígeno SAPA mostraba una distribución similar a la del antígeno #13; y el antígeno #36 se encontraba en el citoplasma, superficie celular y cuerpo basal (Souto-Padrón y col., 1989).

También se utilizaron estos anticuerpos para estudiar la expresión de estos antígenos en parásitos sanguíneos obtenidos de sangre de ratón. Se observó que cada parásito expresaba en su superficie, simultáneamente, los antígenos #1, SAPA y #30 (Leguizamón y col., 1991).

Otro estudio realizado es el de protección de ratones a través de transferencia pasiva de anticuerpos. Para ésto, se purificaron las fracciones de gammaglobulinas, a partir de los sueros policlonales de conejo fabricados contra cada uno de los antígenos, y se concentraron para su posterior inoculación. Este estudio se está llevando a cabo actualmente en colaboración con el Dr. Basombrio en la provincia de Salta.

## **4 Respuesta humoral en pacientes con enfermedad de Chagas**

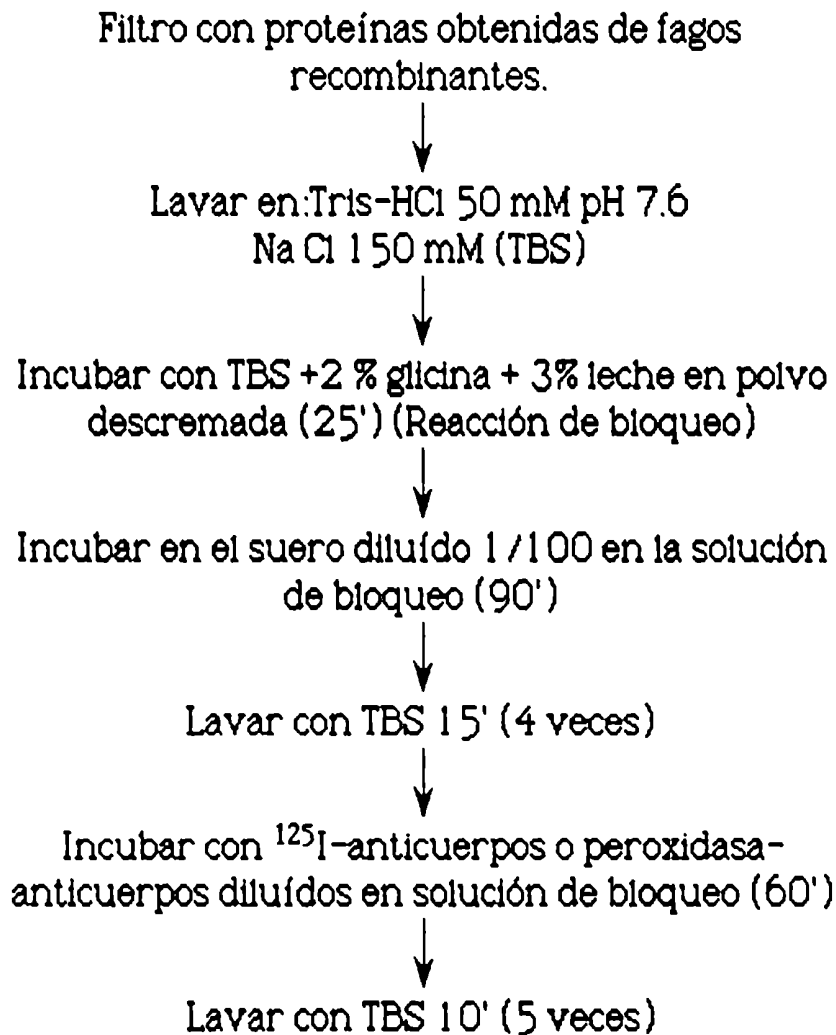
### **4.1 Antecedentes y objetivos**

Uno de los métodos utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, se basa en la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*, generados durante la infección; el cual es usado, especialmente, durante la etapa crónica de la infección. Las técnicas más comunmente usadas son la reacción de fijación de complemento, las reacciones de hemoaglutinación, reacciones de

inmunofluorescencia y las reacciones inmunoenzimáticas o ELISA. Estas dos últimas han probado ser las más sensibles entre las antes mencionadas (Storino, 1985). En los métodos de inmunodiagnóstico, se utilizan mezclas de antígenos heterogéneas y no estandarizadas, tales como extractos acuosos, suspensiones de parásitos, etc. (Krettli, 1982). Muchas veces, esto ocasiona la aparición de falsos positivos y/o reacciones cruzadas con otras enfermedades parasitarias, siendo la más común, la leishmaniasis (Kirchhoff y col., 1987).

Los antígenos recombinantes usados durante este estudio, fueron obtenidos a partir de la búsqueda inmunológica de una genoteca de expresión de *T. cruzi* usando el suero de un paciente chagásico en su etapa crónica (Ibañez y col., 1987). Teniendo en cuenta esto, el objetivo durante esta etapa del trabajo fue determinar la relevancia de estas proteínas recombinantes, en infecciones humanas, desde el punto de vista antigénico y tratar de determinar su eventual uso en el diagnóstico de la enfermedad. Para esto, se analizaron sueros humanos correspondientes a las etapas aguda y crónica de la enfermedad, sueros de casos con infección congénita, sueros de pacientes sometidos a tratamiento quimioterapéutico y sueros de pacientes con diferentes patologías. También se analizaron sueros correspondientes a pacientes con leishmaniasis, y provenientes de personas no infectadas. Para llevar a cabo este estudio, en primer lugar se optimizaron las condiciones del sistema de detección de anticuerpos en los sueros a ser analizados. Los experimentos previos se habían realizado utilizando en la solución bloqueante albúmina de suero bovino (BSA); sin embargo, en algunos casos, los resultados no eran muy claros. Cuando en lugar de BSA se utilizó leche descremada en polvo no sólo aumentó la claridad de éstos, sino que también aumentó





### Figura 5

Metodología usada para incubar los diferentes sueros con los antígenos recombinantes de *T. cruzi*

la sensibilidad del sistema. Debido a estos resultados la metodología seguida incluyó leche descremada en polvo en la solución bloqueante (Figura 5).

#### **4.2 Etapas aguda y crónica de la enfermedad**

Se analizaron cuarenta y ocho (48) sueros correspondientes a la etapa aguda, originarios de Brasil, y ciento ocho (108) correspondientes a la fase crónica de la enfermedad. Estos últimos fueron obtenidos tanto en Brasil como en Chile.

Los sueros fueron diluidos, y posteriormente incubados con los filtros de nitrocelulosa, que contenían los antígenos recombinantes, tal como se describe en la Figura 5. En resumen, todos los filtros fueron incubados en una solución de bloqueo, luego se pusieron en contacto con cada suero y, posteriormente, se incubaron con  $^{125}\text{I}$ -proteína A.

Al analizar los resultados obtenidos con los sueros de la etapa aguda de la enfermedad, se observó que el 100% de éstos reconoció a uno o más de los antígenos recombinantes utilizados (Tablas 1 y 6). El 96% de los sueros reaccionó con el antígeno SAPA, el 45% con el #13 y el 33% con el #36 (Tabla 6). Los antígenos #1, #2 y #30 fueron reconocidos por el 14%, 2% y 8% de los sueros, respectivamente; mientras que para los antígenos # 10, #26 y #54 no se detectaron anticuerpos (Tablas 1 y 6). En la Figura 6 se puede observar un ejemplo de la respuesta característica de un suero correspondiente a la etapa aguda.

Cuando se analizaron los datos obtenidos a partir del análisis de sueros de la etapa crónica de la enfermedad, se observó que el 96% de éstos reconocieron a uno o más de las proteínas recombinantes empleadas (Tablas 2-6). Al estudiar la reactividad de estos sueros con cada uno de los antígenos



**Tabla 1** (continuación): Sueros humanos correspondientes a la etapa aguda de la enfermedad de Chagas

SUERO	ORIGEN	ANTIGENOS RECOMBINANTES								
		1	2	SAPA	10	13	26	30	36	54
Gobf-72	Brasil			+						
Gobf-79	"			+						
Gobf-80				+						
Gobf-81				+						
Gobf-82				+						
Gobf-83				+						
Gobf-85				+						
Gobf-86				+						
Gobf-89				+						
Gobf-99				+						
Gobf-111				+						
Gobf-223				+						
Gobf-224				+						
Gobf-225				+						
Gobf-226				+						
Gobf-227				+						
Gobf-228				+						
Gobf-229				+						
Gobf-230				+						
Gobf-231				+						
Gobf-233				+						

Reactividad de sueros humanos correspondientes a la etapa aguda de la enfermedad de Chagas El signo (+) corresponde a la señal mas intensa que la observada con lambda gt11 sin inserto.

**Tabla 2:** Sueros de la enfermedad de Chagas correspondientes a pacientes con cardiopatías

SUERO	SEXO	ORIGEN	ANTIGENOS RECOMBINANTES									
			1	2	SAPA	10	13	26	30	36	54	
Gowh-40	M	Brasil	+	+						+		
Gobf-454	M		+	+						+		
Gobf-456	F		+	+								
Gobf-457	F		+	+								
Gobf-295	F		+	+								
Gobf-464	M		+									
Gobf-469	F		+									
89/1075	F	Chile	+									
90/997	M	"	+									
90/1252	F											
90/716	M											
90/857	M											
89/882	M											
90/787	M											
89/524	M											
89/295	M											
89/1167	M											
89/302	F											

Reactividad de sueros humanos correspondientes a pacientes con cardiopatías  
 El signo (+) corresponde a la señal mas intensa que la observada con lambda  
 gt11 sin inserto.

**Tabla 3:** Sueros de la enfermedad de Chagas correspondientes a pacientes con alteraciones digestivas (megaesófago y/o megacolon).

SUERO	SEXO	ORIGEN	ANTIGENOS RECOMBINANTES									
			1	2	SAPA	10	13	26	30	36	54	
Gowh-03	F	Brasil	+	+				+		+		
Gowh-13	M	"	+	+				+		+		
Gowh-14	M		+	+				+		+		
Gowh-22	F		+					+		+		
Gowh-26	M		+							+		
Gowh-27	F		+							+		
Gowh-28	F									+		
Gowh-42	M									+		
Gowh-49	F											
Gobf-216	M											
Gobf-440	M											
Gobf-441	M											
Gobf-442	F											
Gobf-445	F											
Gobf-446	M											
Gobf-447	F											
Gobf-448	M											
Gobf-455	F											
Gobf-472	M											
Gobf-214	M											
Gobf-439	M											
89/773	M	Chile										
89/1168	M	"										
89/1453	F											
90/1341	F											
89/1080	M											
89/1251	F											
89/1242	F											

Reactividad de sueros humanos correspondientes a pacientes con alteraciones digestivas. El signo (+) corresponde a la señal más intensa que la observada con lambda gt11 sin inserto.

**Tabla 4:** Sueros de la enfermedad de Chagas correspondientes a pacientes con patologías múltiples.

SUERO	SEXO	ORIGEN	ANTIGENOS RECOMBINANTES							
			1	2	SAPA	10	13	26	30	36
Gowh-02	M	Brasil	+	+			+	+	+	+
Gowh-05	M	"	+	+			+	+	+	+
Gowh-06	F	"	+	+					+	+
Gowh-08	M	"	+	+					+	
Gowh-09	M	"	+	+					+	
Gowh-10	M	"	+	+					+	
Gowh-15	F	"		+					+	
Gowh-16	F	"								
Gowh-17	M	"								
Gowh-20	M	"								
Gowh-23	M	"								
Gowh-24	F	"								
Gowh-25	M	"								
Gowh-30	M	"								
Gowh-32	F	"								
Gowh-45	M	"								
Gowh-47	F	"								
Gowh-48	M	"								
Gobf-220	M	"								
Gobf-444	M	"								
Gobf-449	F	"								
Gobf-450	M	"								
Gobf-451	M	"								
Gobf-452	M	"								
Gobf-453	F	"								
Gobf-221	F	"								
Gobf-212	F	"								
Gobf-218	M	"								
Gobf-219	F	"								
Gobf-217	M	"								
Gobf-215	M	"								
Gobf-222	M	"								
Gobf-438	M	"								
90/837	M	Chile								
90/525	F	"								
90/991	M	"								

Reactividad de sueros humanos correspondientes a pacientes con múltiples patologías. El signo (+) corresponde a la señal más intensa que la observada con lambda gt11 sin inserto.

recombinantes, se observó que los #1, #2 y #30 fueron los más reconocidos, siendo los porcentajes de detección 85%, 85% y 78%, respectivamente. Los antígenos #13 y #36 también fueron detectados por un alto porcentaje de sueros, siendo éste un 64% y un 69% de reconocimiento, respectivamente (Tabla 6). El resto de los antígenos (SAPA, #10, #26 y #54) fueron detectados en mucha menor proporción (Tabla 6). Un ejemplo de la respuesta más comunmente observada en sueros de la etapa crónica, se puede observar en la Figura 6. En resumen, estos últimos reconocieron en mayor proporción a los antígenos #1, #2 y #30, mientras que los de la etapa aguda reaccionaron casi exclusivamente con el antígeno SAPA, y en mucha menor proporción con los demás (Tablas 1-5 y Figura 6).

En el caso de los sueros correspondientes a la etapa crónica, se comparó la reactividad de éstos, hacia los antígenos recombinantes, considerando el lugar de origen. El 100% de los sueros de Brasil y el 89% de los sueros de Chile fue reconocido por uno o más de los antígenos recombinantes utilizados. Los antígenos #1, #2, #13, #26, #30 y #54 fueron reconocidos en proporciones muy similares por los sueros provenientes tanto de Chile como de Brasil (Tabla 6). La respuesta contra el antígeno #10 no fue analizada en detalle debido al bajo número de casos observados. Sin embargo, los antígenos SAPA y #36 sí presentaron diferencias. SAPA fue reconocido por el 58% de los sueros de Chile y por el 24% de los sueros de Brasil, mientras que el antígeno #36 fue reconocido por el 95% de los sueros de Chile y por el 54% de los sueros de Brasil (Tabla 6). En ambos casos, las diferencias observadas resultaron ser estadísticamente significativas ( $p$  menor que 0,005 para el antígeno SAPA y  $p$  entre 0,008 y 0,005 para el antígeno #36).



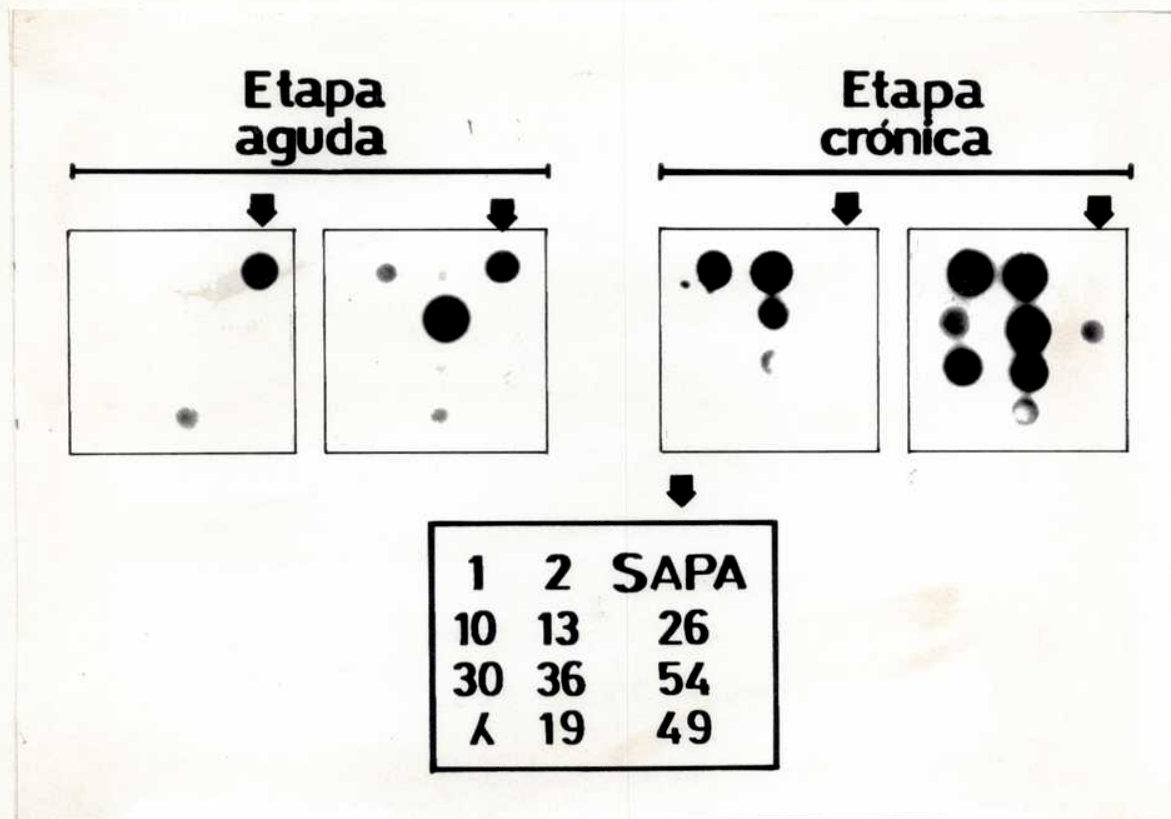
**Tabla 5** : Sueros de la enfermedad de Chagas correspondientes a pacientes sin sintomatología detectable.

SUERO	SEXO	ORIGEN	ANTIGENOS RECOMBINANTES								
			1	2	SAPA	10	13	26	30	36	54
Gobf-459	F	Brasil	+					+	+		+
Gowh-41	F	"	+					+			+
Gobf-476	F		+								
Gobf-473	M										
Gobf-297	M										
Gobf-461	F										
Gobf-467	F										
Gobf-465	F										
Gobf-466	F										
89/921	F	Chile									
89/1565	F	"									
90/1344	F										
90/1339	F										
89/1078	M										
89/1587	F										
89/1260	M										
90/712	F										
90/795	M										
90/1264	M										
90/1291	F										
89/1088	M										
90/711	F										
90/1093	F										
89/1250	M										
90/998	F										
89/1408	M										

Reactividad de sueros humanos correspondientes a pacientes sin sintomatología detectable. El signo (+) corresponde a la señal más intensa que la observada con lambda gt11 sin inserto.

**Tabla 6:** Resumen de los resultados obtenidos con los sueros de las etapas aguda y crónica de la enfermedad de Chagas

FASE DE LA ENFERMEDAD	ORIGEN	Nº DE SUEROS	SUEROS REACTIVOS (Nº Y %)	SUEROS REACTIVOS CON CADA UNO DE LOS ANTIGENOS RECOMBINANTES (Nº Y %)									
				#1	#2	SAPA	#10	#13	#26	#30	#36	#54	
Aguda	Brasil	48	48 (100%)	7 (14%)	1 (2%)	46 (96%)	0	22 (45%)	0	4 (8%)	16 (33%)	0	
				Crónica	Brasil y Chile	108	104 (96%)	92 (85%)	92 (85%)	39 (36%)	8 (7%)	69 (64%)	41 (38%)
Crónica	Brasil	70	70 (100%)	61 (87%)	58 (83%)	17 (24%)	1 (<1%)	45 (64%)	23 (33%)	55 (78%)	38 (54%)	12 (17%)	
				Crónica	Chile	38	34 (89%)	31 (81%)	34 (89%)	22 (58%)	7 (18%)	24 (63%)	18 (47%)



**Figura 6**

Reactividad, con las proteínas de fusión, de sueros correspondientes a las etapas aguda y crónica de la enfermedad de Chagas. λ indica lambda gt11 religado sin inserto. La flecha señala a SAPA.

**Tabla 7:** Sueros correspondientes a la etapa crónica de la enfermedad de Chagas agrupados según el sexo de los pacientes

SEXO	Nº DE SUEROS	REACTIVIDAD CON 1 ó MAS Ags (Nº Y %)	REACTIVIDAD DE LOS SUEROS CON ANTIGENOS RECOMBINANTES INDIVIDUALES (Nº Y %)								
			#1	#2	SAPA	#10	#13	#26	#30	#36	#54
M	59	57 (97%)	51 (86%)	51 (86%)	24 (41%)	4 (7%)	40 (68%)	26 (44%)	48 (81%)	42 (71%)	11 (18%)
F	49	47 (96%)	41 (84%)	41 (84%)	15 (31%)	4 (8%)	29 (59%)	16 (33%)	37 (75%)	33 (67%)	7 (14%)

M: Masculino

F: Femenino

También se compararon los resultados obtenidos para los sueros de la etapa crónica, considerando el sexo de los pacientes. En este caso no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los antígenos reconocidos por los sueros correspondientes a pacientes del sexo masculino y femenino (Tabla 7). En ambos casos, la proporción de sueros que reaccionaron con cada antígeno, fue similar a la observada al considerar la totalidad de los sueros crónicos (Tablas 6 y 7). Este análisis no se pudo realizar con los sueros de la etapa aguda ya que no se disponía de los datos referidos al sexo de los pacientes.

### **5 Análisis de sueros de pacientes con infección congénita**

Se analizaron sueros provenientes de diez recién nacidos congenitamente infectados, doce recién nacidos no infectados y sus madres correspondientes (Tablas 8 y 9). Los sueros de los infantes se tomaron a partir del cordón umbilical en el momento del nacimiento, excepto los casos 21 y 22, en los cuales los sueros se obtuvieron 2 días y 2 meses después del nacimiento respectivamente. En análisis previos, se había observado que todos los infantes congenitamente infectados presentaron niveles detectables de IgG contra *T. cruzi*; en seis de los diez casos se detectaron anticuerpos de tipo IgM contra el parásito y en todos se obtuvo un xenodiagnóstico con resultado positivo (Tabla 8). En cambio, todos los recién nacidos no infectados poseían anticuerpos de tipo IgG contra *T. cruzi* no presentaron anticuerpos de tipo IgM contra éste, y el xenodiagnóstico que se les aplicó resultó negativo (Tabla 9). También se observó que todas las madres de los niños congenitamente infectados presentaron niveles de IgM detectables por ELISA, mientras que

**Tabla 8:** Descripción de los recién nacidos congénitamente infectados y sus madres

CASO	NUMERO		TITULO IgG		TITULO IgM		XENODIAG	SINTOMAS
	SUERO	ORIGEN	ELISA	IFI	ELISA	IFI		
13	87/1710	CU	160	160	80		+(60d)	
	87/1711	M	1280	160	160			
14	87/1333	CU	640	1280	160	-	+(30d)	
	87/1329	M	1280	320	2000	10		
15	86/196	CU	1280	160	40	-	+(30d)	
	86/195	M	1280	1280	320	10		
16	88/2052	CU	640	320	2000		+(30d)	
	88/2235	M	16000	160	640			
17	88/280	CU	80	320	-		+(90d)	
	88/279	M	160	640	80			
18	88/169	CU	20	20	640		+(60d)	
	87/1718	M	1280	640	1280			
19	88/188	CU	160	160	-		+(30d)	
	88/147	M	32000	160	2000			
20	88/2215	CU	1280	20	-		+(90d)	
	88/1622	M	1280	160	80			
21	83/1015	RN	4000	80	-	-	+(30d)	
	83/1016	M	4000	320	640	20		
22	2E/43	RN	640	10	640	-	+(30d)	
	2E/44	M	2000	1280	320	40		

RN: Recién nacido

M: Madre

CU: Cordón umbilical

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

Los números entre paréntesis indican el tiempo (días) requeridos para obtener un diagnóstico positivo

**Tabla 9:** Descripción de los recién nacidos sanos y de sus madres con enfermedad de Chagas

CASO	NUMERO		TITULO IgG		TITULO IgM		XENODIAG	SINTOMAS
	SUERO	ORIGEN	ELISA	IFI	ELISA	IFI		
1	87/1887	CU	ND	80				
	87/1889	M	ND	160				
2	87/1413	CU	ND	80				
	87/1414	M	ND	160				
3	87/1928	CU	ND	80				
	87/1890	M	ND	160				
4	88/1986	CU	ND	640				
	88/1987	M	ND	160				
5	88/2001	CU	ND	160				
	88/1997	M	ND	320				
6	87/1332	CU	ND	160				
	87/1327	M	ND	80				
7	87/1417	CU	ND	80				
	87/1420	M	ND	160				
8	87/1701	CU	ND	80				
	87/1526	M	ND	320				
9	88/2000	CU	ND	160				
	88/2005	M	ND	320				
10	88/1883	CU	ND	320				
	88/1881	M	ND	320				
11	88/1840	CU	ND	320				
	88/1844	M	ND	640				
12	88/1410	CU	ND	160				
	87/1325	M	ND	320				

ND: No determinado

CU: Cordón umbilical

M: Madre

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

ninguna de las madres de los recién nacidos no infectados presentó este tipo de anticuerpos (Tablas 8 y 9).

Los antígenos recombinantes, obtenidos previamente en el laboratorio (Ibañez y col., 1987), se utilizaron para analizar la presencia de anticuerpos de tipo IgG e IgM específicos contra *T. cruzi* en los sueros de los infantes congenitamente infectados y sus respectivas madres. El procesamiento de los filtros se realizó tal como se describe en Materiales y Métodos; en este caso en lugar de usar proteína A se usaron anticuerpos anti IgM humana y anti IgG humana. En el caso de las madres, se observaron anticuerpos de tipo IgM sólo en dos de ellas, mientras que todas presentaron anticuerpos específicos de tipo IgG (Figura 7 y Tablas 10 y 11), siendo detectados en este último caso, los antígenos #1, #2, #13, #30 y #36 (Tablas 10 y 11). Esta es una respuesta característica de la etapa crónica de la enfermedad como ya se observó anteriormente (ver sección 4.2 de esta tesis). Cuando se analizaron los sueros de los diez recién nacidos con infección congénita, se pudo observar que ocho de ellos presentaron IgM específicas contra varias de las proteínas recombinantes de *T. cruzi* (Tablas 10 y 11 y Figura 7), lo cual confirmaría la infección activa detectada en el momento del nacimiento. Los anticuerpos más frecuentemente detectados estaban dirigidos contra SAPA (siete casos) y el antígeno #13 (cinco casos). En estos sueros también se detectaron anticuerpos de tipo IgG contra varios antígenos recombinantes (Tablas 10 y 11). Aunque en algunos casos, los anticuerpos de tipo IgG detectados estaban dirigidos hacia los mismos antígenos que los detectados por sus respectivas madres; en los sueros correspondientes a nueve de los diez recién nacidos congenitamente infectados se observaron, además, IgG específicas que no fueron detectadas en sus respectivas madres (Figura 7 y Tablas 10 y 12). En este caso la IgG





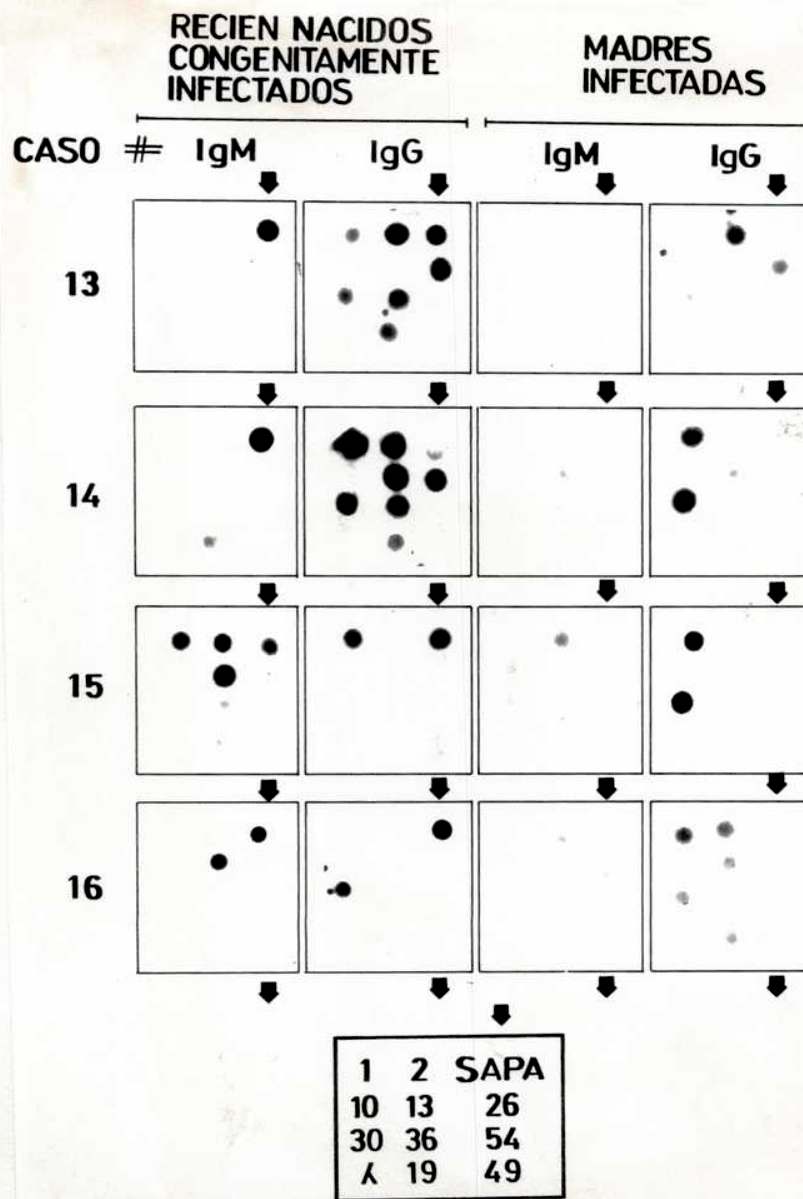
**Tabla 11:** IgM y IgG específicas detectadas en sueros de recién nacidos congénitos, sanos y sus correspondientes madres.

	SUEROS USADOS (Nº)	Igs	SUEROS POSITIVOS (Nº)	SUEROS REACTIVOS CON CADA ANTIGENO (Nº)									
				1	2	SAPA	10	13	26	30	36	54	19
Recién nacidos congénitos	10	IgM	8	2	1	7	0	5	0	0	0	0	1
Madres	10	IgM	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Recién nacidos congénitos	10	IgG	10	8	5	7	2	5	2	6	6	0	5
Madres	10	IgG	10	9	7	0	1	3	2	6	3	1	3
Recién nacidos sanos	12	IgM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Madres	12	IgM	4	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0
Recién nacidos sanos	12	IgG	12	10	11	1	2	10	1	7	7	0	6
Madres	12	IgG	12	10	11	1	2	11	4	7	8	2	7

**Tabla 12:** IgG específicas detectadas en sueros de recién nacidos congénitos y sanos y no detectadas en los sueros de sus respectivas madres.

	SUEROS USADOS (Nº)	SUEROS POSITIVOS* (Nº)	SUEROS REACTIVOS CON CADA ANTIGENO*									
			1	2	SAPA	10	13	26	30	36	54	19
Recién nacidos congénitos	10	9	1	2	7	1	2	1	2	4	0	3
Recién nacidos sanos	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* :IgG específicas detectadas en los sueros de los recién nacidos y no en los sueros de sus respectivas madres.



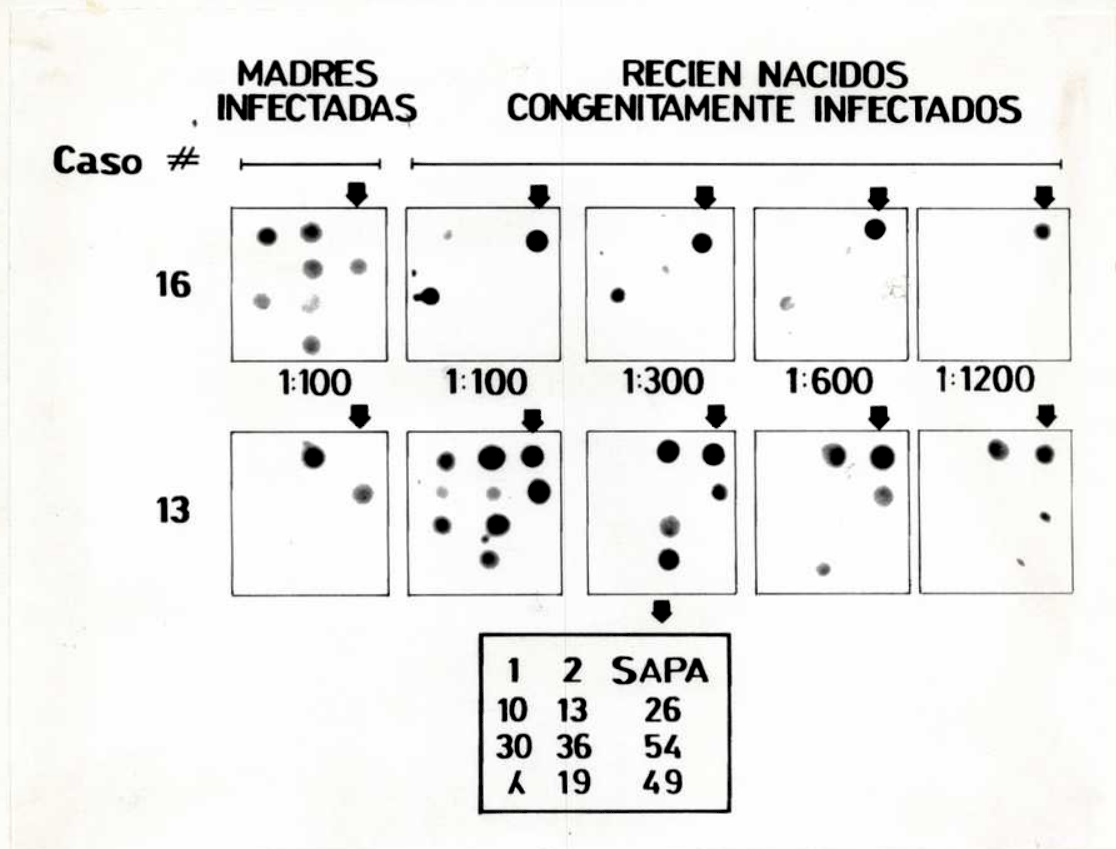
**Figura 7**

Anticuerpos específicos, de tipo IgG e IgM, presentes en sueros de recién nacidos con infección congénita y sus respectivas madres. λ indica lambda gt11 religado sin inserto. La flecha señala a SAPA.

específica, detectada con mayor frecuencia, estaba dirigida contra SAPA y se observó en siete de los casos analizados. También se detectaron, solamente en los recién nacidos congénitamente infectados, IgG específicas dirigidas contra los antígenos #36 (cuatro casos), #19 (tres casos), #2, #13 y #30 (2 casos cada uno) y contra los antígenos #1, #10 y #26 (un caso cada uno) (Tabla 12).

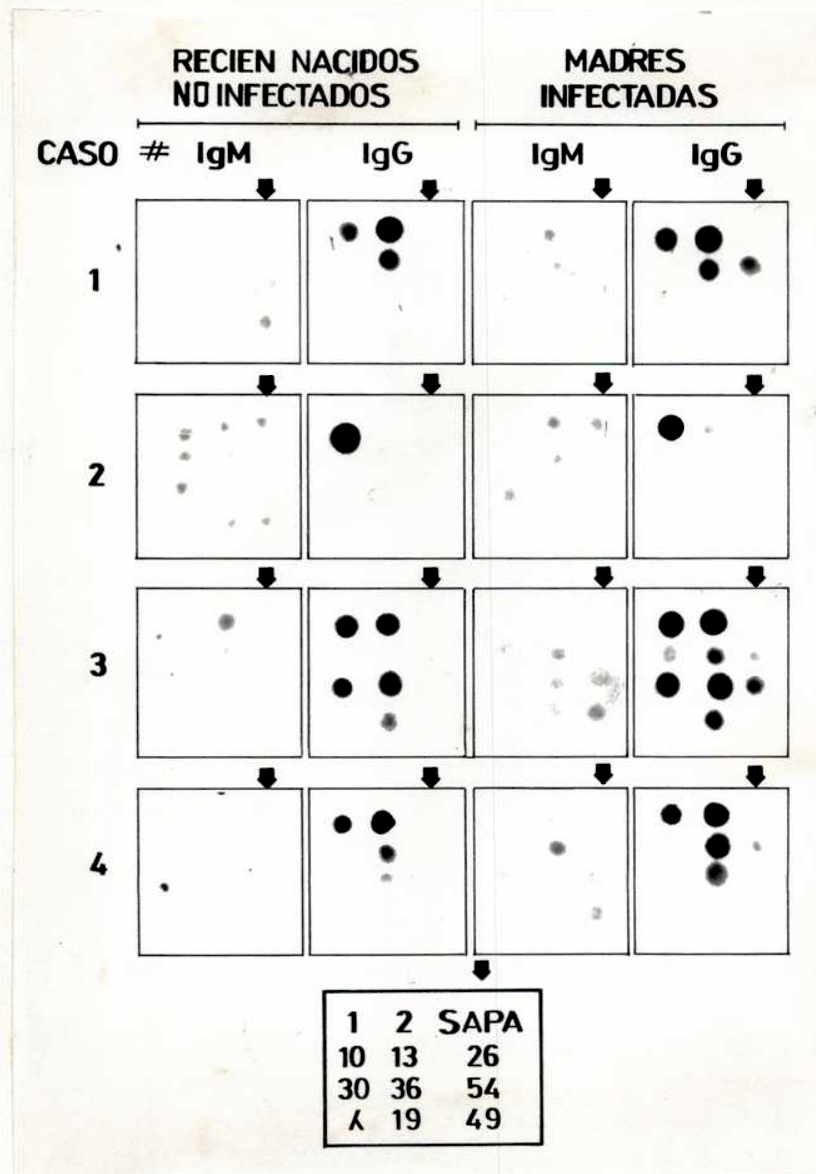
Se ha observado que los niveles de IgG4 contra los antígenos de Varicella-Zoister eran 1.64 veces más elevados en sangre de cordón umbilical que en la sangre materna (Asano y col., 1988). Debido a esto, la detección de IgG específicas, sólo en los sueros de los recién nacidos congénitamente infectados, podría atribuirse a una concentración más elevada de anticuerpos específicos en sangre de cordón umbilical que en la sangre de la madre correspondiente. Para estudiar esta posibilidad, se analizó la reactividad de distintas diluciones del suero de dos de los recién nacidos congénitamente infectados. No se trató de concentrar los sueros de las respectivas madres debido a que en experimentos previos se había podido determinar que la dilución 1:100 era la que permitía obtener los resultados más claros. En la Figura 8, se puede observar que los sueros de los infantes congénitamente infectados, diluïdos 1:100, 1:300, 1:600 y 1:1200, reconocen claramente al antígeno SAPA. En el caso número 13, también se observa señal contra el antígeno #19 hasta una dilución de 1:600 (Figura 8). Por otro lado, se puede ver que diluciones 1:100 de los sueros de sus respectivas madres no reconocían a esos antígenos.

También se analizó la presencia de anticuerpos específicos contra estos antígenos recombinantes en sueros de niños no infectados nacidos de madres con enfermedad de Chagas. Se pudo observar que ninguno de los sueros analizados, pertenecientes a los doce niños, presentó anticuerpos de tipo IgM contra los antígenos utilizados (Tablas 11 y 13). Este resultado era esperado y



**Figura 8**

Anticuerpos específicos de tipo IgG presentes en sueros de recién nacidos con infección congénita (varias diluciones) y sus respectivas madres (dilución 1:100). λ indica lambda gt11 religado sin inserto. La flecha señala a SAPA.



**Figura 9**

Anticuerpos específicos, de tipo IgG e IgM, presentes en sueros de recién nacidos no infectados y sus respectivas madres con enfermedad de Chagas. λ indica lambda gt 1 1 religado sin inserto. La flecha señala a SAPA.







confirmó la ausencia de infección, lo cual había sido diagnosticado previamente por serología convencional (IFI, ELISA) y por xenodiagnóstico (Tabla 9). Todos los recién nacidos no infectados presentaron anticuerpos específicos de tipo IgG similares a aquellos presentes en el suero de sus respectivas madres (Figura 9 y Tablas 11 y 13). A diferencia de lo observado en los recién nacidos congenitamente infectados, todos los anticuerpos detectados en los recién nacidos no infectados, también fueron detectados en los sueros de sus madres correspondientes (Figura 9 y Tablas 12 y 13). En algunos casos se detectaron anticuerpos de tipo IgG, contra los antígenos recombinantes, en el suero de la madre pero no en el suero del recién nacido correspondiente (Tabla 13). Este resultado fue observado tanto en las madres que tuvieron niños con infección congénita, como en aquellas que tuvieron hijos no infectados (Tablas 10 y 13). Esto podría deberse a una transferencia diferencial de anticuerpos de tipo IgG a través de la placenta, o variaciones en cuanto al momento en que se produjo la infección.

## **6 Análisis de sueros provenientes de pacientes sometidos a tratamiento quimioterapéutico**

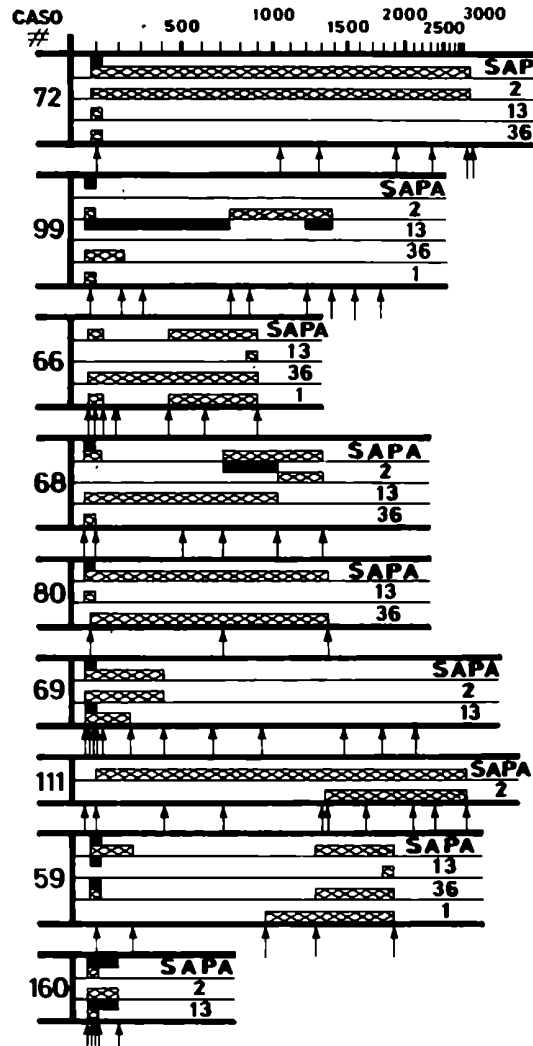
Se realizó el análisis de sueros obtenidos de pacientes con enfermedad de Chagas, cuya detección fuera llevado a cabo durante la etapa aguda de la misma. Estos pacientes fueron sometidos a un tratamiento quimioterapéutico, con benznidazol, inmediatamente después de diagnosticada la enfermedad y, posteriormente, se realizaron extracciones de sangre en forma periódica para determinar la efectividad del tratamiento previamente realizado. Los sueros obtenidos fueron sometidos a tests serológicos convencionales (IFI, ELISA)

para determinar la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* también se realizaron xenodiagnósticos en forma periódica, a cada uno de los pacientes, para determinar la presencia de anticuerpos circulantes. A partir de estos análisis se determinó la existencia de dos grupos de pacientes, un grupo sensible y otro resistente al tratamiento con benznidazol. Todas estas muestras, previamente analizadas, fueron enviadas a nuestro laboratorio en forma codificada para que se estudiara la presencia de anticuerpos específicos contra antígenos recombinantes de *T. cruzi*

En primer lugar se analizaron las muestras correspondientes a los nueve pacientes tratados con benznidazol que fueron considerados resistentes al tratamiento, ya que la serología convencional seguía siendo positiva y presentaban al menos un xenodiagnóstico positivo. En todos los casos se trató de determinar la presencia de anticuerpos de tipo IgG y de tipo IgM contra los antígenos recombinantes. Para analizarlos se utilizaron ocho clones recombinantes de *T. cruzi*. Todos los sueros presentaron anticuerpos contra los diferentes antígenos, sin embargo los clones #10, #26 y #30 fueron detectados por muy pocos sueros. Debido a esto, no se incluyen en el resumen de resultados que se muestra en la Figura 10. En ésta se usó una barra continua para unir las muestras de suero que resultaron ser positivos para un antígeno en particular. Algunas muestras no se encontraban disponibles en el momento de este estudio, por lo tanto no fue posible determinar la fecha exacta en que se produjo la aparición o desaparición de anticuerpos contra diferentes antígenos.

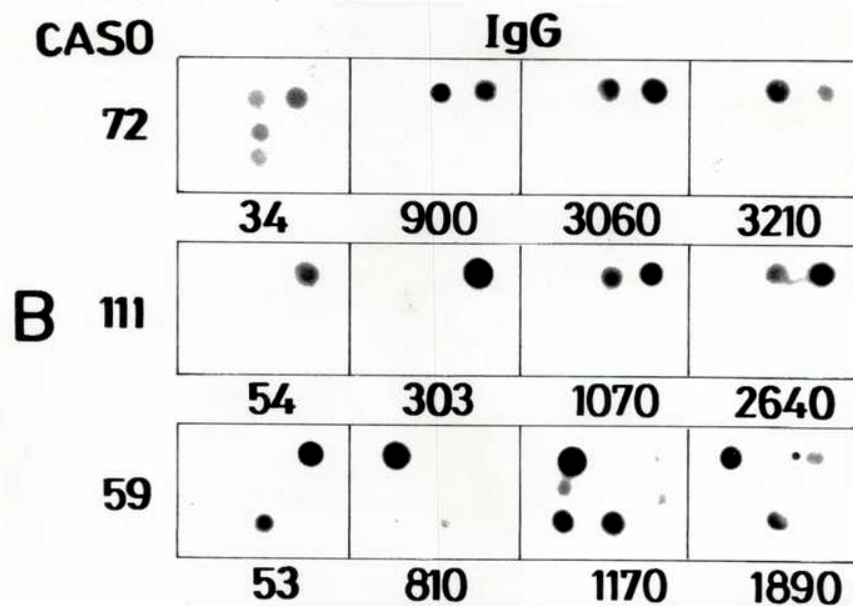
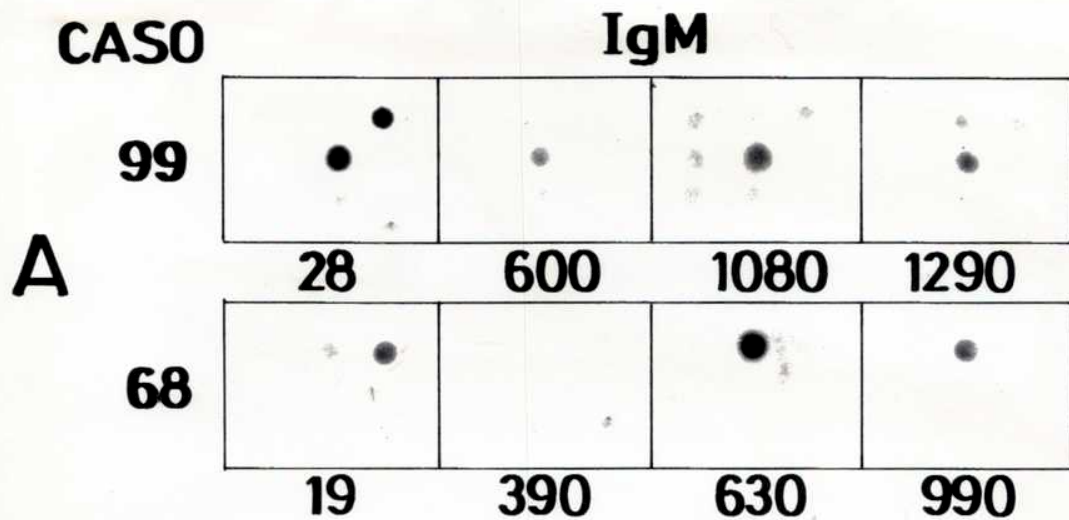
Se pudo observar que ocho de las nueve muestras colectadas durante la fase aguda de la enfermedad, y previas al tratamiento quimioterapéutico, presentaron anticuerpos específicos, de tipo IgM, contra los antígenos

**DIAS POSTERIORES A LA APARICION DE SINTOMAS AGUDOS (escala log.)**



**Figura 10**

Resumen de los resultados obtenidos a partir del análisis de sueros, correspondientes a casos resistentes al tratamiento quimioterapéutico. Los sueros se colectaron antes (primera flecha de cada caso) y después del tratamiento (mostrado por flechas debajo de cada caso). Las barras negras y blancas indican la presencia de anticuerpos de tipo IgM e IgG, respectivamente. Algunas barras no son continuas debido a que un suero, en el medio del seguimiento a lo largo del tiempo, era negativo.



1	2	SAPA
10	13	26
30	36	λ

**Figura 11**

Anticuerpos específicos de tipo IgM (A) e IgG (B) presentes en casos de enfermedad de Chagas resistentes al tratamiento quimioterapéutico. Los sueros, colectados los días indicados, se hicieron reaccionar con un panel de antígenos recombinantes distribuidos como se muestra debajo de la figura. Se tomaron como positivas las señales mas fuertes que el lambda gt11 sin inserto ( $\lambda$ ).

recombinantes del parásito, y estaban dirigidos fundamentalmente contra SAPA (Figuras 10 y 11A). Este resultado coincide con el obtenido previamente, donde este antígeno también fue el más detectado en sueros provenientes de recién nacidos congénitamente infectados (ver sección 5). Aparentemente, las IgM tendrían un período corto de permanencia, excepto en dos casos (Figura 10 y 11A). En el caso número 99 se pudieron detectar anticuerpos de tipo IgM contra el antígeno 13 desde el principio de la infección hasta alrededor de los cuatro años post-infección. En el caso número 68, los anticuerpos de tipo IgM contra el antígeno #2 fueron observados luego de dos años de la aparición de los síntomas de la enfermedad y aparentemente permanecieron durante un año; momento en el cual aparecieron anticuerpos de tipo IgG contra este mismo antígeno.

Los anticuerpos de tipo IgG se observaron en todos los seguimientos, a lo largo del tiempo, de los pacientes (Figuras 10 y 11A). Es interesante observar que, tanto la aparición como la permanencia a lo largo del tiempo de los anticuerpos de tipo IgG contra todos los antígenos probados fue muy heterogénea entre los pacientes. Por ejemplo, anticuerpos de tipo IgG contra el antígeno #2 puede ser detectado desde el principio de la infección o ya bastante avanzada ésta; puede durar varios años o volverse indetectable enseguida. Algo muy similar puede observarse con las IgG específicas contra los antígenos #1, #13 y #36 (Figura 10). En siete de los nueve pacientes con infección resistente al tratamiento, se pudieron detectar respuestas de tipo IgG contra estos antígenos. Sin embargo se pudo observar que en sueros correspondientes a los casos número 99 y 69, luego de un determinado tiempo dejaron de observarse anticuerpos específicos contra los antígenos recombinantes (Figura 10). En el caso número 99 tanto la serología

convencional como los xenodiagnósticos continuaban siendo positivos, lo cual indicaría que el paciente permanecía infectado. Una posible explicación para estos resultados, podría ser que el paciente presente anticuerpos dirigidos hacia otros antígenos que no estuvieran incluidos en este estudio, como sugerirían los resultados obtenidos posteriormente con Western blot de proteínas liberadas por el parásito (Jazin y col., 1991). Por otro lado, el caso número 69 es considerado "borderline" por serología convencional ya que los sueros del paciente colectados a lo largo del tiempo luego del tratamiento, fueron negativos o debilmente positivos. Debido a que estos sueros tampoco reaccionaron con Western blots de proteínas liberadas por el parásito (Jazin y col., 1991), estos resultados podrían sugerir que este paciente, habría sido curado, desde el punta de vista parasitológico, luego del tratamiento.

El otro grupo de sueros estudiado, fue obtenido de siete pacientes que fueron considerados parasitológicamente curados. Esto se considera de esta manera ya que, luego del tratamiento con benznidazol, las reacciones serológicas convencionales arrojaron resultados negativos y además, los xenodiagnósticos realizados a lo largo del tiempo fueron negativos. También se utilizaron los antígenos recombinantes para analizar los sueros de estos pacientes. En la Figura 12, se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos, los cuales se encuentran resumidos en la Tabla 14. En ésta, también se muestra la fecha en que los sueros dejaron de presentar respuesta positiva contra *T. cruzi* usando reacciones serológicas convencionales (IFI, ELISA). En todos los casos analizados se puede observar que las muestras tomadas durante la fase aguda de la enfermedad, y previa al tratamiento con benznidazol, presentaban anticuerpos de tipo IgG y de tipo IgM contra antígenos específicos del parásito (Tabla 14 y Figura 12). Los anticuerpos de tipo IgM se observaron en seis de

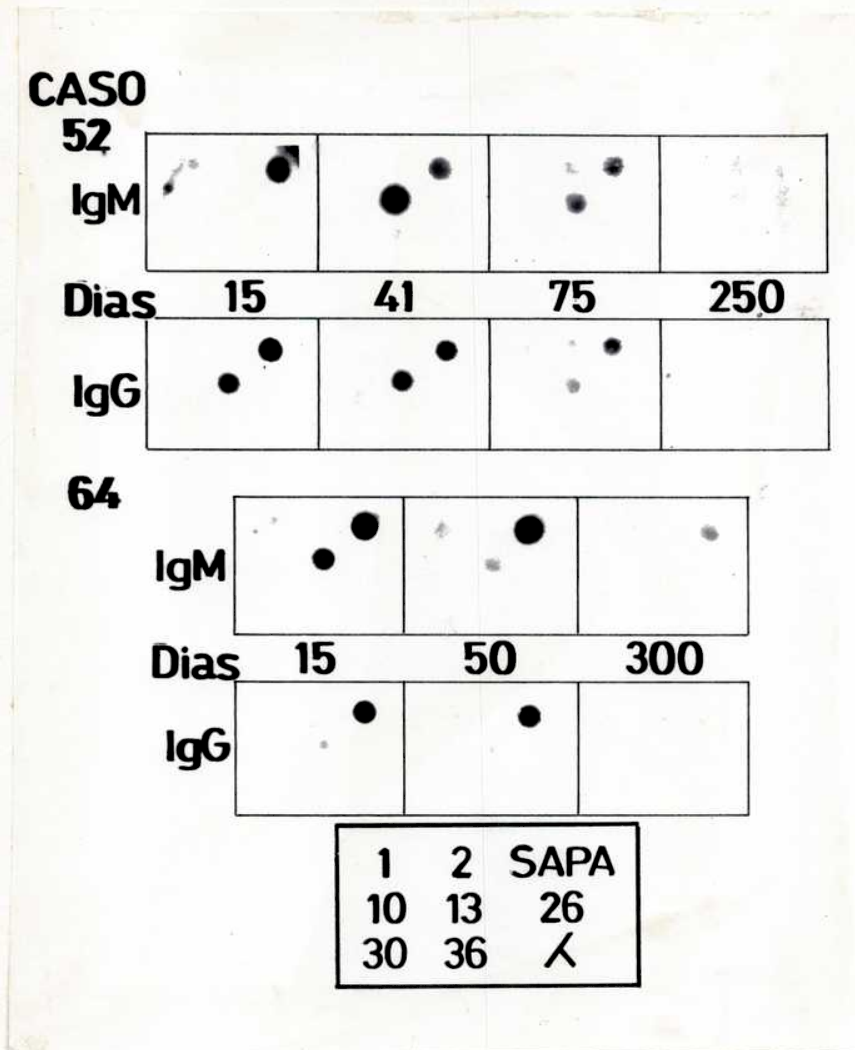


Figura 12

Anticuerpos específicos de tipo IgM e IgG presentes en casos de enfermedad de Chagas sensibles al tratamiento quimioterapéutico. Los sueros, colectados los días indicados, se hicieron reaccionar con un panel de antígenos recombinantes distribuidos como se muestra debajo de la figura. Se tomaron como positivas las señales mas fuertes que las del lambda gt11 sin inserto (λ).



**Tabla 14:** Reactividad con los proteínas recombinantes de *T. cruzi* de los sueros de los seguimientos, a lo largo del tiempo, de casos agudos de la Enfermedad de Chagas sensibles al tratamiento quimioterapéutico .

<b>Caso</b>	<b>Días p.a.s.a.</b>	<b>IgMs</b>	<b>IgGs</b>	<b>Días n.s.c</b>
#47	75 180, 810, 1290, 1590 y 2310	SAPA, 13 Negativo	SAPA, 13, 36 Negativo	2310
#48	11 180, 270, 360 y 630	SAPA, 13 Negativo	SAPA, 1 Negativo	180
#49	22 900, 1170 y 2850	SAPA, 36 Negativo	SAPA, 13, 36 Negativo	900
#52	15 41 75 250, 690, 1050 y 1680	SAPA SAPA, 13 SAPA, 2, 13 Negativo	SAPA, 13 SAPA, 13 SAPA, 2,13 Negativo	690
#53	25, 53 y 66 96, 185, 510 y 1230	Negativo Negativo	SAPA, 1, 13 Negativo	510
#64	15 y 50 300, 660, 1920 y 2460	SAPA, 13 Negativo	SAPA Negativo	660
#71	29 80 360, 570, 690, 780 y 2910	SAPA Negativo Negativo	SAPA, 1, 36 SAPA, 1, 13, 36 Negativo	780

**p.a.s.a.:** posteriores aparición de síntomas agudos

**n.s.c.:** negativización por serología convencional

Los sueros de cada paciente se hicieron reaccionar con los antígenos recombinantes de *T. cruzi*. Se indica el día en que fue tomada cada muestra, así como también los antígenos detectados por IgG o IgM en cada muestra de suero. Para cada paciente se indican los días en los cuales se obtuvo una negativización serológica completa por serología convencional.

los siete casos analizados. Todos los sueros positivos presentaron anticuerpos de tipo IgM e IgG contra SAPA, y también, aunque con menor frecuencia, contra los antígenos #13 y #36 (Tabla 14). Esto coincide con lo observado anteriormente en sueros correspondientes a casos agudos (sección 4.2 de esta tesis). Al poco tiempo de finalizado el tratamiento con benznidazol, los sueros de los pacientes dejaron de reconocer a los antígenos recombinantes usados. La fecha exacta en la cual dejaron de detectarse los anticuerpos no se pudo establecer ya que, desafortunadamente, no se encontraban disponibles algunas muestras del seguimiento de los pacientes analizados. Sin embargo, los resultados muestran que la desaparición, en los sueros, de anticuerpos específicos contra los clones recombinantes, se produciría alrededor de los días 180, 96 y 250, posteriores a la aparición de los síntomas agudos (Tabla 14). Si comparamos estos resultados con los obtenidos con los tests serológicos convencionales, se puede observar que con estos últimos la desaparición de anticuerpos contra *T. cruzi*, en los sueros, se observa mucho más tarde (última columna de la Tabla 14).

## **7 Análisis de sueros de pacientes con diferentes patologías.**

El propósito del presente estudio fue tratar de determinar la existencia de un reconocimiento diferencial de los antígenos recombinantes, por parte de los sueros de pacientes, con enfermedad de Chagas, que presentaron diferentes patologías. Para determinar esto se procedió a analizar la reactividad de estos sueros, divididos en cuatro grupos, con los diferentes antígenos recombinantes. Un grupo se formó con sueros de dieciocho pacientes chagásicos cuyo único síntoma detectable fuera cardíaco; otro grupo se formó con sueros de

veintiocho pacientes chagásicos, en los cuales sólo fueran detectados síntomas digestivos, ya fuera megaesófago o megacolon; el tercer grupo se constituyó con sueros de treinta y seis pacientes chagásicos que presentaran más de un síntoma (megaesófago-megacolon o megaesófago-cardiopatía o megacolon-cardiopatía o megaesófago-megacolon-cardiopatía) y el cuarto grupo se formó con sueros de veintiséis pacientes con enfermedad de Chagas que no poseían síntomas detectables.

Los resultados obtenidos para cada uno de los grupos se muestran en las Tablas 2, 3, 4 y 5. A partir de estos resultados se calculó tanto el número de sueros como el porcentaje de éstos que, en cada grupo, reaccionaba con cada antígeno recombinante (Tabla 15). Los sueros de pacientes, pertenecientes al grupo con síntomas exclusivamente cardíacos, detectaron, fundamentalmente, a los clones #1, #2, #13, #30 y #36; mientras que el resto de los clones fue detectado en menor proporción (Tablas 2 y 15). Los antígenos reconocidos principalmente por los sueros del grupo con síntomas digestivos fueron los #1, #2, #13, #30, y #36 (Tablas 3 y 15). Se obtuvo un resultado similar para el grupo que presentó sintomatología múltiple, y también para el que no poseía síntomas detectables (Tablas 4, 5 y 15). Los porcentajes obtenidos en cada grupo, para cada uno de los clones, se corresponden con los obtenidos para la totalidad de los sueros de la etapa crónica (Tablas 6 y 15). Un resultado similar se observa al tomar en conjunto los resultados de todos los grupos que presentaron sintomatología (Tabla 16). Al comparar estos resultados con los del grupo que no presentó síntomas, se ve que no hay grandes diferencias en cuanto a los porcentajes de reactividad obtenidos contra los clones, excepto para SAPA (Tabla 16). Sin embargo, al realizar un análisis estadístico (Bancroft, 1960), se vio que la diferencia obtenida no era estadísticamente significativa.

**Tabla 15:** Sueros de pacientes, correspondientes a la etapa crónica de la enfermedad de Chagas, agrupados según la patología que presentaron.

PATOLOGIA	Nº DE SUEROS	SUEROS REACTIVOS (Nº Y %)	SUEROS REACTIVOS CON CADA UNO DE LOS ANTIGENOS RECOMBINANTES (Nº Y %)								
			*1	*2	SAPA	*10	*13	*26	*30	*36	*54
Cardíaca	18	18 (100%)	17 (94%)	17 (94%)	8 (44%)	4 (22%)	14 (77%)	11 (61%)	13 (72%)	14 (83%)	5 (28%)
Digestiva	28	27 (96%)	25 (89%)	25 (89%)	8 (28%)	3 (11%)	18 (64%)	8 (28%)	24 (86%)	19 (68%)	5 (18%)
Múltiple	36	36 (100%)	29 (80%)	29 (80%)	9 (25%)	0	21 (58%)	14 (39%)	28 (78%)	24 (67%)	4 (11%)
Sin patología	26	23 (88%)	21 (81%)	21 (81%)	14 (54%)	1 (4%)	16 (61%)	8 (31%)	20 (77%)	17 (65%)	4 (15%)

**Tabla 16:** Sueros de pacientes, correspondientes a la etapa crónica de la enfermedad de Chagas, agrupados según la presencia o ausencia de patología.

	Nº DE SUEROS	SUEROS REACTIVOS (Nº Y %)	SUEROS REACTIVOS CON CADA UNO DE LOS ANTIGENOS RECOMBINANTES (Nº Y %)								
			*1	*2	SAPA	*10	*13	*26	*30	*36	*54
Con patología	82	81 (99%)	71 (86%)	71 (86%)	25 (30%)	7 (8%)	53 (65%)	33 (40%)	65 (79%)	57 (69%)	14 (17%)
Sin patología	26	23 (88%)	21 (81%)	21 (81%)	14 (54%)	1 (4%)	16 (61%)	8 (31%)	20 (77%)	17 (65%)	4 (15%)

También se compararon entre sí los resultados obtenidos en cada grupo que presentaba patologías, esto es: cardiopatía vs. patología digestiva, cardiopatía vs. patología múltiple y patología digestiva vs. patología múltiple. En ningún caso se pudieron encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos, dentro de cada grupo, para cada clon analizado (Tabla 15).

Finalmente se compararon los resultados de cada grupo con patología, con el grupo de sueros de pacientes sin síntomas detectables, esto es: cardiopatía vs. asintomáticos, patología digestiva vs. asintomáticos, patología múltiple vs. asintomáticos. En estos casos, tampoco se hallaron diferencias significativas, entre los resultados obtenidos para cada clon analizado (Tabla 15).

## **8 Análisis de sueros de personas no infectadas con *T. cruzi***

Los antígenos comunmente usados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, generalmente son una mezcla compleja de moléculas obtenida a partir de parásitos enteros o fracciones de los mismos (Camargo y col., 1979). Esta mezcla tan heterogénea a menudo ocasiona la aparición de falsos positivos y reacción cruzada con otras enfermedades, principalmente leishmaniasis (Kirchhoff y col., 1987). Una manera de solucionar este problema podría ser el uso de antígenos definidos obtenidos, a partir de tecnología de ADN recombinante.

El propósito de este estudio fue determinar si los antígenos recombinantes (Ibañez y col, 1987), eran reconocidos por sueros de personas no infectadas y por personas con leishmaniasis. Para esto se analizaron sueros de diecisiete personas no infectadas, de los cuales trece fueron obtenidos en

**Tabla 17:** Sueros correspondientes a pacientes con leishmaniasis y a personas no infectadas

SUEROS PERTENECIENTES A:	ORIGEN	Nº SUEROS PROBADOS	Nº SUEROS REACTIVOS CON LOS ANTIGENOS RECOMBINANTES
Pacientes con leishmaniasis	Brasil	12	0
Personas no infectadas	Brasil	13	0
Personas no infectadas	Chile	4	0

Brasil y cuatro en Chile. También se analizaron sueros de doce personas con leishmaniasis. En ningún caso se observó reconocimiento de los antígenos recombinantes por parte de los sueros analizados (Tabla 17).

## **9 Análisis de la respuesta humoral murina**

### **9.1 Antecedentes y objetivos**

Durante la fase aguda, en infecciones humanas, se pudo detectar una respuesta humoral, fundamentalmente dirigida contra el antígeno SAPA (Tabla 6). Durante el transcurso de la infección, se observó un cambio en la especificidad humoral, ya que los anticuerpos, durante la etapa crónica, reconocieron, fundamentalmente, a los antígenos #1, #2 y #30 (Tabla 6). Existen diferentes posibilidades que podrían explicar estos resultados: i) la existencia de subpoblaciones de parásitos capaces de expresar diferentes antígenos, y que sean seleccionados por presiones del sistema inmune del huésped, ii) cambios en la expresión de antígenos parasitarios a distintos tiempos, posteriores a la infección o iii) que el mismo parásito sea capaz de expresar los antígenos, característicos de ambas etapas de la enfermedad, desde el principio de la infección y que los anticuerpos aparezcan a distintos tiempos post-infección. Sin embargo, al analizar la expresión de antígenos por parte del parásito, se observó que, en superficie, cada célula expresaba simultáneamente los antígenos #1, SAPA y #30 (Leguizamón y col., 1991). Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando parásitos obtenidos de sangre de ratón; debido a esto, durante esta etapa del trabajo se procedió a analizar la respuesta humoral murina, para poder determinar la existencia de alguna correlación entre ésta y los antígenos expresados por el parásito y ,



eventualmente, realizar una comparación con la respuesta observada en humanos. Para ésto, se utilizaron sueros provenientes de diferentes cepas de ratones infectados con distintas cepas y aislamientos de parásitos.

### **9.2 Infección de diferentes cepas de ratones con distintas cepas y aislamientos de parásitos**

Se analizó la respuesta humoral de diferentes cepas murinas; las cepas de ratones Rockland, Balb/cj, C56BL/6J y C3H/HeJ fueron infectadas con la cepa RA de parásitos. Los tiempos post-infección analizados fueron variables pero ninguno posterior a los 90 días (Tabla 18). Lo que se pudo observar es que los anticuerpos más frecuentemente detectados estaban dirigidos contra el antígeno recombinante SAPA y, en menor proporción, contra el antígeno #13 (Tabla 18). Para determinar si este resultado era una característica de la cepa de parásitos utilizada, se analizaron sueros de la cepa murina Swiss infectada con distintos aislamientos y cepas de *T. cruzi*. En este caso, los sueros post-infección analizados, provenían de tiempos más cortos de infección, ya que ninguno excedió los 30 días. En la Tabla 18 se puede observar que en este caso, nuevamente los anticuerpos más frecuentemente detectados, están dirigidos contra el antígeno SAPA. Sólo en dos casos se detectaron anticuerpos contra el antígeno #13 (21 días post-infección con cepa CA-1 y 30 días post-infección con aislamiento G2). En algunos sueros no se detectaron anticuerpos contra los antígenos recombinantes, pero como en todos los casos correspondió a la muestra tomada a los 15 días post-infección, es probable que se deba a un problema de tiempo necesario para que el sistema inmune pueda producir una respuesta contra la infección.

**Tabla 18:** Anticuerpos específicos presentes en sueros de distintas cepas de ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*

CEPA DE RATON	CEPA DE PARASITO	DIAS P.I.	ANTIGENO RECOMBINANTE					
			1	2	SAPA	13	30	36
ROCKLAND	RA	21	-	-	+	+	-	-
	RA	90	-	-	+	-	-	-
SWISS	Tul	15	-	-	+	-	-	-
	Tul	27	-	-	+	-	-	-
	TCC	15	-	-	+	-	-	-
	TCC	30	-	-	+	-	-	-
	G8	15	-	-	-	-	-	-
	G8	30	-	-	+	-	-	-
	G9	15	-	-	+	-	-	-
	G9	30	-	-	+	-	-	-
	G1	15	-	-	-	-	-	-
	G1	30	-	-	+	-	-	-
	G2	15	-	-	-	-	-	-
	G2	30	-	-	+	+	-	-
	CA1	21	-	-	+	+	-	-
Balb/cj	RA	26	-	-	+	-	-	-
	RA	90	-	-	+	-	-	-
C56BL/6j	RA	30	-	-	+	+	-	-
C3H/He j	RA	50	-	-	+	+	-	-

P.I: post-infección

Estos resultados muestran que, a pesar de la diversidad de cepas de ratones y de parásitos utilizados; de que algunas cepas murinas sean sensibles o resistentes a la infección con *T. cruzi*; los anticuerpos más frecuentemente detectados están dirigidos contra el antígeno recombinante SAPA y, en menor proporción, contra la proteína #13.

### **9.3 Estudio de la respuesta humoral murina a diferentes tiempos post-infección**

El análisis realizado previamente se llevó a cabo utilizando sueros obtenidos al poco tiempo de producida la infección; por lo tanto, para determinar si ésta era la causa de los resultados obtenidos, se analizaron sueros provenientes de un seguimiento, a lo largo del tiempo, de ratones infectados con *T. cruzi*. La cepa murina utilizada en este caso fue Swiss y las cepas de parásitos fueron Tul y TCC. En el caso de los ratones Swiss infectados con la cepa Tul, los anticuerpos más frecuentemente detectados, entre los días 15 y 547 posteriores a la infección, estaban dirigidos hacia el antígeno SAPA (Tabla 19). Cuando se utilizó otra cepa de parásitos para infectar a los ratones, nuevamente los anticuerpos más frecuentes detectaban a SAPA hasta el día 371 posterior a la infección (Tabla 19). Sólo se detectaron anticuerpos contra otros antígenos en las muestras correspondientes a los días 390 y 547 posteriores a la infección con la cepa Tul, donde se detectan anticuerpos contra los antígenos #1 y #13 y contra el antígeno #13 respectivamente. También se detectaron anticuerpos contra la proteína #13 a los 180 días posteriores a la infección con TCC (Tabla 19). Estos resultados indicarían que, en el modelo experimental murino, SAPA sería la proteína más antigénica. Esto sugiere que, dentro de este modelo experimental, y entre todos los antígenos probados,

**Tabla 19:** Anticuerpos específicos presentes a diferentes períodos post-infección en ratones.

CEPA DE PARASITOS	DIAS P.I	ANTIGENO RECOMBINANTE					
		1	2	SAPA	13	30	36
Tul	15	-	-	+	-	-	-
	27	-	-	+	-	-	-
	49	-	-	+	-	-	-
	97	-	-	+	-	-	-
	150	-	-	+	-	-	-
	157	-	-	+	-	-	-
	184	-	-	+	-	-	-
	360	-	-	+	-	-	-
	390	+	-	+	+	-	-
	547	-	-	+	+	-	-
TCC	15	-	-	+	-	-	-
	30	-		+	-	-	-
	60	-		+	-	-	-
	136	-		+	-	-	-
	180	-	-	+	+	-	-
	371	-	-	+	-	-	-

P.I.: Post-infección

SAPA sería el principal antígeno. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que existan otras moléculas importantes desde el punto de vista antigénico, que no estén incluidas en este grupo. Para confirmar que SAPA era la principal molécula antigénica, dentro de este modelo experimental, se tomó suero correspondiente a 30 días post-infección de un ratón Swiss con la cepa TCC de *T. cruzi* y se usó para realizar una búsqueda inmunológica en una genoteca de expresión del parásito (Ibañez y col., 1987). De  $2 \times 10^5$  fagos  $\lambda$ gt11 recombinantes analizados, se obtuvieron ocho clones que reaccionaban con el suero usado para realizar la búsqueda inmunológica. Estos ocho clones dieron una señal positiva cuando se los hibridó con una sonda de ADN, específica para SAPA. De esta manera, SAPA fue el antígeno recombinante que se obtuvo con mayor frecuencia, a partir de una genoteca de expresión de *T. cruzi*, cuando se llevó a cabo una búsqueda inmunológica con un suero proveniente de un ratón infectado.

**DISCUSSION**

## **10 Análisis de especificidad de anticuerpos policlonales contra SAPA**

Utilizando el suero de un paciente, correspondiente a la etapa crónica de la enfermedad de Chagas, se lograron aislar varios clones que codifican para antígenos de *T. cruzi* (Ibañez y col., 1987). Estos genes fueron secuenciados y, analizando su secuencia, se observó que la mayoría de ellos poseía una estructura formada por unidades repetidas de aminoácidos, dispuestas en tandem (Ibañez y col., 1988). En primer lugar, se produjeron proteínas de fusión, las cuales se usaron para inmunizar conejos y, de esta manera, obtener anticuerpos policlonales contra los antígenos recombinantes. Todos los anticuerpos policlonales producidos, excepto uno, reconocieron específicamente al antígeno recombinante que había sido usado para la inmunización (Ibañez, 1989). Sin embargo, el suero obtenido a partir de la inmunización con el antígeno SAPA también reconoció a la proteína recombinante #36. La reactividad cruzada, observada para el suero de conejo anti SAPA, contra el antígeno #36, también se había observado, previamente, con anticuerpos obtenidos de sueros de conejo infectados con la cepa AWP de *T. cruzi* (Ibañez, 1989). Es probable que esta respuesta haya sido generada por la presencia de epitopes comunes a ambos antígenos, como por ejemplo, el definido por la secuencia de aminoácidos PVD (Figuras 4A y 4B). Cabe destacar que cuando se sintetizó un oligopéptido SAPA que no contenía esta secuencia de aminoácidos, el suero de conejo obtenido a partir de la inmunización con éste, no reaccionó con el antígeno recombinante #36 (Figura 3A). También sería factible que la disposición espacial adoptada por la proteína

recombinante SAPA, determine un epítope conformacional, que induzca la generación de anticuerpos que reaccionen, en forma cruzada, con algún epítope del antígeno #36. El péptido sintético SAPA, sólo contiene dos de las estructuras repetidas (Fig 4C), mientras que la proteína recombinante posee alrededor de catorce. Es probable, entonces, que el número de estructuras repetidas usado para construir el péptido sintético, no sea suficiente para permitir la formación de ese hipotético epítope conformacional; de esta manera, tampoco se generarían los anticuerpos que reaccionen en forma cruzada con el antígeno #36 y, en este caso, la secuencia de aminoácidos PVD no estaría involucrada en la reacción cruzada observada entre ambos antígenos. Como se mencionó anteriormente, estos genes poseen estructuras con unidades repetidas de aminoácidos (Ibañez y col., 1988); es probable que este tipo de estructura tenga un papel importante en la evolución de proteínas, especialmente en el caso de polipéptidos que deben adaptarse a situaciones de rápida evolución, como la relación entre el huésped y el parásito. Las proteínas que contienen estructuras repetidas son, por lo general, muy antigénicas. En el caso de malaria, se han estudiado un gran número de antígenos con repeticiones y se ha podido demostrar que la mayoría de la respuesta inmune generada en el huésped, por la infección con *Plasmodium*, está dirigida contra epítopes de las regiones repetidas (Kemp y col., 1987). Este tipo de estructuras altamente repetidas parecería ser altamente inmunogénico, y es probable que estos antígenos se encuentren compitiendo contra respuestas inmunes del huésped que producen protección. En esta situación, mecanismos como la duplicación génica y la dispersión de mutaciones en regiones repetitivas aumentarían esta competencia y permitirían la formación de una cortina de humo. En este modelo, formulado originalmente para malaria (Kemp y col.,



1987), se propone que este tipo de antígenos ayudarían a camuflar al parásito del sistema inmune del huésped, provocando una hiperestimulación de células B con especificidades irrelevantes, disminuyendo así la efectividad de la respuesta contra epítopos críticos. La competencia que resulta de presentar al sistema inmune una gran cantidad de antígenos con repeticiones altamente inmunogénicas parecería ser la clave de esta estrategia de evasión. Se propuso, originalmente para *Plasmodium* (Kemp y col., 1987), un mecanismo adicional de evasión. Este estaría relacionado con la existencia de reacciones cruzadas entre distintos epítopos del mismo o de diferentes antígenos; y estaría mediado por el efecto de estos epítopos en la proliferación de las células B y en la maduración de la afinidad de los anticuerpos. La generación de anticuerpos de alta afinidad depende, probablemente, de la selección de células B con ciertas mutaciones somáticas acumuladas en sus inmunoglobulinas de superficie que provocan un aumento en la afinidad del anticuerpo que desencadenó la respuesta (Manser y col., 1985). El mismo epítopo es el que normalmente selecciona a los mutantes generados. Sin embargo, una célula B mutada que falla al reaccionar con el epítopo original con la suficiente afinidad, podría reaccionar en forma cruzada con algún otro epítopo con mayor afinidad y, en consecuencia comenzar a proliferar. Bajo estas circunstancias, una proporción anormal de células B que acumulan mutaciones somáticas en sus inmunoglobulinas de superficie serían preservadas durante la expansión clonal, lo cual podría determinar que el desarrollo de una respuesta de anticuerpos de alta afinidad, que podría ser importante para la inmunidad contra la infección, se vea retrasada enormemente ya que la proliferación de células B se vería limitada por el número de células disponibles.

## **11 Etapas aguda y crónica de la enfermedad de Chagas**

Con el propósito de determinar si los clones aislados eran importantes desde el punto de vista antigénico, en infecciones naturales, se procedió a analizar la presencia de anticuerpos contra estos antígenos recombinantes en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas, correspondientes a las etapas aguda y crónica. El 100% de los sueros de la etapa aguda reconoció a uno o más de los antígenos recombinantes utilizados. La mayoría reaccionó fundamentalmente con el antígeno SAPA (96%) y, en menor proporción, con los antígenos #13 y #36 (45% y 33% respectivamente). Las proteínas #1, #2 y #30 fueron reconocidas por un muy bajo porcentaje de sueros (14%, 2% y 8% respectivamente), mientras que los antígenos #10, #26 y #54 no fueron reconocidos (Tabla 6). Esto contrasta notablemente con los resultados obtenidos con los sueros de la etapa crónica, donde los antígenos fundamentalmente reconocidos por un alto porcentaje de sueros son los #1, #2 y #30 (85%, 85% y 78% respectivamente). Los antígenos #13 y #36 fueron reconocidos por un alto porcentaje de sueros (64% y 69% respectivamente), mientras que el resto de los clones recombinantes, entre los que se encuentra SAPA, fueron detectados por un bajo porcentaje de los sueros (Tabla 6). En resumen, los sueros de la etapa aguda reconocieron fundamentalmente al antígeno SAPA, y en menor grado a los #13 y #36, mientras que los de la etapa crónica reaccionaron principalmente con los clones recombinantes #1, #2 y #30, y en menor proporción con los antígenos #13 y #36. Según esto, SAPA sería un antígeno característico de la etapa aguda.

Se ha reportado una actividad de neuraminidasa en muestras de suero correspondientes a la etapa aguda de la enfermedad de Chagas (De Titto y col., 1988). Previamente, ya se había demostrado que las formas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* también poseían una actividad neuraminidasa (Pereira, 1983; Harth y col., 1986). Recientemente, se ha clonado el gen y obtenido la secuencia completa de una neuraminidasa (Pereira y col., 1991). Simultáneamente se obtuvo la secuencia completa del antígeno SAPA (Pollevick y col., 1991). A partir de la comparación de las secuencias de ambos genes, se determinó que SAPA y esta neuraminidasa pertenecerían a la misma familia de proteínas (Pollevick, comunicación personal). Por otro lado, existen evidencias experimentales que sugerirían que SAPA posee dos dominios, uno inmunodominante (formado por estructuras de aminoácidos repetidos) y otro con actividad neuraminidasa (Pollevick, comunicación personal). Se han asignado varias funciones relevantes a las neuraminidasas, en una gran variedad de sistemas biológicos, que involucran tanto interacciones célula-célula y reconocimiento célula-ligando, como infecciones (Springer, 1990; Brandley y col., 1990; Phillips y col., 1990; Walx y col., 1990, Russo y col., 1990). Esto también podría ser cierto para infecciones con *T. cruzi* y, de esta manera, las neuraminidasas serían relevantes en la interacción entre el huésped y el parásito. Recientemente, se ha propuesto un modelo en el cual, la actividad neuraminidasa del parásito modularía negativamente la infección (Prioli y col., 1990). Esto es, a mayor actividad neuraminidasa, menor la infección de células huésped por *T. cruzi*. Se propone que este efecto se debería a la remoción del ácido siálico, esencial para la internalización del parásito, a partir de un receptor en una célula huésped o parásito. Por otra parte, se ha determinado que además de la actividad neuraminidasa, SAPA

también tendría una actividad trans-sialidasa (Parodi, comunicación personal). Se ha demostrado que ésta última determina una función esencial para la supervivencia del parásito, la cual es la sialidación de Ssp-3, una estructura de *T. cruzi* requerida para la unión de los tripomastigotes a la célula huésped (Schenkman y col., 1991a; Schenkman y col., 1991). Cualquiera sea su importancia biológica, el análisis de una molécula bifuncional como SAPA puede ser útil para entender la posible relevancia que tenga la existencia de unidades repetidas de aminoácidos en las proteínas. En el caso de *Plasmodium spp.*, se ha sugerido que estas estructuras tendrían tres posibles funciones : i) actuar como ligando para células huéspedes receptoras (Nussenzweig y col., 1989); ii) permitir que el parásito evada la respuesta inmune por medio de la presentación al huésped, de una extensa red de epitopes, la cual, a través de la generación de reacciones cruzadas, impida la maduración de la afinidad de la respuesta contra posibles epitopes protectores (Kemp y col., 1987) y iii) inducir una activación de células B independiente de células T (Schofield, 1991). Este último modelo propone una inmunosupresión, actuando en *cis*, que requeriría la existencia, en la misma molécula, de un dominio de estructuras repetidas y un epítipo que afectaría al parásito cuando se unan los anticuerpos. En el caso del antígeno SAPA, sería interesante poder determinar una posible relación entre una actividad enzimática, relevante para la supervivencia del parásito y la respuesta de anticuerpos, relevante para el huésped.

Analizando los sueros de la etapa crónica, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de reactividad contra los antígenos SAPA y #36, entre los sueros provenientes de Chile y Brasil. Recientemente, un grupo de Chile utilizó estos mismos antígenos

recombinantes para analizar la reactividad de un centenar de sueros, de ese país, pertenecientes a pacientes en la etapa crónica de la enfermedad. El porcentaje de reactividad de los sueros contra los antígenos SAPA y #36, obtenido por ellos, fue de un 37% y un 70%, respectivamente (Lorca y col., 1991). Este resultado es prácticamente idéntico al obtenido, durante este estudio, para la totalidad de los sueros de la etapa crónica (Tabla 6). Entonces, es probable que al considerar por separado los sueros obtenidos en cada país, el número de casos haya sido insuficiente. Por otra parte, una alta proporción de sueros de los diferentes países reaccionaron con estos antígenos, esto indicaría que parásitos de diferentes regiones geográficas poseerían moléculas con epitopes similares o iguales a los estudiados.

## **12 Análisis de sueros de pacientes con infección congénita**

Estas proteínas recombinantes también fueron utilizados para analizar la presencia de anticuerpos de tipo IgG e IgM en sueros de recién nacidos con infección congénita y niños no infectados, todos nacidos de madres con enfermedad de Chagas. En la mayoría de los que presentaron infección congénita se observaron anticuerpos específicos, de tipo IgM, contra varios de los antígenos recombinantes, lo cual confirmaría la infección detectada al nacer estos niños. Esta respuesta no se observó en ninguno de los infantes sanos, nacidos de madres chagásicas. Es interesante notar que cuando se utilizan mezclas complejas de antígenos para la detección de IgM en recién nacidos, congénitamente infectados, la presencia de factores reumatoideos podría llevar a obtener resultados poco claros (Dobson y col., 1988; Lorca y col., 1982). En este estudio, en el cual se usaron antígenos purificados, no se detectaron

anticuerpos fetales, de tipo IgM, en los niños sanos nacidos de madres chagásicas. Esto excluye la posibilidad de que la reactividad observada en sueros de infección congénita, haya sido debida a factores reumatoideos. Por otra parte, en todas las madres de los recién nacidos con infección congénita, se detectaron anticuerpos de tipo IgM por medio de la técnica de ELISA; sin embargo, no ocurrió lo mismo con las madres chagásicas que tuvieron hijos sanos. Esto es bastante sorprendente ya que todas se encontraban en la etapa crónica de la enfermedad (Tablas 8 y 9); pero podría ser el resultado de una estimulación inespecífica del sistema inmune materno como consecuencia de la infección fetal. Estos resultados difieren enormemente de los obtenidos al usar antígenos recombinantes de *T. cruzi* para detectar IgM (Tabla 11). En este último caso, sólo dos de diez madres estudiadas presentaron reacción positiva con un antígeno cada una (Tabla 11). Esto señalaría la importancia de usar antígenos individuales para las determinaciones serológicas con fines diagnósticos. Al analizar los anticuerpos de tipo IgG, se vio que todos los recién nacidos congénitamente infectados, presentaron IgG específicas contra varios de los antígenos recombinantes. Aunque algunas IgG estaban dirigidas contra los mismos antígenos que los detectados por los sueros de sus madres respectivas, también se detectaron, en la mayoría de los recién nacidos congénitamente infectados, IgG específicas que no fueron detectadas en los sueros de sus madres (Tablas 10 y 12). Se han encontrado evidencias de que ciertas subclases de anticuerpos estarían más concentrados en el suero del recién nacido que en el de su respectiva madre (Asano y col., 1988). La presencia de IgG, dirigidas contra SAPA, en diluciones 1:1200 de suero del infante, y la no detección de IgG contra este antígeno, en dilución 1:100 del suero de la madre, hace que ésto sea poco probable y, además, sugeriría que

las nuevas IgG específicas estarían realmente presentes en el suero de los recién nacidos. El otro resultado que apoyaría este hallazgo se obtuvo del estudio de los anticuerpos específicos, detectados en sueros de recién nacidos no infectados, nacidos de madres chagásicas. A diferencia de los infantes con infección congénita, ninguno de estos niños presentó anticuerpos específicos de tipo IgG, que no fuera detectable en el suero de su respectiva madre (Tablas 11 y 12). En algunos casos, los anticuerpos de tipo IgG se detectaron en el suero materno, pero no en el suero de su niño (Tabla 13). Este resultado fue observado en ambos grupos de recién nacidos, es decir, tanto en las madres con enfermedad de Chagas que tuvieran hijos sanos, como en aquellas que tuvieran hijos con infección congénita. Esto podría ser debido a variaciones en el periodo durante el cual se produjo la infección y/o la transferencia diferencial de IgG a través de la placenta.

Estos resultados muestran que, usando antígenos purificados, es posible detectar IgG específicas presentes en el suero de recién nacidos infectados y no en el de su respectiva madre. Además, sugerirían que el feto sería capaz de producir anticuerpos de tipo IgG durante la infección *in utero*. Las observaciones, realizadas en recién nacidos congenitamente infectados y sus madres, se correlacionan con lo observado previamente en casos correspondientes a las dos etapas de la enfermedad de Chagas, donde SAPA era el antígeno detectado por la mayoría de los casos de la etapa aguda y por muy pocos sueros de la fase crónica de la enfermedad. También es interesante notar que los casos correspondientes a la etapa aguda pertenecían a pacientes de Brasil, mientras que los de este estudio son originarios de Chile. SAPA es el principal antígeno durante la infección aguda en estos dos grupos de pacientes,

por lo tanto estos resultados no dependerían de los aislamientos de *T. cruzi* presente en cada país.

Las infecciones congénitas, en la enfermedad de Chagas, son detectadas en un 50%-60% de los casos, a través de la detección de IgM, por medio de la técnica de ELISA (Tabla 8). Una alternativa es el uso de xenodiagnóstico, pero tiene la desventaja que los resultados se obtienen alrededor de 1 a 3 meses más tarde (Thierman y col., 1985). Por otro lado, las drogas tripanocidas disponibles sólo son efectivas durante las primeras etapas de la infección (Rassi, 1982), debido a lo cual es esencial poder disponer de un método que permita detectar, en forma temprana, a los recién nacidos infectados para poder iniciar rápidamente el tratamiento adecuado. Con el uso de antígenos recombinantes para detectar IgM específicas e IgG específicas nuevas, se pudieron identificar 9 de 10 casos de infección congénita. Debido a esto, este método sería más poderoso que los ELISA realizados con antígenos convencionales, donde sólo se pudieron detectar 6 de los 10 casos (Tabla 8). Por otro lado, cuando se usan mezclas complejas de antígenos para detectar IgM en infantes con infección congénita, la presencia de factores reumatoideos puede generar resultados poco claros (Dobson y col., 1988; Lorca y col., 1982). Al usar antígenos purificados, esto no ocurriría, ya que las IgM fetales dirigidas contra las IgG maternas no fueron detectadas en recién nacidos sanos, los cuales habían adquirido IgG, por transferencia pasiva, de sus respectivas madres. De esta manera, la detección de IgM específicas podría llegar a ser una alternativa para realizar un diagnóstico temprano de infecciones congénitas tanto en ésta, como en otras enfermedades infecciosas.



### **13 Análisis de sueros provenientes de pacientes sometidos a tratamiento quimioterapéutico**

Al estudiar la reactividad de sueros correspondientes a pacientes, con enfermedad de Chagas, resistentes al tratamiento quimioterapéutico con benznidazol, se observó una respuesta de tipo IgG e IgM, durante años, contra los antígenos recombinantes utilizados. En general, cuando se realiza serología convencional, esto es, IFI y/o ELISA usando mezclas complejas de antígenos, no se observan respuestas de tipo IgM, de larga duración. Esto podría ser una consecuencia de la estructura que presentan estos antígenos, los cuales están conformados por epitopes de aminoácidos repetidos dispuestos en tandem (Ibañez y col., 1988). A diferencia de lo observado en la respuesta de tipo IgM, las IgG específicas contra uno o más antígenos, fueron detectadas en la mayoría de las muestras de suero correspondientes a todos los pacientes estudiados (Figura 9). Los anticuerpos dirigidos contra SAPA fueron los detectados con mayor frecuencia, ya que se observaron en 8 de los 9 casos analizados. Fundamentalmente, fueron observados en etapas tempranas de la infección y, en la mayoría de los casos, fueron estables durante años. Esta respuesta específica de tipo IgG e IgM contra los antígenos del parásito, no interferiría con el mecanismo propuesto de activación policlonal (Campos-Neto y col., 1982; Falanga y col., 1987; D'Imperio Lima y col., 1985; Minoprio y col., 1988; D'Imperio Lima y col., 1986). Sin embargo provee evidencias que mostrarían que durante las infecciones de *T. cruzi* podría generarse una respuesta de anticuerpos antígeno-específica y antígeno-inespecífica. Por otro lado, una respuesta de anticuerpos antígeno-específica abre la posibilidad de

buscar y estudiar mecanismos efectores dependiente de anticuerpos involucrados en la respuesta contra el parásito, como lo sugiere la protección observada a través de la transferencia pasiva de suero inmune (Krettli, 1982).

Como se vio anteriormente, los anticuerpos anti SAPA se detectaron en el 96% de los sueros de pacientes en la etapa aguda y en mucha menor proporción en sueros correspondientes a la fase crónica. Debido a esto, es sorprendente observar que en seis de los pacientes resistentes al tratamiento, los anticuerpos anti SAPA todavía se detectaban varios años después de la infección. La principal diferencia entre el estudio mencionado anteriormente y el presente, es que en el anterior se analizaron casos crónicos que no habían sido sometidos a tratamiento quimioterapéutico y en este estudio sólo se analizaron casos crónicos resistentes al tratamiento. Por esto, podría ser que existieran subpoblaciones de parásitos, resistentes al tratamiento con benznidazol, que fueran responsables de esta respuesta prolongada contra SAPA. Se ha descrito la existencia de aislamientos de *T. cruzi* resistentes y sensibles a agentes quimioterapéuticos, incluyendo al benznidazol (Brenner, 1984a); sin embargo, no se ha podido establecer ningún marcador bioquímico definido que permita diferenciar entre los dos grupos (Andrade y col., 1985). También, es probable que las recientes actividades neuraminidasa (Pollevick, comunicación personal) y trans-sialidasa (Parodi, comunicación personal) detectadas para SAPA, estén relacionadas con la prolongada respuesta de anticuerpos, dirigidos contra este antígeno, detectada en los sueros de estos pacientes. En este contexto sería posible la existencia de algún tipo de asociación entre la expresión y/o exposición, al sistema inmune del paciente, de antígenos como SAPA y la habilidad de los parásitos para resistir la quimioterapia con benznidazol.

En el caso de los pacientes sensibles al tratamiento quimioterapéutico, se observó que, al usar antígenos recombinantes, las respuestas de tipo IgG se volvieron negativas, enseguida después del tratamiento. Debido a que en los tests serológicos convencionales se vuelven negativos mucho mas tarde (última columna de la tabla 14), el uso de antígenos recombinantes podría ser útil para seguir la evolución de pacientes sometidos a tratamiento y poder discriminar, en forma efectiva, entre casos sensibles y resistentes al tratamiento quimioterapéutico.

#### **14 Análisis de sueros de pacientes con diferentes patologías.**

Otro análisis realizado fue tratar de establecer alguna correlación entre la respuesta de anticuerpos, contra algún antígeno del parásito en particular, y alguna forma clínica de la enfermedad de Chagas. Para ésto, se analizaron sueros de pacientes con sintomatología cardíaca, digestiva (megaesófago, megacolon, megaesófago-megacolon), múltiple (megaesófago-cardiopatía, megacolon-cardiopatía, megaesófago-megacolon-cardiopatía), y también pacientes asintomáticos. En ningun caso se pudieron encontrar diferencias en lo que se refiere a la reactividad de los sueros, correspondientes a las distintas formas clínicas, con los antígenos recombinantes (Tablas 15 y 16). Estos resultados difieren de los encontrados por un grupo de investigadores en Chile (Lorca y col., 1991). Es probable que las diferencias que existen entre ambos resultados sea debido al número de casos analizados y sea necesario el estudio de un mayor número de sueros para poder determinar si existe algún tipo de correlación entre las diferentes formas clínicas de la enfermedad y algún/os antígeno/s parasitario/s.

### **15 Análisis de sueros de personas no infectadas con *T. cruzi***

Cuando se utilizan los tests serológicos convencionales (usando mezclas complejas de antígenos), es frecuente observar falsos positivos al analizar sueros de personas no infectadas con *T. cruzi* o personas con otras parasitosis, fundamentalmente leishmaniasis. Esto genera bastantes problemas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Al usar los antígenos recombinantes para analizar sueros de pacientes con leishmaniasis y de personas no infectadas con *T. cruzi* en ningún caso se detectaron anticuerpos que reconocieran a los antígenos recombinantes (Tabla 17). Recientemente, Lorca y colaboradores (1991) usaron estos mismos antígenos para analizar sueros con estas características, y en ningún caso observaron reacción positiva de los sueros de personas no infectadas con *T. cruzi* y pacientes con leishmaniasis, con los clones recombinantes. Esto sugeriría que estos antígenos, eventualmente, podrían ser utilizados para mejorar los métodos de diagnóstico usados actualmente. También se han enfrentado sueros de pacientes chagásicos con péptidos sintéticos, cuya secuencia corresponde a regiones repetidas de estos antígenos recombinantes (Vergara y col, 1991; Vergara y col., 1991a). Los resultados son muy similares a los obtenidos, durante este estudio, con los antígenos recombinantes. Recientemente se ha reportado que una cisteína proteinasa de *T. cruzi* (Cazzulo y col., 1990), sería reconocida por sueros de la etapa crónica de la enfermedad (Martínez y col., 1991).

## 16 Análisis de la respuesta humoral murina

El antígeno SAPA está localizado en la superficie del parásito, es secretado por tripomastigotes en cultivos celulares y además esta presente en plasma de ratones infectados (Affranchino y col., 1989). Por otro lado, antígenos #1 y #30 son proteínas localizadas internamente en el parásito (Souto-Padrón y col., 1989), esto podría explicar porqué, en infecciones humanas, se generan anticuerpos contra ellos en la fase tardía. Estudios realizados con *T. cruzi* indican que cada célula es capaz de expresar, simultáneamente, proteínas que son antigénicas durante la fase aguda (SAPA) y crónica (#1 y #30) de la enfermedad de Chagas (Leguizamón y col., 1991). Debido a ésto, la respuesta humoral diferencial hacia *T. cruzi* observada en humanos no podría deberse a la presencia de diferentes subpoblaciones de parásitos, una que exprese solamente SAPA y otra que exprese sólo los antígenos característicos de la fase crónica. También habría que descartar la posibilidad de que se produzca un cambio en la expresión de estos antígenos característicos de las etapas aguda y crónica (Peterson y col., 1989) como una posible estrategia del parásito, ya que se ha detectado la expresión simultánea de estos antígenos (Leguizamón y col., 1991). Sin embargo, no se puede descartar una estrategia donde otros antígenos varíen a lo largo de la infección.

Los estudios que permitieron observar la expresión simultánea de antígenos característicos de las fases aguda y crónica, en *T. cruzi* fueron realizados con parásitos obtenidos de sangre de ratón (Leguizamón y col., 1991). El análisis de la respuesta humoral murina, mostró que, en sueros provenientes de distintas cepas de ratones infectadas con diferentes cepas de

parásitos, los anticuerpos detectados estaban dirigidos fundamentalmente contra SAPA. Por otro lado, al analizar la respuesta humoral murina a lo largo del tiempo, se pudo observar que los anticuerpos también estaban dirigidos principalmente contra SAPA. La persistencia de anticuerpos exclusivamente contra este antígeno, durante más de un año, en ratones infectados, sugiere que probablemente, éste sea expresado por los parásitos durante largos periodos luego de la infección. A partir de estos resultados y considerando la expresión simultánea de antígenos característicos de las fases aguda y crónica de la enfermedad (Leguizamón y col., 1991), se puede concluir que la no detección de anticuerpos contra los otros antígenos, probados en el modelo murino, no se debe a la falta de expresión de éstos por parte del parásito. Debido a que este último es capaz de expresar los antígenos #1, #30 y SAPA, en forma simultánea, la capacidad para generar anticuerpos preferencialmente contra SAPA, sugiere que este antígeno también es un componente inmunodominante en el modelo murino.

Es interesante notar que las respuestas inmunes en humanos y en ratones, parecerían diferir en cuanto a los anticuerpos específicos mostrados en el curso de la infección. En humanos, los anticuerpos están dirigidos fundamentalmente contra SAPA durante el periodo agudo de la infección (Tabla 6), y en infecciones congénitas (Tabla 11); mientras que en el ratón los anticuerpos contra SAPA están presentes también en etapas tardías de la infección. Otra diferencia observada, respecto a la respuesta humoral, entre los dos huéspedes es que, anticuerpos contra los antígenos #1 y #30, los cuales son detectados con alta frecuencia en sueros correspondientes a la etapa crónica en infecciones humanas, están prácticamente ausentes en sueros correspondientes a la misma fase en ratones. Este resultado no se puede atribuir a una

incapacidad, por parte del ratón, para generar una respuesta inmune contra estos antígenos, ya que cuando los ratones fueron inmunizados con antígenos recombinantes purificados, estos animales fueron capaces de generar respuestas humorales contra éstos. La diferencia observada entre las respuestas humorales humana y murina puede llegar a ser relevante ya que el modelo murino es comunmente utilizado para estudiar la respuesta inmune contra *T. cruzi* y para analizar la capacidad protectora de antígenos durante la infección. Es interesante notar que SAPA, no sólo es altamente antigénico, sino que también fue el antígeno que se obtuvo con mayor frecuencia al realizar una búsqueda inmunológica, en una genoteca de expresión de *T. cruzi* con sueros de ratones infectados. Tanto en humanos como en ratones, es posible detectar anticuerpos contra SAPA a partir de los 15-30 días posteriores a la infección. La presencia de anticuerpos contra SAPA en humanos (Tabla 6), en conejos (Ibañez y col., 1988) y en diferentes cepas de ratones infectadas con diferentes cepas de parásitos, sumado a las actividades neuraminidasa (Pollevick, comunicación personal) y trans-sialidasa (Parodi, comunicación personal) recientemente detectadas para SAPA, parecerían indicar que en el modelo murino, este antígeno también podría ser relevante en la relación huésped-parásito. Por otro lado, considerando que esta proteína es secretada, también podría actuar como una cortina de humo para que el huésped genere una respuesta inespecífica, contra el parásito, hasta que se establezca la infección.

Los resultados obtenidos a lo largo de este estudio muestran que el uso de estos antígenos recombinantes y, eventualmente, otros que se obtengan en un futuro, podría convertirse en una herramienta muy importante para lograr métodos de diagnóstico, más sensibles y confiables que los que se disponen

actualmente. Por otro lado, la tecnología de ADN recombinante permite obtener los antígenos en grandes cantidades, lo cual permitiría su uso no sólo en diagnóstico y profilaxis, sino también en el estudio del rol en el desarrollo de la enfermedad, a través de la interacción huésped-parásito y en la biología de *T. cruzi*



**CONCLUSIONES**

### **Obtención de anticuerpos policlonales contra el antígeno recombinante SAPA**

-Los anticuerpos policlonales, producidos en conejo, contra la proteína recombinante SAPA, presentaron reacción cruzada contra el antígeno #36. Es posible que ésta se deba a la presencia de la secuencia de aminoácidos PVD, compartida por ambas proteínas.

### **Respuesta humoral en pacientes con enfermedad de Chagas**

-Los clones recombinantes utilizados para realizar este estudio son relevantes, desde el punto de vista antigénico, en infecciones humanas.

-En infecciones humanas el antígeno SAPA sería característico de la etapa aguda mientras que los antígenos #1, #2 y #30 lo serían de la etapa crónica de la enfermedad de Chagas.

-No existirían diferencias entre los distintos sexos de los pacientes, en cuanto a los antígenos reconocidos por los sueros correspondientes.

-Los parásitos de diferentes regiones geográficas poseen moléculas con epitopes similares o iguales a los estudiados.

### **Análisis de sueros de pacientes con diferentes patologías.**

-Los estudios realizados no permitieron establecer ninguna asociación

entre los antígenos analizados y las diferentes patologías correspondientes a la etapa crónica de la enfermedad de Chagas.

### **Análisis de sueros provenientes de pacientes sometidos a tratamiento quimioterapéutico**

-En pacientes con infección resistente al tratamiento quimioterapéutico, las respuestas antígeno-específica de tipo IgG e IgM persisten durante años.

-Las IgG antígeno-específicas son muy variables entre pacientes, en lo que respecta a fecha de aparición y persistencia a lo largo del tiempo.

-En pacientes con infección resistente al tratamiento quimioterapéutico, la persistencia de IgG contra un antígeno en particular (SAPA), sugiere la existencia de un grupo de parásitos, resistentes al tratamiento, con propiedades antigénicas diferentes.

-La comparación de los resultados obtenidos con antígenos definidos y con serología convencional, señala la importancia del uso de antígenos individuales para analizar la evolución de tratamientos quimioterapéuticos.

### **Análisis de sueros de pacientes con infección congénita**

-Los recién nacidos congenitamente infectados presentaron especificidades de tipo IgG e IgM , principalmente contra SAPA, las cuales no fueron detectadas en sus madres respectivas ni en los infantes sanos nacidos de madres chagásicas.

-Los resultados obtenidos con los sueros de casos de infección congénita, sugerirían que los fetos infectados producirían en el útero especificidades de tipo IgG, características de infecciones agudas en adultos.

### **Análisis de sueros de personas no infectadas con *T. cruzi***

-La ausencia de reactividad de estos antígenos con sueros correspondientes a pacientes con leishmaniasis y personas sin infección, indicaría que estos antígenos podrían ser una herramienta útil para mejorar los sistemas de diagnóstico utilizados actualmente.

### **Análisis de la respuesta humoral murina**

-En el modelo experimental murino, a pesar de la diversidad de cepas de ratones y parásitos utilizadas, los anticuerpos más frecuentemente detectados estaban dirigidos contra el antígeno SAPA.

-Existen diferencias entre las respuestas inmunes en humanos y en ratones, en cuanto a los anticuerpos específicos mostrados a lo largo de la infección. En humanos los anticuerpos están dirigidos fundamentalmente contra SAPA durante el periodo agudo, y en ratones serían detectados aún en etapas tardías de la infección. Por otra parte anticuerpos dirigidos contra los antígenos característicos de la etapa crónica en humanos (#1, #2 y #30), prácticamente no son detectados en ratones.

*Juanito Rodríguez*



## **BIBLIOGRAFIA**

- Abalos, J. W. (1972) Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas p. 347
- Acosta, A. y Santos-Buch, C. (1985) *Circulation* 71:1255
- Adinolfi, M. y Lessof, M. H. (1971) *J. Med. Genet.* 9:86
- Alford, C. A. (1971) *J. Pediatr. Clin. North Am.* 18:99
- Alves, M. J. M. y Colli, W. (1974) *J. Protozool.* 21:575
- Alves, M. J. M., Abuin, G., Kuwayima, V. Y. y Colli, W. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 21:75
- Andrade, S. G., Magalhaes, J. B. y Pontes, A. L. (1985) *Bull. WHO* 63:721
- Andrade, Z. A. (1983) Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection *Ciba Found. Symp.* 99:214
- Andrade, Z. A. y Andrade, S. G. Patología. En: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Eds. Brener, Z. y Andrade, Z. Guanabara Koogan, Brasil p.199 (1979)
- Andrews, N. N., Hong, K. S., Robbins, E. S. y Nussenweig, V. (1987) *Exp. Parasitol.* 64:474
- Andrews, N. W., Katzin, A. M. y Colli, W. (1984) *Eur. J. Biochem.* 140:599
- Araguth, M. F., Rodriguez, M. M. y Yoshida, N. (1988) *Parasite Immunol.* 10:707
- Araujo, F. G. (1985) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34:242
- Araujo, F. G., Heilman, B. y Tighe, L. (1984) *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78:672
- Araujo, F. J. y Remington, J. S. (1981) *J. Immunol.* 127:855
- Araujo, F. y Guptill, D. (1984a) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33:362

- Asano, Y., Hiroishi, Y., Itakura, N., Hirose, S., Kajita, Y., Suga, S y Yazaki, T. (1988) *J. Med. Virol.* 26:1
- Ashall, F., Yip-Chuck, D. A. M., Luquetti, A. A., y Miles, M. A. (1988) *J. Clin. Microbiol.* 26:576
- Åslund, L, Henriksson, J., Campetella, O., Frasc, A. C. C., Pettersson, U. y Cazzulo, J. J. 45:345
- Atias, A. Enfermedad de Chagas. En: *Parasitología Clínica Publicaciones Mediterraneo Santiago, Chile.* (1991) p.255
- Atias, A. Transmisión congénita de parásitos. En: *Parasitología clínica Publicaciones Mediterraneo. Santiago, Chile* (1991a) p.433
- Avila, J. L., Avila, A. y Muñoz, E. (1981) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30:769
- Bancroft, H. "La prueba de Chi cuadrado" En: *Introducción a la bioestadística EUDEBA. Buenos Aires* p.159 (1960)
- Basombrio, M. A. y Arredes, H. (1987) *J. Parasitol.* 73:236
- Basombrio, M. A. y Besuschio, S. (1982) *Infect. Immun.* 36:351
- Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J. P. J., Sloof, P., Van Boom, J. H. y Tromp, M. C. (1986) *Cell* 46:819
- Black, C. M., Plikaytis, B. D., Wells, T. W., Ramirez, R. M., Carlone, G. M., Chimonczyk, B. A. y Reimer, C. B. (1988) *J. Immunol. Methods* 106:76
- Bonaldo, M. C., Souto-Padrón, T., de Souza, W. y Goldenberg, S. (1988) *J. Cell Biol.* 106:1349
- Bontempi, E., Martínez, J. y Cazzulo, J. J. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* 33:43
- Borst, P. y Hoeijmakers, J. H. J. (1979) *Plasmid* 2:20
- Boschetti, M. A., Piras, M. N., Henriquez, D. y Piras, R. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 24:175

- Brack, C. (1968) Acta Tropica 25:289
- Bradford, M (1976) Anal. Biochem. 72:248
- Brandley, B. K., Swiedler, S. J. y Robbins, P. W. (1990) Cell 63:861
- Brener, Z. (1965) Ann. Trop. Med. Parasitol. 59:19
- Brener, Z. (1973) Ann. Rev. Microbiol. 27:347
- Brener, Z. (1984) Genes and antigens of parasites. A Laboratory Manual. Ed. C. Morel. UNDP/WHO/FIOCRUZ 13:2
- Brener, Z. (1984a) Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79:149
- Brener, Z. (1985) Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18(Supl.):1
- Brener, Z. (1986) Parasitol. Today 2:196
- Brener, Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. En: Advances in Parasitology Eds. Lumsden, W. H. R., Muller, R. y Baker, J. R. Academic Press p. 247 (1980)
- Brener, Z., Chiari, E. y Alvarenga, N. J. (1974) Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 16:32
- Brener, Z., Costa, C. A. G. y Chiari, C. (1976) Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 18:450.
- Budzko, D. B., Pizzimenti, M. C. y Kierszenbaum, F. (1975) Infect. Immun. 11:86
- Camargo, M. (1966) Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 8:227
- Camargo, M. E. y Takeda, G. K. F. Diagnóstico de laboratorio. En: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Eds. Brener, Z. y Andrade, Z. Guanabara Koogan, Brasil p.175 (1979)
- Campos-Neto, A. y Bunn-Moreno, M. M. (1982) Infect. Immun. 38:871



- Cazzulo, J. J., Cazzulo Franke, M. C., Martínez, J. y Franke de Cazzulo, B. M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1037:186
- Cederqvist, L. L. (1983) *Am. J. Reprod. Immunol.* 3:50
- Cederqvist, L. L., Kimball, A. C., Ewool, L. C. y Litwin, S. D. (1977) *Obstet. Gynecol.* 50:200
- Chagas, C. (1909) *An. Acad. Med. Rio de Janeiro* 72:188
- Chagas, C. (1909a) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1:59
- Chagas, C. (1911) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 3:219
- Chagas, C. (1916) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 8:37
- Chagas, C. (1916a) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 8:3
- Contreras, V. T., Morel, C. M. y Goldenberg, S. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 14:83
- Cooper, R., Inverso, J. A., Espinosa, M., Nogueira, N. y Cross, G. A. M. (1991) *Mol. Biochem. Parasitol.* (en prensa)
- Cross, G. A. M. (1978) *Proc. Roy. Soc. London Ser. B.* 202:55
- D'Imperio Lima, M. R., Eisen, H., Minoprio, P., Joskowicz, P. y Coutinho, A. (1986) *J. Immunol.* 137:353
- D'Imperio Lima, M. R., Joskowicz, M., Coutinho, A., Kipnis, T. y Eisen, H. (1985) *Eur. J. Immunol.* 15:201
- De Lang, T., Michels, P. A. M., Veerman, H. J. G., Cornelissen, A. W. C. A. y Borst, P. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:3777
- De Titto, E. H. y Araujo, F. G. (1988) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 46:157
- Decoster, A., Caron, A., Darcy, F. y Capron, A. (1988) *The Lancet* ii:1104

- Degrave, W., Frogoso, S. P., Britto, C., Heuverswyn, H. V., Kidane, G. Z., Cardoso, M. A. B., Mueller, R. V., Simpson, L. y Morel, C. M. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* 27:241
- Dobson, S. R. M., Taber, L. H. y Baughn, R. E. (1988) *J. Infect. Dis.* 157:903
- Docampo, R., Moreno, S. N. J. y Cruz, F. S. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* 27:241.
- Doyle, P. S., Dvorak, J. A., y Engel, J. C. (1984) *J. Protozool.* 31:280
- Dragon, E. A., Brothers, V. M., Wrightsman, R. A. y Manning, J. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 16:213
- Dragon, E. A., Sias, S. R., Kato, E. A. y Gabe, J. D. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:1271
- Dvorak, J. A., Hall, T. E., Crane, M. S. J., Engel, J. C., Mc Daniel, J. P. y Uriegas, R. (1982) *J. Protozool.* 29:430
- Dvorak, J. A., Hartman, D. L. y Miles, M. A. (1980) *J. Protozool.* 27:472
- Engel, J. C., Doyle, P. S. y Dvorak, J. A. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 39:69
- Engman, D. M., Sias, S. R., Gabe, J. D., Donelson, J. E. y Dragon, E. A. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* 37:285
- Engman, D. M., Reddy, L. V., Donelson, J. E. y Kirchhoff, L. V. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 22:115
- Falanga, P. B., D'Imperio Lima, M. R., Coutinho, A. y Pereira da Silva, L. (1987) *Eur. J. Immunol.* 17:599
- Fischer, E., Ouaisi, M. A., Velge, P., Cornette, J. y Kazatchkine, M. D. (1988) *Immunology* 65:299
- Frasch, A. C. C., Cazzulo, J. J., Åslund, L. y Pettersson, U. (1991) *Parasitol. Today* 7:148

- Frasch, A. C. C., Sánchez, D. O. y Cazzulo, J. J. (1990) Mem. Inst. Oswaldo Cruz 85:523
- Freeman, F., Wilson, P. L. y Kazan, B. H. (1975) Exp. Parasitol. 38:181
- Galvao-Castro, B., Sá-Ferreira, J. A. y Puinez, C. (1984) Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79:69
- Gattass, C. R., Lima, M. T., Nobrega, A. F., Barcinski, M. A. y Dos Reis, G. A. (1988) Infect. Immun. 56:1402
- Gibson, W. C. y Miles, M. A. (1986) EMBO J. 5:1299
- Gitlin, D. Development and metabolism of the immunoglobulins. En: Immunologic incompetence. Eds. Kagan, B. M. y Stiehn, E. R. Year Book Medical Publishers Inc. Chicago. p. 8 (1971)
- Gitlin, D., Kumate, J. y Urvusti, J. (1964) J. Clin. Invest. 43:1938
- González Cappa, S. M., Chiale, P., Del Prado, G. E., Katzin, A. M., Martini, G. W. de, Isola, E. D. de, Abramo Orrego, L. y Segura, E. L. (1980) Medicina (Bs. As) 40:63.
- González Cappa, S. M., Katzin, A. M., Añasco, N. y Lajmanovich, S. (1981) Medicina Bs. As) 41:549
- González, N. S., Sánchez, D. O., Frasc, A. C. C. y Algranati, I. D. (1984) Mol. Cell. Biochem. 63:157
- Griscelli, C., Desmots, G., Gay, B. y Frommel, D. (1973) J. Pediatr. 83:20
- Hanson, W. L. (1977) Immune response and mechanisms of resistance in *Trypanosoma cruzi* Pan American Health Organization Scientific Publication. 347:22
- Harth, G., Haidaris, C. G. y So, M. (1986) J. Cell. Biochem. 162 (Suppl. 10 A)

- Henriksson, J., Åslund, L., Macina, R. A., Franke de Cazzulo, B., Cazzulo, J. J., Frasc, A. C. C. y Pettersson, U. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 42:213
- Hoare, C. A. (1964) *J. Protozool.* 11:206
- Hofflin, J. M., Sadler, R. H., Araujo, F. G., Page, W. E. y Remington, J. S. (1987) *Trans. R. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 81:437
- Hoft, D. F., Kim, K. S., Otsu, K., Moser, D. R., Yost, W. J., Blumin, J. H., Donelson, J. E. y Kirchhoff, L. V., (1989) *Infect. Immun.* 57:1959
- Honigberg, B. M. *Progress in Protozoology* Eds. J. Ludvik, J. Lom y J. Vavra Academic Press, Londres y Nueva York. (1963) p. 68
- Hudson, L. (1985) *Parasitol. Today* 1:6
- Ibañez, C. F. (1989) Tesis doctoral
- Ibañez, C. F., Affranchino, J. L. y Frasc, A. C. C. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 25:115
- Ibañez, C. F., Affranchino, J. L., Macina, R. A., Reyes, M. B., Leguizomón, M. S., Camargo, M. E., Åslund, L., Pettersson, U. y Frasc, A. C. C. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* 30:27
- Israelski, D. M., Sadler, R. y Araujo, F. G. (1988) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39:445
- Jazin, E., Luquetti, A. O., Rassi, A. y Frasc, A. C. C. (1991) *Infect. Immun.* 59:2189
- Joiner, K., Hieny, S., Kirchhoff, L. V. y Sher, A. (1985) *J. Exp. Med.*, 161:1196
- Kahn, S., Colbert, T. G., Wallace, J. C., Hoagland, N. A. y Eisen, H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4481
- Katzin, A. M. y Colli, W. (1983) *Biochim. et Biophys. Acta* 727:403
- Kemp, D. J., Coppel, R. L. y Anders, R. F. (1987) *Ann. Rev. Microbiol.* 41:181

- Ketteridge, D. (1975) *Acta Trop.* 32:173
- Khouri, E. L., Diez, C., Cossio, P. M. y Arana, R. M. (1983) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 27:283
- Khouri, E. L., Ritacco, V., Cossio, P. M., Laguens, R. P., Szarfman, A., Diez, C. y Arana, R. M. (1979) *Clin. Exp. Immunol.* 36:8
- Kierszenbaum, F y Pienkowski, M. M. (1979) *Inf. Immun.* 24:117
- Kierszenbaum, F. (1980) *J. Parasitol.* 66:673
- Kierszenbaum, F. y Howard, J. G. (1976) *J. Immunol.* 116:1208
- Kierszenbaum, F. y Hudson, L. (1985) *Parasitol. Today* 1:4
- Kipnis, T. L., David, J. R., Alper, C. A., Sher, A., Dias Da Silva, W. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:602
- Kipnis, T. L., James, S. L., Sher, A. y David, J. R. (1981) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30:47
- Kipnis, T. L., Krettli, A. U., Dias Da Silva, W. (1985) *Scand. J. Immunol.* 22:217
- Kirchhoff, L. U., Engel, J. C., Dvorak, J. A. y Sher, A. (1984) *Mol. Biochem. Parasitol.* 11:81
- Kirchhoff, L. V., Gam, A. A., Gusmao, R. D. A., Goldsmith, R. S., Rezende, J. M. y Rassi, A. (1987) *J. Infect. Dis.* 155:561
- Kohler, P. F. y Farr, R. S. (1966) *Nature* 210:1070
- Kooy, R. F., Ashall, F., Van der Ploeg, M. y Overdulve, J. P. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* 36:73
- Krettli, A. U. (1982) *Afr. J. Clin. Exp. Immunol.* 3:327
- Krettli, A. U. (1984) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79 (suppl.):59

- Krettli, A. U. y Brener, Z. (1982) *J. Immunol.* 128:2009
- Laemli, U. K. (1970) *Nature* 227:680
- Lafaille, J. J., Linss, J., Krieger, M. A., Souto-Padrón, T., de Souza, W. y Goldenberg, S. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* 35:127
- Lanar, D. y Manning, J. (1983) *J. Cell. Biochem. Suppl.* 7A 12<sup>th</sup> Annual UCLA Symposia, abstr. 0057
- Lawton, A. R., Self, K. S., Royal, S. A. y Cooper, M. D. (1972) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1:84
- Leguizamón, M. S., Campetella, O. E., Reyes, M. B., Ibañez, C. F., Basombrio, M. A., Rincón, J., Örn, A., y Frasc, A. C. C. (1991) *Parasitology* 102:379
- Lemsre, J. L., Afchain, D., Orozco, O., Loyers, M., Breiere, F. S., Desjense, P., Carlin, Y., Martin, V., Nogueira-Queiroz, J. A., Le Ray, D. y Capron, A. (1986) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35:86
- Levin, M. J., Mesri, E., Benarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Chiale, P. A., Ruiz, A. M., Kahn, A., Rosenbaum, M. B., Torres, H. N. y Segura, E. L. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41:530
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Devoux, G., Graine, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Polzansky, G., Spragne, V., Vassa, J. y Wallace, F. G. (1980) *J. Protozool.* 27:37
- Lorca, M. y Thiermann, E. (1982) *Rev. Chile Pediatr.* 53:199
- Lorca, M., González, A., Veloso, C., Reyes, V. y Vergara, U. (1991) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (en prensa).
- Madani, G. y Heiner, D. C. (1989) *Curr. Opinion Immunol.* 1:1157
- Maniatis, T., Fritsch, F. F. y Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning. A laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.

- Manser, T., Wysaki, L. J., Gridley, T., Near, R. I., Geffer, M. L. (1985) *Immunol. Today* 6:94
- Martensson, L. y Fudenberg, H. H. (1965) *J. Immunol.* 94:514
- Martins, M. S., Hudson, L., Krettli, A. U., Cançado, J. R. y Brener, Z. (1985) *Clin. Exp. Immunol.* 61:343
- Martínez, J., Campetella, O., Frasc, A. C. C. y Cazzulo, J. J. (1991) *Infect. Immun.* (en prensa)
- Mc Hardy, N. y Elphick, J. P. (1978) *Int. J. Parasitol.* 8:25
- McCormick, T. S. y Rowland, E. C. (1989) *Exp. Parasitol.* 69:393
- Mellbye, O. J. y Natvig, J. B. (1973) *Vox Sang.* 24:206
- Miles, M. A. *Biology of the kinetoplast*. Eds. Lumsden, W. H. R. y Evans, D. A. Academic Press, Londres y New York. (1979) p.117
- Miles, M. A., Toye, R. J., Oswald, S. C. y Godfrey, D. G. (1977) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71:217
- Miller, M. E y Stiehn, E. R. *Immunology and resistance to infection*. En: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Eds. Remington, J. S. y Klein, J. O. . 2nd ed. Philadelphia Saunders, (1983) p.27
- Minoprio, P., Burlen, O., Pereira, P., Guilbert, B., Andrade, L., Hontebeyrie-Joskowicz, M. y Coutinho, A. (1988) *Scand. J. Immunol.* 28:553
- Morel, C., Chiari, E., Plessman Camargo, E., Mattei, D. M., Romanha, A. J. y Simpson, L. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6810
- Morel, C., Goncalves, A. M. y Simpson, L. (1984) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79:51
- Mortatti, R. C., Maia, L. C. S., de Oliveira, A. U. y Munk, M. E. (1990) *Infect. Immun.* 58:3588
- Mosca, W. y Plaja, J. (1981) *J. Clin. Microbiol.* 14:1

- Mosca, W., Plaja, J. Hubsh, R y Cedillos, R. (1985) *J. Clin. Microbiol.* 22:438
- Murta, A. C. M., Persechini, P. M., Souto-Padrón, T., de Souza, W., Guimarães, J. A. y Scharfstein, J. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 43:27
- Nogueira, N., Bianco, C. y Cohn, Z. (1975) *J. Exp. Med.* 142:224
- Nogueira, N., Chaplan, S., Tydings, J. D., Unkeless, J. y Cohn, Z. (1981) *J. Exp. Med.* 153:629
- Norris, K. A., Harth, G. y So, M. (1989) *Infect. Immun.* 57:2372
- Nussensweig, V., Deane, L. M. y Kloetzel, J. (1963) *Exp. Parasitol.* 14:221
- Nussenzweig, V. y Nussenzweig, R. (1989) *Adv. Immunol.* 45:283
- Okabe, K., Kipnis, T. L., Calich, V. L. G. y Dias da Silva, W. (1980) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 16:344
- Okanla, E. O., Stumpf, J. L. y Dusanic, D. G. (1982) *Int. J. Parasitol.* 12:251
- Oliveira-Filho, A. M. (1988) *Rev. Arg. Microbiol.* 20:39
- Opperdoes, F. R. y Borst, P. (1977) *FEBS Lett.* 80:360
- Ouaissi, M. A. (1988) *Parasitol. Today* 4:169
- Ouaissi, M. A., Afchain, D., Capron, A. y Grimaud, J. A. (1984) *Nature* 308:380
- Ouaissi, M. A., Cornette, J. y Capron, A. (1985) *Eur. J. Immunol.* 15:1096
- Ouaissi, M. A., Cornette, J. y Capron, A. (1986a) *Mol. Biochem. Parasitol.* 19:201
- Ouaissi, M. A., Cornette, J., Afchain, D., Capron, A. Gras-Masse, H. y Tartar, A. (1986) *Science* 234:603
- Pereira, M. E. A. (1983) *Science* 219:1444
- Pereira, M. E. A., Loureas, M. A., Villalta, F. y Andrade, A. F. B. (1980) *J. Exp. Med.* 152:1375



- Pereira, M. E. A., Mejía, J. S., Ortega-Barrio, E., Matzilevich, D. y Prioli, R. P. (1991) *J. Exp. Med.* ( en prensa)
- Peterson, D., Fouts D. L. y Manning, J. E. (1989) *EMBO J.* 8:3911
- Petry, K. y Eisen, H. (1989) *Parasitol. Today* 5:111
- Phillips, M. L., Nudelman, E., Gaeta, F. C. A., Perez, M., Singmal, A. K., Hakomori, S. I. y Pavison, J. C. (1990) *Science* 250:1130
- Pinto Diaz, J. C. (1984) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79:85
- Pizzi, T. (1956) *Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Monografía de la Universidad de Chile.* p. 183
- Pollevick, G. D., Affranchino, J. L., Frasc, A. C. C. y Sánchez, D. O. (1991) *Mol. Biochem. Parasitol.* 47:247
- Postam, M., Mc Daniel, J. P. y Dvorak, J. A. (1983) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:497
- Powell, M. R. y Kuhn, R. E. (1980) *J. Parasitol.* 66:399
- Previato, J. O., Andrade, A. F. B., Pessolani, M. C. V. y Previato, L. M. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 16:85
- Prioli, R. P., Santiago Mejía, J y Pereira, M. E. A. (1990) *J. Immunol.* 144:4384
- Rassi, A. (1982) *Arq. Bras. Cardiol.* 38:277
- Remington, J. S. y Schafer, I. A. (1968) *Nature* 217:364
- Remington, J. S., Araujo, F. G. y Desmonts, G. (1985) *J. Infect. Dis.* 152:1020
- Requena, J. M., López, M. C., Jimenez-Ruiz, A., de La Torre, J. C. y Alonso, C. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16:1393
- Ribeiro Dos Santos, R. y Hudson, L. (1980) *Clin. Exp. Immunol.* 40:36

- Rimoldi, M. T., Sher, A., Hieny, S., Lituchy, A. y Joiner, K. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:193
- Roditi, I., Carrington, M. y Turner, M. (1987) Nature 325:272
- Rodríguez, A., Santoro, F., Afchain, D., Bazin, H. y Capron, A. (1981) Infect. immun. 31:524
- Ruiz, A. M., Esteva, M., Cabeza Meckert, P., Laguens, R. P. y Segura, E. L. (1985) Acta Tropica 42:299
- Ruiz, A. M., Esteva, M., Subias, E., Moreno, M., de Campanini, A. R., Velázquez, E. y Segura, E. L. (1990) Mol. Biochem. Parasitol. 39:117
- Russo, T. A., Thompson, J. S., Godoy, V. G. y Malamy, M. H. (1990) J. Bacteriol. 172:2594
- Santos-Buch, C. A. y Texeira, A. R. L. (1974) J. Exp. Med. 140:38
- Sánchez, D. O., Frasc, A. C. C., Carrasco, A. E., González Cappa, S. M., Isola E. D. de y Stoppani, A. O. M. (1984) Mol. Biochem. Parasitol. 11:169
- Sánchez, G. A., Krettli, A. U. y Brener, Z. (1982) Proceedings IX Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease. Caxambú, Brasil 173:7
- Scharfstein, J., Luquetti, A., Murta, A. C. M. Senna, M., Rezende, J. M., Rassi, A. y Mendonca-Previato, L. (1985) Am. J. Trop. Med. Hyg. 34:1153
- Schechter, M., Flint, J. E., Voller, A., Guhl, F., Marinkelle, C. J. y Miles, M. A. (1983) Lancet ii:939
- Schenkman, S., Diaz, C. and Nussenzweig, V. (1991a) Exp. Parasitol. 72:76
- Schenkman, S., Jiang, M. S., Hart, G. W. y Nussenweig, V. (1991) Cell 65:1117
- Schenone, H., Alfaro, E. y Rojas, A. (1974) Bol. Chile. Parasit. 29:24
- Schijman, A. G., Duseti, M. J., Vázquez, M. P., Lafon, P., Levy-Yeyati, P. y Levin, M. J. (1990) Nucl. Acids Res. 18:3399

- Schmuñis, G. A. (1987) Mem. Inst. Oswaldo Cruz 82(suppl. 1):287
- Schmuñis, G. A., Gonzalez Cappa, S. M., Traversa, O. C. y Yanovsky, J. F. (1971) Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 65:89
- Schneider, A., Hemphill, A., Wyler, T. y Seebeck, T. (1988) Science 241:459
- Schofield, L. (1991) Parasitol. Today 7:99
- Scott, M. T. (1981) Parasite Immunol. 3:209
- Scott, M. T. y Snary, D. (1979) Nature 282:73
- Segura, E. L., Esteva, M., Quintana, C. J., Montoro, L. S. y Weissenbacher, M. C. (1981) Medicina 41:328
- Sher, A. y Snary, D. (1982) Nature 300:639
- Snary, D. (1980) Exp. Parasitol. 49:68
- Snary, D. y Hudson, L. (1979) FEBS Lett 100:166
- Souto Padrón, T., Reyes, M. B., Leguizamón, S., Campetella, O. E., Frasch, A. C. C. y De Souza, W. (1989) Eur. J. Cell. Biol. 50:272
- Souto-Padrón, T., Campetella, O. Cazzulo, J. J. y de Souza, W. (1990) J. Cell. Sci. 96:485
- Springer, T. A. (1990) Nature (London) 346:425
- Stiehn, E. R. (1975) Am. J. Dis. Child 129:438
- Storino y Milei . (1985) Miocardiopatía chagásica crónica. Academia Nacional de Medicina. Bs. As.
- Sturm, N. R., Degraeve, W., Morel, C. y Simpson, L. (1989) Mol. Biochem. Parasitol. 33:205
- Tachibana, H., Nagakura, K. y Kaneda, Y. (1988) Parasitol. Res. 74:409

- Takehara, H. A., Perini, A., Da Silva, M. H. y Mota, I. (1981) *Exp. Parasitol.* 52:137
- Takle, G. B. y Cross, G. A. M. (1991) *Mol. Biochem. Parasitol.* (en prensa)
- Tarleton, R. L. y Kuhn, R. E. (1983) *Cell. Immunol.* 80:392
- Ternynck, T., Bleux, C., Grecoire, J., Avrameas, S. y Kanellopoulos-Langevin, C. (1990) *J. Immunol.* 144:1504
- Texeira, M. M. G. y Yoshida, N. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* 18:271
- Thiermann, E., Muñoz, P., Lorca, M. y Atias, A. (1985) *Rev. Chile. Pediatr.* 56:143
- Tibayrenc, M. y Ayala, F. J. (1988) *Evolution* 42:277
- Todd, C. W., Todd, N. R. y Guimaraes, A. C. (1983) *Infect. Immun.* 40:832
- Trischmann, T. M., Tanowitz, H., Wittner, M. y Bloom, B. (1978) *Exp. Parasitol.* 45:160
- van Furth, R., Schuit, H. R. E. y Hijmans, W. (1965) *J. Exp. Med.* 122:1173
- Vattuone, I. J. H., Szarfman, A. y González Cappa, S. M (1973) *J. Trop. Med. Hyg.* 76:45
- Vergara, U., Lorca, M., Veloso, C., González, A., Engstrom, A., Åslund, L., Pettersson, U. y Frasc, A. C. C. (1991) *J. Clin. Microbiol.* (en prensa)
- Vergara, U., Veloso, C., González, A. y Lorca, M. (1991a) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (en prensa)
- Vickerman, K. (1978) *Nature* 273:613
- Voller, A. (1975) *Lancet* ii:426
- W.H.O. Bulletin (1981)

- Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M. y Seed, B. (1990) *Science* 250:1132.
- Weil, G. J, Hussain, R., Kumaraswami, V., Tripathy, S. P., Phillips, K. S. y Ottesen, E. A. (1983) *J. Clin. Invest.* 71:1124
- Whitelaw, A. y Parkin, J. (1988) *Br. Med. Bull* 44:1037
- Wood, J. N., Hudson, L., Jessell, T. M. y Yamamoto, M. (1982) *Nature* 296:34
- Wrightsman, R., Krassner, S. y Watson, T. (1982) *Infect. Immun.* 36:637
- Yoshida, N. (1986) *Exp. Parasitol.* 61:184
- Yoshida, N., Blanco, S. A., Araguth, M. F., Russo, M. y González, J. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 39:39
- Yoshida, N., Mortara, R. A., Araguth, M. F., González, J. C. y Russo, M. (1989) *Infect. Immun.* 57:1663
- Young, R. A. y Davis, R. W. (1983) *Science* 222:778
- Zingales, B. y Colli, W. (1985a) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 117:129
- Zingales, B., Carniol, C., Lederkremer, R. M. de y Colli, W. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 26:135
- Zingales, B., Katzin, A. M., Arruda, M. V. y Colli, W. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol* 16:21
- Zweerink, H. J., Weston, H. D., Andersen, O. F., Garber, S. S. y Hayes, E. C. (1984) *Infect. Immun.* 46:826