

Tesis de Posgrado

Actividad biológica de antígenos de *Trypanosoma cruzi*

Laucella, Susana Adriana

1994

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Laucella, Susana Adriana. (1994). Actividad biológica de antígenos de *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2698_Laucella.pdf

Cita tipo Chicago:

Laucella, Susana Adriana. "Actividad biológica de antígenos de *Trypanosoma cruzi*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2698_Laucella.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ANTÍGENOS DE TRYPANOSOMA CRUZI

Autora: Licenciada Susana Adriana Laucella

Director: Dr. Ernesto Horacio de Titto

Trabajo realizado en el
Instituto Nacional de Chagas "Dr. Mario Fatała Chabén",
Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación

Tesis presentada para
optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas

1994

*fern
26/98
Ej. 2*

Dedico este a trabajo a:

la memoria de Josefina Napolillo, mi madre, quien con su esfuerzo y enseñanza me brindó la posibilidad de una formación personal y académica y depositó en mí la esperanza de un futuro mejor

Daniel Rubio, mi esposo, quien con su ayuda y compañía incentiva constantemente mi labor

Liliana Laucella, mi hermana, quien me apoya y aconseja permanentemente.

La investigación básica puede ser, como lo es frecuentemente, una plataforma para la investigación aplicada, pero es también el campo creador donde tiene su origen la diversidad infinita de los desarrollos culturales y sociales.

Agradezco muy especialmente al Dr. Ernesto de Titto, Director de esta Tesis, por enseñarme a desarrollar un criterio científico y por su confianza y, a la Dra. Elsa Leonor Segura por apoyarme e incentivar me en la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a toda la gente que me ayudó en la realización de este trabajo, quienes me brindaron asistencia técnica, ideas y aliento; gracias por su tiempo y esfuerzo.

Especialmente a Elsa Velázquez en la producción de los anticuerpos monoclonales y por su permanente asesoramiento y apoyo.

Maximiliano Dasso y Martín Rottenberg con quienes aprendí y compartí las primeras técnicas en el laboratorio del INDIECH.

Mónica Esteva, por su valiosa ayuda en la obtención de las fracciones subcelulares de parásito.

El personal del Instituto Nacional de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén"; especialmente, mis compañeros del 3º piso: Adelina Riarte, Rita Cardoni, Marta Lauricella, Angel Sinagra, Miriam Postan, Concepción Luna y Ada Campanini con quienes compartí buenos y malos momentos.

Mis colegas becarias y amigas: Betina Porcel, María Inés Antúnez y Diana Hansen con quienes viví las mismas ilusiones y expectativas.

La Dra. Mirta Carlomagno por su muy buena predisposición y asesoramiento.

El Dr. Carlos Del Prado por su valiosa ayuda en el área de fotografía.

La Dra. Claudia Poleri, del Servicio de Patología del Hospital María Ferrer.

El Dr. Alberto Marcipar, del INTEBIO, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fé.

El Dr. Anders Orn, del MTC, Instituto Karolinska, Suecia.

El Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía y el Servicio de Patología del Hospital Santollani por la provisión de material.

Agradezco muy especialmente al kinesiólogo Alejandro Pereira, al Dr. Jorge Manrique y a la licenciada Silvia Gaudio, quienes lejos del entorno laboral me ayudaron mucho en lo personal y son para mí un ejemplo de profesionalismo.

INDICE

V. Agradecimientos

CAPITULO I: ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL PRESENTE ESTUDIO

3	Agente etiológico
5	Epidemiología
6	Enfermedad de Chagas
6	Enfermedad Aguda
7	Fase de latencia o indeterminada
7	Fase crónica
10	Antígenos del <u>T. cruzi</u>
13	Respuesta inmune al <u>T. cruzi</u>
16	Rol de las citoquinas en la infección por <u>T. cruzi</u>
16	Características y función de las citoquinas
16	Interferón- γ
17	IL-1
18	IL-2
19	IL-3
19	IL-4
20	IL-5
21	IL-6
22	IL-10
22	GM-CSF
23	G-CSF
23	M-CSF
23	TNF
23	Regulación de la producción de citoquinas en la infección por <u>T. cruzi</u>
25	Diagnóstico de la Enfermedad humana
27	Quimioterapia específica
27	Reacciones autoinmunes en la infección por <u>T. cruzi</u>

28	Perturbaciones de la respuesta inmune del huésped
28	Cambio de antígenos endógenos
29	Mimetismo molecular
29	Tolerancia inmunológica
32	Ruptura de la tolerancia como origen de autoinmunidad
33	Evidencias de mimetismo molecular en la Enfermedad de Chagas
35	Relación huésped parásito
35	Factores genéticos y ambientales
37	Factores regulatorios
37	Mecanismos de escape
38	Evasión del sistema complemento
38	Evasión de la respuesta del huésped durante la entrada a la célula
39	Evasión de la defensa después de la entrada
44	Objetivos
45	Tesis

CAPITULO II : COMPOSICION POLIPEPTIDICA Y ANTIGENICA DE LA FRACCION CITOSOLICA DEL T. CRUZI

47	Introducción
48	Materiales y métodos
48	Antígeno
48	Sueros
48	ELISA
49	Electroforesis en geles de poliacrilamida
49	Western blotting
50	Tinción para carbohidratos
51	Resultados
51	Análisis de la fracción citosólica de <u>T. cruzi</u> por electroforesis en geles de poliacrilamida
51	Identificación de glicoproteínas

51	Respuesta inmune humoral hacia la fracción citosólica del <i>T. cruzi</i>
51	Antígenos citosólicos del <u><i>T. cruzi</i></u> reconocidos por los sueros humanos
53	Conclusiones y discusión

CAPITULO III: ANALISIS INMUNOQUIMICO DE LOS COMPONENTES DE LAS FRACCIONES CITOSOLICA Y MICROSOMAL DEL *T. CRUZI*

59	Introducción
60	Materiales y métodos
60	Tratamientos de los antígenos
60	Oxidación con periodato
60	Tratamiento con tripsina
60	Reducción con 2Me
61	Calor
62	Resultados
62	Efecto de la modificación antigénica delCS de <u><i>T. cruzi</i></u> sobre el perfil de proteínas y sobre la antigénicidad
62	Efecto del ácido periódico
62	Efecto de la tripsinización
63	Efecto de 2Me
64	Efecto del calentamiento
64	Estudio de la estructura química de los antígenos microsomales de <u><i>T. cruzi</i></u>
64	Oxidación con ácido periódico
65	Efecto de la tripsina
65	Efecto del 2Me
65	Efecto del calentamiento
66	Conclusiones y discusión

CAPITULO IV: PRODUCCION, SELECCION Y CARACTERIZACION DE
ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-FRACCION MICROSOMAL DE T. CRUZI

74	Introducción
74	Materiales y métodos
74	Antígenos
74	Anticuerpos monoclonales
74	Fusión
75	Selección
75	Clonado celular
75	ELISA
77	SDS-PAGE
77	Western blotting
77	Dot blotting
77	Naturaleza glucídica de los epitopos reconocidos por los AcMo tratamiento de Mc con ácido periódico ELISA
78	Resultados
78	Producción y selección de hibridomas secretores de anticuerpos Ig G anti-Mc
78	Clonado de AcMo anti-fracción Mc de <u>T. cruzi</u>
79	Efecto de la desnaturalización sobre la capacidad de unión del anticuerpo al antígeno
79	Selección de antígenos citosólicos reconocidos por AcMo anti-Mc
79	Epitopos glicoproteicos
80	Conclusiones

CAPITULO V: MIMETISMO MOLECULAR EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

88	Introducción
90	Evaluación de la reactividad anti-tejidos
90	Materiales y métodos
90	Obtención y preparación de los tejidos
90	Ensayos de Dot blotting
90	Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción para azúcares
90	Western blotting
91	Resultados y discusión
91	Evaluación de la reactividad anti tejido
91	Composición polipeptídica e identificación de azúcares de tejido miocárdico y músculo esquelético humano
91	Ensayos de Western blotting
93	Clonado de los AcMo autorreactivos
94	Localización de antígenos tisulares con reactividad cruzada con <u>T. cruzi</u>
94	Materiales y métodos
94	Obtención de tejidos de mamífero
94	Reacción por inmunohistoquímica con avidina-biotina-peroxidasa
95	Resultados y discusión
96	Especificidad de la reactividad anti-tejido
96	A. Materiales y métodos
96	Reactividad anti-TCM
96	Ensayos de absorción
96	Resultados y Discusión
96	Reactividad anti-TCM
96	Ensayos de absorción
98	B. Materiales y métodos
98	Comparación del MIO humano, de hamster y murino
98	Resultados

99	C. Evaluación de la órgano especificidad de la reactividad de los AcMo
99	Materiales y métodos
99	Resultados
100	Caracterización de los AcMo autorreactivos
100	Inmunofluorescencia Indirecta
100	Materiales y métodos
100	Resultados
100	Determinación de isotipos
100	Materiales y Métodos
100	Resultados
101	Naturaleza glucídica de los epitopos autorreactivos
101	Resultados
102	Conclusiones y discusión

CAPITULO VI: RELEVANCIA BIOLOGICA DE ANTIGENOS CON REACTIVIDAD CRUZADA

116	Introducción
116	ELISA de inmunoinhibición
116	Materiales y métodos
116	Sueros
116	Antígeno
116	ELISA
118	Resultados
119	Conclusiones y discusión

**CAPITULO VII: ACUMULACION DE ARNm PARA CITOQUINAS E ICAM-1 EN
RATONES INFECTADOS CON DISTINTAS CEPAS DE T. cruzi**

123	Introducción
126	Materiales y métodos
126	Ratones y parásitos
126	Aislamiento y purificación de ARNm
126	Reacción de transcripción reversa
126	Reacción de amplificación en cadena (PCR cualitativo)
127	Reacción de amplificación en cadena (PCR cuantitativo)
127	Detección de los productos amplificados
128	Cálculos para la cuantificación de productos provenientes de PCR competitivo
129	Resultados
129	Acumulación de ARNm para citoquinas e ICAM-1
130	Conclusiones

CAPITULO VIII: ACTIVIDAD BIOLOGICA DE ANTIGENOS DEL T. CRUZI

136	Introducción
138	Síntesis de la labor desarrollada
141	Conclusiones del trabajo
143	Abreviaturas
144	Referencias

CAPITULO I

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL PRESENTE ESTUDIO

La Enfermedad de Chagas es una patología prevalente en una fracción importante de la población rural del continente americano desde tiempo inmemorial.

Más recientemente, la migración de poblaciones rurales a las ciudades, la generalización de las transfusiones sanguíneas y los progresos en la cirugía de trasplantes de órganos han llevado el riesgo de infección al medio urbano generalizando y amplificando su importancia como problema sanitario. Sin embargo, como tema de salud pública es un problema pasible de soluciones a corto y mediano plazo en la medida que investigadores, sanitaristas y autoridades entiendan que es posible desarrollar acciones integradas y programas efectivos.

AGENTE ETIOLOGICO

El agente etiológico de la Trypanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas es el Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi (Phylum Protozoa, Superclase Mastigophora, Orden Kinetoplastida) que en su ciclo de vida, es huésped alternado de insectos y mamíferos. En ambas etapas su especificidad de huésped es muy baja y, así como parasita numerosas especies de los géneros Triatoma, Pastronylus y Rhodnius de la Familia Reduviidae, infecta normalmente a miembros de, por lo menos, ocho órdenes distintos de mamíferos (Goble F.C., 1970).

Descrito originalmente en 1909 (Chagas), en su ciclo de vida el T. cruzi presenta distintos estadios fisiológica y morfológicamente distinguibles, caracterizados según el flagelo (su nacimiento junto al cinetoplasto, curso intracelular y punto donde emerge libre del citoplasma) y la posición relativa del cinetoplasto respecto del núcleo celular (Hoare C.A., 1972). En la luz del tracto intestinal del insecto los parásitos se multiplican extracelularmente como epimastigotes (flagelo emergente desde la región lateral anterior al núcleo) y se transforman en tripomastigotes metacíclicos (flagelo emergente desde el extremo apical posterior al núcleo), que se acumulan en la ampolla rectal y son excretados con las heces (Zeledon R. et al., 1977; Cox F.G.E., 1982). Los Reduviideos defecan durante e inmediatamente después de la alimentación, por lo que los tripomastigotes son excretados en el entorno del área picada por el insecto; este hecho y la respuesta refleja de rascarse después de la picadura favorecen la invasión del huésped mamífero (Romaña C., 1963).

Los tripomastigotes que penetraron a través de la piel o de las mucosas del mamífero pueden infectar cualquier célula del organismo. El mecanismo de esta infección fue estudiado in vitro en células en cultivo y es, esencialmente, el mismo en todos los casos (Hyde T.P. & Dvorak J.A., 1973): es un proceso activo que, además, involucraría la participación de sustancias quimiotácticas producidas por el huésped (Dvorak J.A. & Howe C.L., 1976), y que permite al tripomastigote llegar al citoplasma celular para diferenciarse a amastigote (sin flagelo evidente al microscopio óptico). Después de reproducirse por fisión binaria, el parásito se rediferencia en tripomastigote y escapa al líquido intersticial o a la sangre destruyendo a la célula huésped, varios días después de la infección (Zeledon R. et al., 1977; Dvorak J.A. & Hyde T.P., 1973).

Los tripomastigotes circulan en el torrente sanguíneo y, con él, pueden alcanzar cualquier parte del organismo e invadir otras células, fundamentalmente

las fibras musculares lisas, estriadas o cardíacas, o las células del sistema retículo endotelial (Stewart G.L. & Holmes Gianini S., 1982). Si bien no parasitarían las células nerviosas, si pueden hacerlo en las gliales (Tanowitz H.B. et al., 1982). La aparente predilección por algunos de estos tipos celulares hizo clasificar a los parásitos de distintas cepas en mio o reticulotrópicos, pero la base de este tropismo celular es desconocida y no siempre hay acuerdo entre los resultados in vitro e in vivo (Bice D.E. & Zeledón R., 1970; Alcántara A. & Brener Z., 1978; González Cappa S.M., 1981). Mas aún, hay antecedentes de que la selectividad podría cambiar durante el curso de la infección.

Como para muchos microorganismos que se replican intracelularmente en el huésped mamífero, el paso crucial para el establecimiento de la infección por *T. cruzi* lo constituye la penetración en las células del huésped que estaría mediada por un receptor (Pereira M.E., 1990). En los últimos años, se ha intentado identificar las moléculas de superficie del parásito implicadas en la penetración de la célula huésped. Diversas moléculas con pesos moleculares en el rango de 80 a 250 kDa derivadas del cultivo tisular con tripomastigotes han surgido como ligandos de receptores en la célula blanco (Alves M.J., 1986; Boschetti M.A., 1987; Devis C.D. & Kuhn R., 1990; Schenkman S. et al., 1991). Entre ellas se ha descrito una molécula con capacidad de ligamiento a la heparina de 60 kDa, denominada penetrina, que promueve la adhesión y penetración de los tripomastigotes en las células de mamífero (Ortega-Barria E. & Pereira M.E., 1991). Por otro lado, los tripomastigotes metacíclicos derivados de insectos o cultivos axénicos expresan un set de moléculas de superficie que no se encuentran en tripomastigotes sanguíneos o derivados de cultivos tisulares, tales como las moléculas de 90, 82, 75, 50 y 35 kDa (Araguth M.F. et al., 1982; Teixeira M.M.G. & Yoshida N., 1986; Yoshida N. et al., 1989). Más aún, los tripomastigotes sanguíneos y metacíclicos utilizan medios distintos para asociarse a la célula huésped y sus componentes (Ramirez M.I. et al., 1993). Esto no es sorprendente si se tiene en cuenta el hábitat de dichos estadios de desarrollo. Los tripomastigotes sanguíneos, durante su prolongada residencia dentro del huésped mamífero, encuentran una amplia variedad de tipos celulares y factores humorales, en cambio, el contacto de las formas metacíclicas con las células del huésped es transitoria. Varias observaciones sugieren que el ácido siálico juega un rol importante en la invasión por tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos. Se ha identificado una neuraminidasa en la superficie de tripomastigotes del *T. cruzi* y la inhibición de esta enzima por medio de anticuerpos monoclonales o lipoproteínas del suero aumentan la penetración a la célula huésped (Pereira M.E. et al., 1990; Prioli R.P. et al., 1990 y 1990).

Estos resultados sugieren que para invadir la célula huésped el parásito reconocería un receptor que contiene ácido siálico y la remoción de este carbohidrato por la neuraminidasa del parásito controlaría negativamente la infección. La neuraminidasa descrita tiene las características de una transialidasa (Schenkman S. et al., 1992, 1991; Umera H., 1992). La enzima transfiere el ácido siálico, unido en la posición α (2,3) de las glicoproteínas y glicolípidos del huésped, a aceptores del parásito que consisten en unidades B-galactosil terminales (Schenkman S. et al., 1992). Más aún, la invasión por tripomastigotes sanguíneos y metacíclicos de células mutantes en la expresión de ácido siálico en

su superficie es menos eficiente si se compara con la invasión a las células parentales (Schenkman S. et al., 1993).

Los tripomastigotes circulares son los responsables de cerrar el ciclo de transmisión, ya que son las formas que tomará otro insecto cuando se alimente con la sangre de un mamífero infectado. Al ingresar en el tracto digestivo del insecto, los tripomastigotes se diferencian hasta epimastigotes (intestino medio) (Zeledon R. et al., 1977).

Las distintas formas del parásito son cultivables in vitro en medios axénicos: desde hace muchos años para los epimastigotes (Winne de Martini G.J. et al., 1980) y, más recientemente, para tripomastigotes (Dusanic D.J., 1980) y amastigotes (Pan S.C., 1982).

EPIDEMIOLOGIA

En América latina existen cerca de 16 millones de infectados y decenas de millones de personas bajo riesgo de infección, especialmente en las áreas más pobres y rurales (Barreto M.P., 1979; WHO Technical Report, 1991). El área de dispersión de su agente etiológico corresponde al de los insectos vectores y abarca casi todo el continente: desde los Estados Unidos de Norteamérica (Farrar J.W. et al., 1963; Burkholder J.E. et al., 1980) hasta aproximadamente, el paralelo 42 de latitud sur en Chile y la Argentina.

La urbanización de la endemia chagásica y el desplazamiento del parásito hasta países no endémicos es consecuencia directa de las presiones socioeconómicas, que inducen fenómenos migratorios permanentes (WHO T.R. 1991; Dias J.C.P., 1992; Schmuñis G.A., 1991). Datos recientes dan cuenta de la presencia de 300.000 infectados en la ciudad de San Pablo, Brasil; 200.000 en Río de Janeiro y algo similar en Buenos Aires (WHO T.R., 1991).

La Enfermedad de Chagas transfusional también crece en importancia en todo el continente. Las tasas de prevalencia de donantes de sangre infectados por el T. cruzi es significativamente alta en todos los países endémicos, con grandes variaciones entre distintas regiones y grupos sociales examinados (Wendel S. & Dias J.C.P., 1992).

La transmisión congénita (connatal) de la Enfermedad de Chagas se ha descrito en varios países, especialmente en Chile, Argentina, Bolivia y Brasil. El riesgo de contraerla es variable, aparentemente próximo al 1% para hijos de embarazadas infectadas (WHO T.R., 1991; Zeledon R., 1975). Su tendencia es de progresiva disminución, en la medida en que las transmisiones vectorial y transfusional sean controladas y que disminuya la prevalencia de la infección entre mujeres fértiles (Dias J.C.P., 1992).

El control de la enfermedad humana es el desiderátum fundamental, contemplando la atención medicosocial de los individuos ya infectados y la interrupción de la transmisión del parásito al hombre, por lo que la actividad constante de las campañas de control tiene una importancia relevante en la limitación de la infección.

ENFERMEDAD DE CHAGAS

En la Trypanosomiasis Americana pueden distinguirse 3 estadios o formas clínicas: enfermedad aguda que se presenta en el 5% de los sujetos infectados. El 95% restante no presenta sintomatología o la presenta en forma inespecífica y constituye la fase latente, y la enfermedad crónica, que se hace aparente en el 30-40% de los pacientes (Lugones H.S. et al., 1979; Storino R. & Milei J., 1994).

Enfermedad aguda

Comprende la primoinfección parasitaria y el cuadro panvisceral de generalización. Si bien en la mayoría de los casos, la etapa aguda de la enfermedad es asintomática, pasando desapercibida (Andrade Z.A. et al., 1979), cuando se presentan síntomas clínicos, la enfermedad es letal en el 1% de los pacientes. Los casos más graves se producen en niños pequeños que se infectan durante el primer año de vida.

Cuando el parásito ingresa en los tejidos se desencadenan fenómenos inflamatorios inespecíficos ligados a la lisis celular resultante de la multiplicación intracelular del parásito. Simultáneamente, y sin aparente relación con los parásitos, comienzan a aparecer focos de infiltrados mononucleares, cuyo estudio detallado en miocardio y músculo esquelético murino mostró estar predominantemente compuesto por células T-CD8⁺, ausencia de células B y muy baja proporción de macrófagos y otros granulocitos (Sun J. & Tarleton R.L., 1993).

En la mayoría de los casos, los fenómenos inflamatorios del período agudo regresionan sin dejar secuelas (Andrade Z.A. et al., 1979).

La evidencia de puerta de entrada del parásito (chagoma de inoculación) es notable en una fracción importante de los casos agudos sintomáticos -75 a 100%- (Bocca Tourrés C., 1972; Lugones H.S. et al., 1979; Rassi A., 1979), ya sea en su presentación ocular (signo de Romaña) o cutánea, y constituye un elemento de alto valor diagnóstico. La sintomatología incluye: hipertermia con intensidad y duración variables; irritabilidad, cefalalgias y mialgias; astenia, anorexia y, a veces, somnolencia; dolores osteoarticulares; edemas de localización diversa, petequias y exantemas (esquizotripánides); adenopatías, satélites y/o generalizadas, hepato y esplenomegalia, sobre todo en lactantes e infantes y, ocasionalmente, diarreas y vómitos, también en lactantes (Basso G. et al., 1978).

En un alto porcentaje de casos -60 a 100%- (Bonet A.H. et al., 1968; Basso G. et al., 1978; Rassi A., 1979,) hay compromiso cardíaco (miocarditis o pancarditis aguda) y, en menor porcentaje -30%- (Libonatti E. & Magglio F., 1977), compromiso neurológico (que puede llegar a la meningoencefalitis); ambos se presentan con mayor frecuencia e intensidad entre los lactantes infectados, y su severidad guarda estrecha relación con el pronóstico. Algunos investigadores opinan que la agresión cardíaca y encefálica estaría presente en todos los casos aunque, en algunos, se mantendría inaparente (Bocca Tourrés C., 1972).

Dadas las características socio-económicas de la epidemiología de la enfermedad de Chagas, las cifras reales de mortalidad en fase aguda son difíciles

de definir, aunque es posible asegurar que no son altas: por ejemplo, sólo 3 de 73 casos agudos de un estudio longitudinal realizado durante 40 años en la región de Cuyo (Basso G. et al., 1978), ó 33 de 1232 casos en la experiencia de S. Mazza (Mazza S., 1949), aunque es posible que en este aspecto también jueguen las diferencias regionales.

Fase de latencia o indeterminada

Se trata de un período de la enfermedad caracterizada por los siguientes criterios:

- a) Presencia de cambios inmunológicos inducidos por la infección tripanosomíasis, reconocible por los cambios serológicos.
- b) Ausencia de expresión clínica de la enfermedad (síntomas o alteraciones reconocibles al examen físico o mediante otras exploraciones).
- c) Ausencia de alteraciones funcionales (eléctricas, contráctiles, disautonómicas).
- d) Esta fase cursa con un grado bajo de parasitemia y con cambios morfológicos que han sido hasta el presente registrados como leves o poco precisos (estudios forenses, biopsias endomiocárdicas).
- e) Posee un potencial evolutivo de un 15 a un 20 % de acuerdo con las diferentes series de población estudiadas para evolucionar a la fase crónica de cardiopatía y de megavísceras.

Fase crónica

La llamada forma crónica de la Enfermedad de Chagas afecta con grado variable de compromiso a distintos sistemas y aparatos del organismo. Los órganos más frecuentemente afectados son el corazón y los del tubo digestivo.

Hasta el presente no hay explicación definitiva de cuáles son los mecanismos etiopatogénicos, ni si éstos son comunes para los distintos órganos involucrados; ni siquiera se sabe si las formas crónicas son secuelas de la enfermedad aguda o manifestaciones tardías e independientes de la infección primaria. A este respecto, cabe señalar que la mayor prevalencia de patología en la fase crónica se presentaría en los pacientes que tuvieron manifestaciones clínicas durante la fase aguda (Pinto Dias J.C., 1982); y que existe una significativa correlación entre la forma clínica y el área geográfica de infestación, aunque se ignora si esta asociación se relaciona con la variabilidad de los parásitos, de los huéspedes, de las condiciones ambientales y nutricionales, de más de uno de estos factores y/o de otros aún desconocidos.

El compromiso cardíaco es la manifestación más frecuente y de mayor importancia de la forma crónica de la Enfermedad de Chagas en la Argentina (Mazza S., 1949; Rosembaum M.B. & Cerisola J.A., 1961; Bonet A.H. et al., 1968).

Por lo común, se manifiesta varios años después de adquirida la infección, a edades significativamente más tempranas que otras cardiopatías. En general, evoluciona en forma lenta, progresiva e irreversible, aunque puede detenerse pero no retroceder.

La expresión clínica de esta fase se caracteriza por la aparición progresiva de

alteraciones relacionadas con el sistema de conducción, disrritmias, disfunción autonómica, insuficiencia cardíaca y complicaciones tromboembólicas.

El exámen microscópico del tejido cardíaco revela áreas de fibrosis e infiltrados mononucleares sin relación con la presencia de parásitos, que sólo excepcionalmente llegan a detectarse en este período. Sin embargo el reciente desarrollo de técnicas de amplificación en cadena (PCR) para la detección de parásitos ha demostrado que casi todos los individuos infectados crónicamente tienen un bajo nivel de parásitos circulantes (Avila H. et al., 1992). Más aún, utilizando también técnicas de PCR se ha descrito una secuencia de DNA de 188-pb del *T. cruzi* que se encontraba en el corazón de individuos infectados que presentaran al mismo tiempo infiltrados inflamatorios y sintomatología cardíaca concordante con la Enfermedad de Chagas pero no en aquellos que no presentaban inflamación (Jones E.M. et al., 1993). Estos resultados sugieren que la presencia del parásito sería crítica en la patogénesis de la enfermedad aunque dicho tema es materia de controversia.

Como en el estadio agudo, los infiltrados inflamatorios de corazones de ratones infectados crónicamente están constituidos predominantemente por linfocitos T-CD8⁺. La proporción de linfocitos CD8⁺/CD4⁺ permanece constante en el curso de la infección con pocas células B y macrófagos presentes (Tarleton R.L. et al., 1994).

La tríada constituida por bloqueo avanzado de rama derecha, hemibloqueo anterior izquierdo (Moleiro F. & Mendoza I., 1980) y arritmia extrasistólica, aún cuando no específica, es altamente sugestiva de la cardiopatía chagásica dentro de un contexto clínico determinado. Son frecuentes las arritmias supraventriculares y especialmente las ventriculares, bajo la forma de latidos ectópicos ventriculares, bigeminismo, taquicardia ventricular sostenida o no sostenida y eventual fibrilación ventricular. La aparición de ondas "Q" patológicas han sido adscritas a áreas extensas de miocitolisis, a fibrosis confluyente o a alteraciones de la microvasculatura (Suárez C. et al., en prensa; Puigbó J.J. et al., 1966; Puigbó J.J. et al., 1968). Se ha demostrado también que la activación simpática puede producir constricción coronaria conducente a isquemia miocárdica (Mudge G.H. et al., 1976).

El compromiso del sistema nervioso autónomo conduce a insuficiencia autonómica de aparición temprana (Iosa D. et al., 1990; Puigbó J.J. et al., 1991), que en la esfera cardiovascular constituye la base de una desregulación de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial como resultado de alteraciones de los reflejos cardiovasculares. Esto conduce a numerosas manifestaciones clínicas tales como el presíncope, el síncope y la hipotensión ortostática. Debe así mismo entenderse que las interrelaciones entre la disautonomía, las disrritmias y las alteraciones de la contractilidad requieren todavía estudios más profundos.

Las serias alteraciones miocárdicas ya señaladas (inflamación crónica, fibrosis, hipertrofia de la fibra, miocitolisis, alteraciones de la microvasculatura, despoblación neuronal), conducen a alteraciones regionales de la contractilidad, cuya evolución patológica puede progresar desde la forma concéntrica a la forma excéntrica.

Las disquinesias regionales o el aneurisma apical pueden ser reconocidos clínicamente mediante la percepción de un latido telesistólico (Giordano H. et al.,

1982) o el empleo de los radionucleídos (Arreaza N. et al., 1983), del ecocardiograma (Acquatella H. et al., 1980) o el ventriculograma (Puigbó J.J. et al., 1968; Carrasco H.A. et al., 1982). Estas alteraciones regionales pueden progresar hasta hacerse difusas.

El término final evolutivo lo constituye la muerte súbita o la insuficiencia cardíaca congestiva aunada a manifestaciones de fibrilación auricular, tromboembolismo sistémico y pulmonar e insuficiencia valvular atrioventricular.

En el estudio de los aspectos clínicos se destaca la importancia del diagnóstico temprano del período presintomático de la cardiopatía chagásica crónica, pudiendo ponerse en evidencia una manifestación objetiva inicial de la enfermedad que puede expresarse como: a) disfunción sistólica segmentaria; b) disfunción autonómica; c) trastornos del sistema de conducción; d) disrritmias.

Finalmente todavía es necesario aclarar el papel desempeñado por la disfunción autonómica sobre la historia natural de la enfermedad y el beneficio obtenido por la intervención terapéutica basada en el empleo de los gangliósidos (Iosa D. et al., 1991; Puigbó J.J., 1992).

Los rasgos patológicos distintivos de la Enfermedad de Chagas son similares en todos los países de Centro y Sudamérica en los cuales es endémica. Los aspectos macroscópicos sobresalientes (Mignone C., 1958; Koberle F., 1961; Suárez J.A. et al., 1968; Suárez C. et al., 1976; Palacios-Pru E. et al., 1982; Suárez C., en prensa) son una importante cardiomegalia (peso promedio mayor de 55 g), asociada a una lesión apical característica constituida por un adelgazamiento parietal circunscripto o un aneurisma apexiano (60 % de los casos), casi siempre ubicada en el apex del ventrículo izquierdo, o con menor frecuencia en localización basal posterior o parietal (Suárez J.A. et al., 1968). Otros rasgos macroscópicos son la deformidad apical exterior (apex bífido), prominencia con adelgazamiento parietal a nivel del cono de la arteria pulmonar y el aspecto "en rosario" característico en el trayecto de las coronarias. Se presentan dos tipos morfológicos, los cuales han sido señalados tanto en Brasil, como en Venezuela: el tipo I (forma concéntrica), en el cual predomina la hipertrofia del ventrículo izquierdo con escasa o nula dilatación asociada, y la lesión apical cerrada; y el tipo II (forma excéntrica), en el que predomina la dilatación con amplia apertura de la zona apical y frecuente trombosis asociada.

Desde el punto de vista histológico, el único signo específico es el hallazgo del parasitismo de la fibra ("nidos de amastigotes"), lo cual puede demostrarse en un 20-30 % de los casos en las diferentes series estudiadas (Suárez C., 1976). Los rasgos histológicos esenciales son: infiltración celular densa, constituida predominantemente por células linfomonocíticas, hipertrofia de los miocitos, fibrosis del perimisio, del endomisio o "en parches", particularmente extensas en las formas avanzadas, necrosis de la fibra y áreas de miocitolisis, que han sido observadas con mayor frecuencia en presencia de nidos de parásitos. Se han descrito también alteraciones ultraestructurales y de la microvasculatura, así como alteraciones del endotelio y de la membrana basal (Suárez C. et al., en prensa). También existen alteraciones del sistema de conducción y de las células nerviosas autónomas.

Los trastornos neurológicos y digestivos de la enfermedad crónica incluyen parestias, parálisis, síntomas cerebelosos, disartria, anartria y megavísceras,

especialmente megaesófago y megacolon (De Rezende J.M., 1972).

El compromiso de los distintos componentes del tubo digestivo parece tener como denominador común la denervación focal del sistema nervioso autónomo (Koberle F., 1972). Se ha propuesto que la destrucción de algunas neuronas induciría el aumento del número de vesículas secretoras de neurotransmisores en las restantes neuronas, lo que resultaría en estímulos focales incoordinados que definirían zonas de hiperperistaltismo infructuoso y explicarían el desarrollo de megavisceras (Tafari W.L. & Almeida M.T., 1970; Andrade Z.E. & Andrade S.G., 1972). Esta hipótesis se apoya en evidencias farmacológicas: la administración de sustancias colinérgicas (metacolina, por ejemplo) a enfermos chagásicos indujo respuestas hiperreactivas de musculatura lisa (Vieira C.B. et al., 1964), además de sudoración, broncoespasmo y bloqueo aurículo-ventricular transitorio (Vieira C.B. & de Godoy R.A., 1964).

Estos resultados son coherentes con el conocido fenómeno de "hipersensibilidad por denervación", en el cual la falta de nervio o de sus terminaciones potencia los efectos de los neurotransmisores; y sugieren, además, que la destrucción neuronal no está limitada al tubo digestivo.

La reducción del número de neuronas del plexo mientérico en los enfermos chagásicos ha sido demostrada en esófago, estómago y duodeno, yeyuno, apéndice ileo-cecal y, colon y recto (De Rezende J.M., 1972). Aunque no se ha determinado una relación de proporcionalidad entre el número de neuronas destruidas y la disfuncionalidad, se ha propuesto que la aparición de síntomas requiere que la destrucción neuronal supere el 50% del contenido del plexo mientérico (Koberle F., 1972). Por otro lado, la necesidad de que el proceso de destrucción sea un fenómeno activo puede desprenderse del hecho demostrado de que el número de neuronas disminuye con la edad, sin que sea acompañado del desarrollo de megavisceras.

ANTIGENOS DEL TRYPANOSOMA CRUZI

La composición antigénica del T. cruzi es compleja y muchos de sus componentes forman parte de la interacción del parásito con el medio. Las diferentes formas del parásito son bioquímica, estructural y antigénicamente distintas. Desde el punto de vista antigénico se ha observado diferencias y similitudes entre los distintos estadíos (Snary D., 1980).

La superficie celular, primera y principal área de contacto del parásito con el huésped, ha sido ampliamente estudiada. Varias proteínas, glicoproteínas y otros componentes de la membrana celular han sido descritas como también los mecanismos involucrados en la respuesta inmune a las mismas. Sin embargo es difícil comparar y uniformar los datos publicados, entre otras razones por las variaciones inherentes a las diferentes cepas y clones estudiados, las condiciones de crecimiento, y cosecha de los parásitos, los métodos de ruptura y radiomarcado o los diferentes sistemas de detección (Búa J. et al., 1990). Hasta el presente no se ha informado sobre la presencia de variación antigénica en el T. cruzi (Snary D., 1980) como tampoco han sido descritos antígenos altamente inmunodominantes como en otros protozoarios, ej: plasmodium, (Zavala F. et al., 1983).

La existencia de diferentes poblaciones de T. cruzi en la naturaleza ha sido mencionada como causa de diferentes manifestaciones clínicas y de la respuesta a la quimioterapia (Brener Z., 1985). Los primeros estudios sobre antígenos se desarrollaron tratando de caracterizar distintas cepas de T. cruzi y se han descrito diferencias en este sentido (Nussenzweig V. et al., 1963; Gonzalez Cappa S.M. & Kagan I., 1969; Teixeira M.M.G. & Yoshida N., 1986; Búa J., 1990), aunque hasta el momento no ha sido posible establecer perfiles relacionables con la distribución geográfica de las formas clínicas de la enfermedad. Por otro lado, se ha demostrado que los aislados del parásito están formados por poblaciones heterogéneas (Engel J.C., 1982).

En cambio, se ha visto que existe una correlación entre parásitos taxonómicamente definidos por zimodemas y aquellos definidos por anticuerpos monoclonales (Miles M.A., 1985) y se ha demostrado diferencias intraespecíficas en términos de reactividad frente a anticuerpos monoclonales anti-fracción flagelar de epimastigotes (Rivas et al., enviado para su publicación). Varios estudios en los que se compararon las secuencias de genes aislados a partir de diferentes cepas de T. cruzi mostraron la existencia de secuencias repetidas en tandem casi idénticas entre los distintos aislados de parásitos (Frasch A.C.C. et al., 1991).

Entre un 20 y 30% de los individuos crónicamente infectados por el T. cruzi contraen la enfermedad con el compromiso de diferentes órganos. Varios autores han sugerido que el parásito podría inducir en el huésped fenómenos inmunes dirigidos contra componentes propios y que esta autoagresión estaría vinculada a la patología de la enfermedad (Koberle F., 1974; Ribeiro Do Santos R. & Hudson L., 1980; Ribeiro Do Santos R. & Hudson L., 1980; Sadigursky M. et al., 1982).

El fraccionamiento celular por centrifugación diferencial de epimastigotes a partir de parásitos rotos por presión y descompresión ha permitido separar antígenos relacionados con mecanismos protectivos y patogénicos. Mientras la fracción flagelar fue capaz de conferir protección contra la infección experimental (Gonzalez Cappa S.M. et al., 1980; Ruiz A.M. et al., 1985), las fracciones microsomal (Mc), (sedimento de 105.000 x g) y citosólica (CS), (sobrenadante de 105.000 x g) poseen la característica de inducir daño tisular semejante al resultante de la infección crónica experimental con el parásito (Ruiz A.M. et al., 1985). El empleo de estas fracciones subcelulares del T. cruzi para estudiar *in vitro* la respuesta inmune celular y humoral de los pacientes chagásicos (de Titto E. et al., 1983; 1985; 1987) permitió correlacionar la inmunorreactividad a ciertos componentes del parásito con la presencia de manifestaciones clínicas características de la forma crónica de la enfermedad. En particular, la fracción microsomal estimuló la proliferación de linfocitos periféricos de enfermos chagásicos con mayor especificidad que cualquier otra fracción ensayada (de Titto E. et al., 1983). Sin embargo, en dicho estudio la proporción de pacientes que respondió a Mc fue equivalente en pacientes asintomáticos, con síntomas leves y con cardiopatía severa, mientras una mayor proporción de cardiópatas chagásicos que de pacientes asintomáticos reaccionó con componentes citoplasmáticos del parásito (de Titto E. et al., 1985). Posteriormente se mostró que el contenido de anticuerpos séricos contra Mc pero no contra CS o la fracción flagelar de T. cruzi, era significativamente mayor en los cardiópatas chagásicos que en los pacientes

asintomáticos (de Titto E. et al., 1987). Más aún, fue posible verificar que entre los componentes polipéptidos de Mc, aquellos con peso molecular superior a 50 kDa eran más frecuentemente reconocidos por pacientes chagásicos crónicos con compromiso cardíaco severo que por aquellos sin manifestaciones cardíacas, diferencia que involucra un complejo grupo de antígenos (Dasso M. & de Titto E., 1992). Otros trabajos también mostraron que pacientes con cardiopatía severa presentaban anticuerpos reactivos con antígenos de Mc y especialmente contra dos polipéptidos uno de 25 kDa (Santos-Buch et al., 1985; Levin M. et al., 1989) y otro de 39 kDa (Levin M. et al., 1989). A fin de identificar los componentes de Mc responsables de los efectos patológicos se efectuó el subfraccionamiento de Mc empleando gradientes de densidad. Estas subfracciones fueron estudiadas por microscopía electrónica, se determinó su contenido de DNA y RNA, y su composición polipeptídica por electroforesis en geles de poliacrilamida (Esteva et al. resultados no publicados). Cuando fueron inoculadas en ratones endocriados CFW de 3 semanas de edad, el 55% de los ratones inoculados con la subfracción 1, una fracción rica en RNA, ribosomas y polirribosomas, presentaron ECG anormal en ausencia de parásitos, mientras que en los ratones inoculados con la subfracción 2, rica en DNA, vesículas y libre de membranas, hubo mayor prevalencia de miocarditis (Esteva et al. resultados no publicados). Estos resultados no sólo confirman que la inoculación de Mc induce miocarditis sino que ofrecen un camino para identificar componentes del parásito involucrados en el daño tisular. Se ha informado también que el parásito podría incorporar en su superficie antígenos de las células del huésped generando una respuesta autoinmune (Chess Q. et al., 1983).

La utilización de técnicas de inmunquímica y biología molecular se ha constituido en una herramienta muy importante para un mejor estudio de moléculas y componentes del parásito. En este sentido, la obtención de anticuerpos monoclonales ha contribuido a la identificación, caracterización y purificación de antígenos de interés biológico como también a la identificación de marcadores de diferentes cepas y aislamientos del parásito. Actualmente se han secuenciado varias proteínas de diferentes estadios del parásito, (Peterson D. et al., 1986; Ibañez C. et al., 1981; Dragón E.A. et al., 1987; Ruiz A.M. et al., 1987) e incluso ya se han modelado polipéptidos sintéticos a partir de sus secuencias.

La expresión de proteínas recombinantes ha sido utilizada para analizar la especificidad de los anticuerpos presentes en el suero en la infección chagásica humana (Ibañez C.F. et al., 1988; Affranchino J.L. et al., 1989; Lafaille J.J. et al., 1989; Levin M. et al., 1989). Más aún, se ha visto que los sueros provenientes de distintos períodos de la infección, reconocen antígenos diferentes (Ibañez C. et al., 1988; Affranchino J.L. et al., 1989). En la fase aguda de la infección el 87% de los pacientes presentaron una respuesta humoral hacia el antígeno SAPA (antígeno de fase aguda) pero no hacia otras proteínas recombinantes (Affranchino J.L. et al., 1989; Reyes M.B. et al., 1990). Sin embargo, a medida que se avanzaba en la infección, la especificidad humoral cambiaba desde una actividad anti-SAPA hacia la producción de anticuerpos dirigidos hacia las proteínas recombinantes 1, 2, 30 y 36. Por otro lado se ha demostrado que la mayoría de los pacientes chagásicos crónicos reconocían una proteína denominada cruzipaína (Frasch A.C.C. et al.,

1991).

La inducción de protección contra el T. cruzi ha constituido uno de los principales anhelos de muchos investigadores. El uso de parásitos atenuados, muertos, fracciones subcelulares, macromoléculas y otros flagelados análogos como inmunógenos ha sido el fundamento de todos estos estudios (revisado en Ruiz M. et al., 1994). Las características de la Enfermedad de Chagas han mostrado, sin embargo, que la obtención de antígenos protectores no es tarea fácil.

La simple y parcial protección contra el desarrollo de parasitemia dista mucho de constituirse en una inmunoprotección efectiva, sin embargo podría aumentarse con el uso de mejores antígenos, adyuvantes o protocolos de inmunización. En los últimos años hay consenso entre los investigadores para el desarrollo de buenos modelos experimentales que reproduzcan todas las etapas de la enfermedad, donde ensayar estos inmunógenos.

La posibilidad de una respuesta autoinmune remarca la necesidad de usar para vacunas preparaciones definidas, preferentemente antígenos puros, solos o mezclas de ellos. Una vacuna profiláctica debería ser totalmente inócua, aún si no se elimina totalmente la parasitemia. De hecho una carga parasitaria menor en la fase aguda resulta en una enfermedad crónica más leve (revisado en Frasch A.C.C. et al., 1991). Por lo tanto debemos considerar la posibilidad de que, aunque es obviamente deseable obtener una inmunidad esterilizante, no sería necesariamente el objetivo de una vacuna preliminar contra el T. cruzi.

RESPUESTA INMUNE AL TRYPANOSOMA CRUZI

Desde el inicio de la infección, la respuesta inmune defiende al huésped de la invasión parasitaria, para posteriormente establecerse un equilibrio con el parásito, que conduce a la cronicidad de la infección.

A pesar del papel claramente defensivo de la respuesta inmune, el huésped no logra eliminar totalmente al parásito. Esto puede deberse tanto a un nivel de respuesta insuficiente para la eliminación, como a mecanismos de escape del mismo. Aún así, es de destacar que se conocen casos de infección humana donde se repitan naturalmente episodios agudos en un individuo, a pesar de estar expuestos a reinfecciones; sin embargo, la posibilidad de que el nuevo contacto con el parásito aumente el riesgo de desarrollar manifestaciones patológicas, no ha sido descartado.

La infección por T. cruzi afecta en forma generalizada al sistema inmunológico, produciendo alteraciones inespecíficas que a su vez afectan las respuestas específicas al parásito.

Es posible identificar dos fenómenos que operan en la fase aguda de infección con estas características: una etapa temprana de activación policlonal de células B y T, seguida por una fase de inmunodepresión probablemente consecuencia de aquella. Este perfil bimodal es común a diversas infecciones bacterianas (Fleming B. & Rook G.A.W., 1982) y virales (Rosen A. et al., 1977), así como a algunos modelos de infección parasitaria. Es necesario destacar que no se conoce el valor biológico de estas alteraciones en el contexto de la Enfermedad de Chagas, aunque se ha postulado que los eventos de la fase aguda de la infección

determinan la evolución de la fase crónica de la misma (tesis doctoral J.C. Pinto Dias).

Se ha descrito una severa inmunodepresión en los pacientes durante la fase aguda de la infección (Teixeira A.R.L. et al., 1978) cuyo pico coincide con el de parasitemia. La participación de las prostaglandinas en la inducción de inmunodepresión es controvertida; la responsabilidad de estas como inmunomoduladores podría influir en el curso de la evolución de la parasitosis (Tarleton R.L., 1988). Se ha demostrado que ratones inoculados con una población parasitaria de baja letalidad aumentan significativamente los valores de PGE₂ sérica durante la infección aguda. Esto, unido al aumento de la letalidad en los ratones infectados con esta población de parásitos y tratados con aspirina así como la tendencia de inducir en este período valores de PGE₂ por debajo de los valores normales, apoyan la hipótesis que la producción de esta prostaglandina favorece el curso crónico de la infección por T. cruzi al modular la respuesta inmune (González Cappa S.M. et al., 1992). En la fase crónica se reestable la respuesta inmune, parcial o total, según el parámetro inmunológico estudiado. En experiencias in vivo e in vitro se han obtenido evidencias del funcionamiento de la respuesta inmune celular, aunque sólo una parte de los pacientes es respondedora. La capacidad proliferativa frente a diferentes preparaciones antigénicas ha sido correlacionada con el estado clínico del paciente (de Titto E. et al., 1983).

La importancia de la respuesta inmune en la resistencia a la infección chagásica se comprobó en los tratamientos inmunosupresores. Se ha reportado la agudización de infecciones tanto en pacientes chagásicos inmunosuprimidos (después de un trasplante renal) como en receptores no infectados que recibieron órganos de pacientes chagásicos (Andrade Z.A. et al., 1981). Observaciones similares se efectuaron en dos infectados chagásicos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Del Castillo M. et al., 1990; Gluckstein D. et al., 1992). En algunos casos los pacientes chagásicos tratados con medicación inmunosupresora intermedia no sufrieron alteraciones en la infección parasitaria ni signos histológicos de reactivación, y en otros casos con tratamiento semejante la infección se reagudizó (Barousse A.P. et al., 1980; Leiguarda R. et al., 1990).

El papel de la respuesta inmune en la resistencia se ha demostrado experimentalmente por la mayor gravedad de la infección de ratones genéticamente-quirúrgica- o farmacológicamente inmunodeficientes. El defecto de linfocitos T de estos animales así como de los ratones timectomizados, convierte en letales a dosis de parásitos que no lo serían en animales normales. La transferencia de poblaciones celulares enriquecidas en linfocitos T y B protege frente al desafío con diferentes cepas de T. cruzi (Trischman T.M & Bloom B.R., 1980). Tanto las células T-CD4⁺ como-CD8⁺ intervienen en el control de la parasitemia. La depleción de estas células resulta en un aumento de la sensibilidad a la infección tanto en animales resistentes como sensibles, aunque modera la inflamación durante la fase aguda (Araujo F.G., 1989; Tarleton R.L., 1990). Sin embargo, la depleción continua de células CD8⁺ y /o CD4⁺ resulta en la exacerbación de la patología y en el aumento de la carga de parásitos en el tejido miocárdico tanto en las fases postaguda como crónica (Tarleton R.L. et al., 1994). Además, la transferencia de

linfocitos Lyt2+ y L3T4+ provenientes de ratones crónicamente infectados con la cepa CA-1 de T. cruzi indujo lesiones neuromusculares (González Cappa S.M. et al., 1993). Más aún, los sueros provenientes de los dadores presentaron reactividad específica hacia tejidos del Sistema Nervioso (SN), la cual se va desplazando desde el SN periférico hacia el SN central (González Cappa S.M. et al., 1993). Por otro lado, la transferencia pasiva de anticuerpos de un animal protegido a un animal singeneico protege al receptor contra el parásito. La magnitud de la protección depende de la cepa de parásitos empleados para desafiar a los animales y de la antigüedad de la infección (Kagan I.G. & Norman H., 1962).

En los sujetos infectados los anticuerpos específicos se conservan a lo largo del período crónico de la enfermedad y su existencia en circulación se conoce desde que los primeros investigadores detectaron anticuerpos fijadores de complemento, siendo su detección el criterio diagnóstico de certeza de infección por T. cruzi (Cerisola J.A. et al., 1970).

En diferentes trabajos, se ha correlacionado la resistencia con la presencia de anticuerpos citofílicos para macrófagos o líticos para el parásito. Krettli et al. demostraron que en el suero del hospedador crónicamente infectado, existen anticuerpos capaces de aglutinar y otros capaces de mediar la lisis de los parásitos por acción del complemento (Krettli A.U. & Brener Z., 1982). Esta capacidad lítica ha sido demostrada en anticuerpos presentes en ratones inmunizados con fracciones de parásitos (Enfermedad de Chagas y otras parasitosis, Manual de Laboratorio, INDIECH., 1993) y en AcMo provenientes de células esplénicas de ratones inmunizados con fracciones de epimastigotes (Yoshida N., 1986) o con tripomastigotes metacíclicos (Segura E.L. et al., 1986).

Los anticuerpos involucrados en las reacciones de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos podrían estar involucrados en la protección y estas reacciones tienen bajos requerimientos de anticuerpos, son llevadas a cabo por células normales que están disponibles en alta concentración en el organismo, y llevan a la destrucción rápida y efectiva del blanco.

Otros mecanismos inmunes demostrados en la infección por T. cruzi se suman a linfocitos T y anticuerpos en la relación huésped-parásito. Así, la presencia de interferón alfa-beta en el suero de animales infectados se detecta después del primer día de infección; por su influencia en la evolución de la infección (puede activar macrófagos o aumentar la capacidad de ejercer actividad NK) este es un potencial mecanismo efector.

Por otro lado, las células fagocíticas cuentan con varios mecanismos citotóxicos que pueden ser dependientes o independientes del oxígeno consumido durante el incremento del metabolismo celular. La sensibilidad de las distintas formas de este parásito se debe a que no poseen catalasa y son parcialmente deficientes en superóxido dismutasa y peroxidasas, enzimas con las que están equipadas las células del hospedador.

ROL DE LAS CITOQUINAS EN LA INFECCION POR T. CRUZI

Las citoquinas son proteínas que median muchas de las señales intracelulares requeridas para producir una respuesta integrada a una variedad de estímulos externos. Están involucradas en la regulación de la hematopoyesis, linfopoyesis y en la regulación de la respuesta inmune: el inicio, duración y constitución son determinados por la acción de las citoquinas.

La infección por T. cruzi, como la mayoría de las infecciones parasitarias, produce en el huésped numerosos trastornos inmunológicos. Es un parásito antigénicamente complejo así como su ciclo de vida con diferentes estadios.

Además de esto, aunque es capaz de desencadenar una respuesta inmune en el huésped, ha desarrollado diversas formas de evadir las consecuencias de la misma. El curso de la infección es largo y conlleva a una enfermedad crónica, con el desarrollo de una variedad de respuestas inmunes por el huésped que son insuficientes para eliminar totalmente al parásito. Esto lleva frecuentemente a cambios inmunopatogénicos.

El hecho de que la inmunidad y la patología sean controladas por la producción de citoquinas acercan mediante el estudio exhaustivo de las mismas la posibilidad de entender el rol de la respuesta inmune en la Enfermedad de Chagas.

Características y función de las citoquinas.

Interferón- γ (IFN- γ). El IFN- γ fue originalmente identificado como un agente antiviral y se lo distingue de IFN- α y β (IFN tipo I) por su sensibilidad a pH 2 y su relativa estabilidad a 56°C. El IFN- α provenientes de leucocitos, y el IFN- β , proveniente de fibroblastos son producidos durante infecciones virales o bacterianas mientras el IFN tipo II o IFN inmune (IFN- γ) es producido por linfocitos T estimulados antigénicamente o por mitógenos, células CD4⁺ y CD8⁺, células agresoras naturales (NK) y otras CD3⁺ producen IFN- γ (Sandvig S. et al., 1990).

El gen para IFN- γ murino codifica para una proteína de 136 aminoácidos, 10 menos que la proteína humana, con una homología del 40% y sin actividad cruzada entre especies.

Los receptores para IFN- γ han sido bien caracterizados y hasta la fecha todas las células humanas testeadas en su capacidad de unión al IFN- γ han sido positivas (Hamblin A.S., 1988; Smith M.R., 1990).

Además de su actividad antiviral, el IFN- γ aumenta la actividad citotóxica del factor necrosante de tumores (TNF) e induce en los tejidos blancos la expresión de moléculas del CMH clase I y II. También activa a los macrófagos en la necrosis de tumores y aumenta la actividad citotóxica de las células NK (Kelso A., 1989). La importancia del IFN- γ en la infección por T. cruzi y por otros parásitos radica en su potente capacidad para activar a los macrófagos. Se ha visto que el IFN- γ es capaz de activar a los macrófagos tanto en la eliminación intracelular de amastigotes de Leishmania major (Nacy C. et al., 1985), como de tripomastigotes de T. cruzi (Wirth

J.J et al., 1985). También aumenta la asociación célula - parásito y, cuando se administra in vivo, reduce la parasitemia y aumenta la sobrevivencia del ratón infectado (Plata F. et al., 1987).

Interleuquina-1 (IL-1). Diversos tipos celulares producen IL-1, incluyendo monocitos, macrófagos, keratinocitos de la piel, células endoteliales, células mesangiales, astrocitos, células gliales, células NK, células dendríticas, fibroblastos y neutrófilos. Se han aislado dos formas tanto en ratones como en el hombre: IL-1 α e IL-1 β . Ambos productos maduros presentan pesos moleculares de alrededor de 17 kDa. La característica más distintiva entre ambos es la diferencia en el punto isoeléctrico, que es de 5.0 para la IL-1 α y de 7.0 para la IL-1 β . La IL-1 α y -1 β son productos de dos genes distintos, inicialmente dos propéptidos de 270 y 269 aminoácidos que por clivaje originan los productos finales de 159 y 153 aminoácidos respectivamente (Kelso A., 1989).

Ambas interleuquinas median su acción a través de dos tipos distintos de receptores (Solari R., 1990). El receptor para IL-1 de tipo I es una proteína de 80 kDa que pertenece a la superfamilia de Ig, y presenta tres dominios extracelulares similares a los dominios de las Ig, un dominio corto de transmembrana y un dominio intracitoplasmático relativamente largo (215 aa). El receptor para IL-1 de tipo II pertenece también a la superfamilia de Ig, con un dominio extracelular, un único dominio de transmembrana y un dominio citoplasmático corto de 29 aminoácidos.

Estos dos receptores presentan diferente distribución tisular, expresándose el tipo I en cerebro y timocitos; y el tipo II en médula ósea. Entre las funciones de la IL-1 se destacan: activación de células T, al actuar como señal de coestimulación con antígenos o mitógenos, inducción de la expresión de receptores para IL-2, inducción de la síntesis de prostaglandinas E2 y TNF por los macrófagos, inducción de la producción de IL-6 e IFN- γ , estimulación del crecimiento y proliferación de células T y B, aumento de la actividad citotóxica de las células NK, inducción de la expresión de moléculas de adhesión por las células endoteliales, modulación de las funciones de reparación posteriores a un daño, inducción de fiebre y proliferación de fibroblastos y síntesis de colágeno. Algunas de estas actividades de la IL-1 pueden relacionarse con fenómenos patológicos: el aumento en la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales vasculares en cultivo llevaría a un aumento en el tráfico de linfocitos y neutrófilos hacia los sitios de inflamación. Esto es de particular importancia en la infección por T. cruzi ya que mecanismos inmunológicos estarían involucrados en la fisiopatología de la enfermedad crónica.

Se ha visto que el cocultivo del T. cruzi con células mononucleares periféricas humanas induce la expresión de RNA mensajero para IL-1 β , detectándose además niveles considerables de IL-1 bioactiva en el sobrenadante proveniente de dicho cocultivo (Van Voorhis W. et al., 1992). Las células endoteliales humanas infectadas con el parásito, a diferencia de las no infectadas producen niveles significativos de IL-1 β (Tanowitz H.B. et al., 1992). Se ha demostrado también que la IL-1 β induce en células endoteliales la expresión de

RNA mensajero para IL-1 β , CSF-1 e IL-6 (Mantovani A. et al., 1989). Por lo tanto, la expresión de IL-1 β proveniente de células endoteliales infectadas puede causar la producción adicional de citoquinas. Más aún, se ha visto que la IL-1 β induce la producción de prostaciclina por las células endoteliales (Dejana E. et al., 1984; Rossi V. et al., 1985) y que las células endoteliales infectadas con T. cruzi tienen aumentado el nivel de prostaciclina (Tanowitz H.B. et al., 1990). Además se han detectado niveles aumentados de tromboxano A₂ en ratones infectados con T. cruzi, lo cual explicaría la hiperreactividad de plaquetas y el espasmo microvascular observados en la enfermedad chagásica aguda de miocardio. Las propiedades antitrombóticas de las células endoteliales pueden ser alteradas por la IL-1 β , disminuyendo el activador de plasminógeno y aumentando la producción del factor inhibidor de plasminógeno (Bevilacqua M.P. et al., 1984; Nachman R. et al., 1986;).

Esta alteración, documentada en la infección por rickettsias (Raoult D. et al., 1987), puede resultar en la formación de trombos.

Interleuquina-2. Es un único péptido de 15.5 kDa, producido por las células T pocas horas después de la estimulación mediada por el receptor T. Las células NK y los linfocitos granulares gigantes también producen IL-2. Si bien la IL-2 está naturalmente glicosilada y contiene ácido siálico, el carbohidrato no parece tener un rol esencial en la actividad del péptido ya que la IL-2 recombinante no glicosilada es igualmente efectiva para inducir la proliferación de células T. (Hatakeyama M., 1990).

La IL-2 produce su acción a través de un receptor específico y saturable encontrado principalmente en células T, B, NK y linfocitos citotóxicos activados por IL-2 (células LAK). El receptor es un heterodímero compuesto por una subunidad α de 55 kDa y una subunidad β de 70 kDa. Mientras que la subunidad β se expresa en las células T en reposo la expresión de la subunidad α debe ser inducida por estimulación mitogénica (Hatakeyama M., 1990). Aunque los mecanismos de transducción de señales de la IL-2 no han sido aclarados aún del todo, se sugiere que la alta afinidad de unión induciría la fosforilación de la subunidad B y otros sustratos proteicos específicos. Estos eventos de fosforilación involucran la actividad de una proteína quinasa C. Se ha identificado también una forma soluble del receptor, secretado por células T activadas. El receptor soluble para IL-2 ha sido utilizado como marcador de células T en desórdenes autoinmunes, tumores, rechazo de injerto y enfermedades infecciosas. La medición del receptor soluble puede servir para monitorear la severidad y progresión de la enfermedad, así también como la eficacia del tratamiento (Symons J.A. et al., 1988)

La IL-2 es producida por las células T activadas por mitógenos, aloantígenos o antígenos presentados en contexto de la molécula adecuada del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Tal vez el efecto más importante de la IL-2 es la estimulación autócrina o parácrina de las células T que expresen el receptor para IL-2. Además de inducir la proliferación de las células T, la IL-2 participa en la actividad tumoricida y crecimiento de las células NK y LAK, crecimiento de células B y producción de Igs, aumento de la producción de IFN- γ , inducción de la

producción de IL-6 en monocitos humanos, modulación de la liberación de histamina por basófilos estimulados y modulación de la expresión del receptor para IL-2 .

La IL-2 no es producida por células de bazo provenientes de ratones en etapa aguda de la infección por T. cruzi (Harel-Bellán A. et al., 1983; Tarleton R. et al 1984; Harel-Bellán A. et al., 1985; Tarleton R., 1988). Sin embargo, la incubación de estas células con inhibidores de la ciclooxigenasa pueden restaurar parcialmente su habilidad para producir IL-2 luego de la estimulación con concanavalina A (Tarleton R.L., 1988). Sin embargo, la producción de IL-2 no aumenta si se precultivan las células con el parásito durante 48 horas (Tarleton R.L., 1988). Estos resultados sugieren la posibilidad de que la supresión en la producción de IL-2 in vitro sea el resultado del agotamiento de células T in vivo inducido por el parásito, o la presencia de poblaciones T supresoras inducidas por algún antígeno parasitario.

Así mismo es posible también que antígenos del parásito interfieran específicamente en el mecanismo de producción de citoquinas; sin embargo no existe evidencia directa que sustente esta posibilidad.

Interleuquina-3 (IL-3). La IL-3 es normalmente incluida entre los factores estimuladores de colonias debido a su actividad como factor de crecimiento hematopoyético; sin embargo se distingue del resto de estos factores por presentar un espectro más amplio de actividad biológica (Nicola N.A. & Vadas M., 1984).

Es producida por células TC 1 y TC 2, células NK y células cebadas (Yokota T. et al 1984; Mossman T. et al., 1986; Otsuka T. et al., 1987). Algunas evidencias sugieren que habría dos receptores para la IL-3, con baja y alta afinidad respectivamente

Involucrada principalmente en el crecimiento y diferenciación de los lineajes hematopoyéticos cumple también un rol importante en la respuesta inflamatoria. Así se ha visto que la IL-3 es capaz de inducir a macrófagos peritoneales a expresar antígenos de clase II del CMH y moléculas LFA-1, y de actuar sinérgicamente con otros agentes para aumentar la producción de IL-1. Además, estimula la diferenciación y activación de eosinófilos produciendo la liberación de mediadores de inflamación incluyendo leucotrienos (Kelso A., 1989).

Ya que la IL-3 es producida en grandes cantidades por las células T activadas, posiblemente tenga un rol importante en la rápida expansión de células hematopoyéticas necesaria en respuesta a una activación antigénica del sistema inmune; por lo tanto, la incapacidad de las células infectadas con T. cruzi para producir IL-3 podría traer aparejada importantes consecuencias en el curso de la infección.

Interleuquina-4 (IL-4). Es una citoquina con un tamaño aproximado de 20 kDa codificada en el cromosoma 5 humano, en la misma región que codifica a la IL-3, IL-5, GM-CSF, CSF-1 y a su receptor, CSF-1R, y producida por las células T y algunas células cebadas. El receptor para IL-4, un miembro de la familia de receptores para citoquinas, se expresa en linfocitos T, B, monocitos, células mieloides, fibroblastos y células endoteliales y su expresión es regulada por la propia IL-4.

Inicialmente se describió como un coestimulador de células B participando en el cambio de subclases de Ig. En células B murinas estimuladas con LPS la IL-4 facilita el cambio de subclase hacia IgG1y a altas concentraciones hacia IgE mientras suprime concomitantemente la producción de IgM, IgG3, IgG2a e IgG2b. La IL-4 aumenta también la expresión de moléculas de clase II del CMH y del receptor de baja afinidad para IgE en células B en reposo.

La actividad de la IL-4 no se restringe sólo a las células B sino que actúa también sobre células T, macrófagos, granulocitos, células cebadas, precursores de eritrocitos y megacariocitos. Actúa como factor de crecimiento sobre células T humanas y murinas e induce además la expresión de receptores de alta afinidad para IL-2 y la producción de IL-2 (Solari R., 1990; Vercelli D. et al., 1990).

Son pocos los estudios realizados sobre el rol de la IL-4 en la infección por T. cruzi. En un estudio, macrófagos murinos pretratados con IL-4 in vitro por 24-48 hs aumentaron la ingestión y muerte de amastigotes pero no de tripomastigotes (Wirth J.J. et al., 1988). El tratamiento de los macrófagos con IL-4 después de la infección de los mismos aumentó la destrucción intracelular de amastigotes. Sin embargo el IFN- γ posee una mayor capacidad para estimular a los macrófagos para la muerte intracelular de los parásitos. Estos resultados sugieren que la IL-4 tendría un efecto mínimo en el establecimiento de los tripomastigotes dentro del macrófago. En otro estudio, el tratamiento con anticuerpos anti IL-4 de células EL 4 estimuladas con PMA inhibió la activación de los macrófagos mediada por el INF- γ (Golden J.M. & Tarleton R.L., 1991). Sin embargo, la IL-4 sola produjo un pequeño aumento en la infección parasitaria in vitro, y no aumentó significativamente la habilidad del IFN- γ para activar al macrófago en la muerte intracelular del parásito. Por lo tanto, el rol de la IL-4 en la infección por T. cruzi no ha sido aún aclarado.

Interleuquina-5. Es una citoquina producida por ciertos linfocitos CD4 activados y mastocitos activados. Tiene un tamaño de aproximadamente 20 kDa. Puede actuar (al menos en el ratón) sinérgicamente con otras citoquinas (IL-2 e IL-4) promoviendo la proliferación y la diferenciación de los linfocitos B. Estimula la proliferación y la diferenciación de los eosinófilos. Induce también la activación de los eosinófilos maduros para convertirlos en citotóxicos de ciertos parásitos (helmintos).

Aunque existe evidencia que sugiere la existencia de receptores para IL-5 con baja y alta afinidad es poca la información disponible sobre las características de los mismos. (Fainboim L. & Satz M., 1992)

Se trata de una citoquina potente y la producción apropiada de la misma puede ser importante en la resistencia en enfermedades infecciosas. Su producción podría ser de particular importancia en la infección murina por T. cruzi debido a su capacidad para estimular la producción de anticuerpos antígeno específico en ratones primados con el antígeno en estudio, inducir la producción de anticuerpos in vitro a partir de células B activadas y porque puede inducir a las células T para convertirse en citotóxicas.

Interleuquina-6. Se origina en fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, monocitos/macrófagos, líneas T, mastocitos y una variedad de líneas tumorales. Desde el punto de vista inmunológico, las células accesorias representan la mayor fuente de producción de IL-6. Los linfocitos T y B pueden producir algo de IL-6, en especial los que infiltran los tejidos sinoviales reumatoides.

La IL-6 es una citoquina de 26 kDa codificada por un gen en el cromosoma 7 humano. Tiene un promotor que es rápida y transitoriamente activado por otras citoquinas (IL-1 y TNF). El receptor para la IL-6 se expresa en células linfoideas y no linfoideas, siendo una glicoproteína de 449 aminoácidos con un peso molecular de 80 kDa. Las células normales no producen constitutivamente IL-6, pero su expresión es fácilmente inducida por infecciones virales. Diversas citoquinas estimulan la producción de IL-6: TNF, IL-1, factor estimulador de colonias granulocítico- macrófágico (GM-CSF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

La IL-6 juega un papel central en la respuesta inmune, induciendo la diferenciación de células B en células plasmáticas. Actúa en forma sinérgica con la IL-1 en la activación de los linfocitos T y en la inducción de los linfocitos T citotóxicos. Además estimula en el hígado la producción de las proteínas de fase aguda. Este fenómeno es observado no sólo en las infecciones sino también en injurias tisulares o asociado con el desarrollo de tumores malignos. La reacción se caracteriza por fiebre, leucocitosis, aumento de la permeabilidad capilar, alteraciones en la concentración de esteroides y un balance nitrogenado negativo.

En la hematopoiesis actúa sinérgicamente con la IL-3 sobre la célula troncal, reduciendo la duración del estadio G0. Se ha observado también un efecto sinérgico con GM-CSF y con M-CSF (Van Snick J., 1990).

En diversas infecciones por protozoarios se han observado modificaciones en los niveles de la IL-6 (Kern P. et al., 1989; Grau G.E. et al., 1990; Titus R. et al., 1992; Schlüter D. et al., 1993). Las células endoteliales y los monocitos adherentes infectadas con T. cruzi producir IL-6 in vitro (Tanowitz H. et al., 1992; Van Voorhis W., 1992). Por otro lado, los ratones infectados con T. cruzi gatillaron la producción endógena de IL-6 durante la fase ascendente de la parasitemia. La inoculación de anticuerpos monoclonales anti-IL-6 en ratones infectados aumentaron paradójicamente los niveles de IL-6. Este aumento transitorio en los niveles circulantes de IL-6 no modificó los niveles de anticuerpos anti-T. cruzi específicos como así tampoco el nivel de parásitos en sangre o tejidos y el curso final de la infección. Sin embargo, se retrasó la mortalidad de los ratones y aumentó los niveles del componente amiloide P del suero (SAP), proteína de fase aguda.

Estos resultados sugieren que la IL-6 atenuaría el daño tisular subsecuente a la infección aunque no contribuiría en la eliminación del parásito. La inducción de proteínas de fase aguda sería importante en la protección contra el daño tisular mediado por el fenómeno inflamatorio (Truyens C. et al., 1994).

Interleuquina-10. Es una proteína de 17 kDa producida por las células TC2, a la que inicialmente se llamó factor inhibidor de la síntesis de citoquinas, porque inhibía la producción de IL-2 e IFN- γ por las células TC2.

Es una molécula con funciones pleiotrópicas: aumenta la proliferación de timocitos murinos en respuesta a la IL-2 o IL-4, disminuye la expresión de antígenos de clase II del CMH en monocitos, inhibe la síntesis de IFN- γ , IL-2 y otras citoquinas producidas por las células TC1, suprime la liberación de TNF α por los macrófagos y actúa sinérgicamente con las IL-3 e IL-4 sobre la viabilidad de líneas de células cebadas (Fainboim L. & Satz M., 1992)

En el caso de la infección por T. cruzi, la producción de IL-10 podría afectar considerablemente la respuesta inmune hacia el parásito, por su capacidad de inhibir la liberación de citoquinas, en particular el IFN- γ , la citoquina importante en la resistencia a la infección. Además es posible que la producción de IL-10 sea responsable en parte de la supresión en la síntesis de IL - 2 observada durante la primer etapa de la infección.

Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos

(GM-CSF). El factor estimulador de granulocitos y macrófagos es una glicoproteína de 14-35 kDa producido por células del estroma, células T, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y células cebadas. Afecta principalmente células progenitoras granulocíticas (neutrófilos y eosinófilos) y monocíticas. Participa en la activación de macrófagos y monocitos aumentando su actividad citotóxica, la expresión de antígenos de clase II del CMH, la presentación antigénica y la producción de IL-1 y TNF- α . La actividad del GM-CSF sobre los neutrófilos resulta en la degranulación y en el aumento de la citotoxicidad mediada por anticuerpos, fagocitosis y producción de superóxidos. También induce la expresión de moléculas de adhesión.

En algunos casos, la unión de una citoquina a su receptor puede resultar en una modulación negativa de la expresión de su propio receptor y también de receptores de otras citoquinas. Por ejemplo la IL-3 modula negativamente la expresión de su propio receptor y también los receptores para GM-CSF, G-CSF y M-CSF. Por el contrario, GM-CSF no parece afectar la expresión del receptor para IL-3 pero modula la expresión del receptor para G-CSF y M-CSF (Kelso A., 1989).

En la infección por T. cruzi se ha visto que el GM-CSF murino activa a los macrófagos para inhibir la replicación del parásito y aumenta en 14 o 15 veces la liberación de peróxido de hidrógeno (Reed S.G. et al., 1987). Estudios usando GM-CSF e IFN- γ murino mostraron que el grado de inhibición en la replicación del T. cruzi producido después de la incubación con el GM-CSF fue menor que el obtenido después del tratamiento con IFN- γ (Reed S.G. et al., 1987). Se ha observado también que el GM-CSF recombinante humano inhibe *in vitro* la replicación del T. cruzi en macrófagos y monocitos de sangre periférica hasta un 75 %. Así, el GM-CSF murino y humanos son potentes activadores de macrófagos y la capacidad de los linfocitos T para producir GM-CSF además del IFN- γ durante la infección por T. cruzi es potencialmente de gran importancia en la protección del

huésped.

Factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF). Es una glicoproteína de 19-20 kDa producida por fibroblastos, macrófagos y células endoteliales luego de la estimulación por IL-1 o TNF, y por monocitos estimulados con endotoxinas. Induce el crecimiento de células progenitoras granulocíticas y actúa sobre los neutrófilos aumentando la producción de superóxidos, la actividad citotóxica mediada por anticuerpos y la fagocitosis (Kelso A., 1989).

Factor estimulador de colonias de monocitos y macrófagos.

(M-CSF). Se lo encuentra en dos formas homodímeras de 70 - 90 y 40 - 50 kDa provenientes de un splicing diferencial del RNA mensajero. Esta citoquina es producida por diversos tipos celulares y promueve el crecimiento de células progenitoras monocíticas y la actividad citotóxica de macrófagos. Es el único factor estimulador de colonias al que se le ha identificado el receptor, el producto del protooncogen c-fms (Kelso A., 1989).

Factor de necrosis tumoral (TNF). Los factores de necrosis tumoral α y β poseen habilidades similares en lo que respecta al proceso inflamatorio y la actividad antiviral tanto in vivo como in vitro.

El TNF- α , una proteína de 17 kDa que se presenta en forma multimérica con dos o tres subunidades idénticas y con varios sitios de glicosilación. El TNF β presenta un peso molecular de 20-25 kDa que se presenta en forma monomérica pero puede agregarse formando multímeros de alto peso molecular similares a los del TNF- α .

El TNF- α es producido principalmente por monocitos, macrófagos, células T y células NK activadas mientras que el principal origen del TNF β son las células T activadas. En el sistema humano y murino se han identificado dos receptores de 55-60 kDa (Loetscher H. et al., 1990) y 75-80 kDa que se unen al TNF- α y TNF- β respectivamente. También se han identificado las formas solubles para ambos receptores.

Algunas de las acciones superpuestas de ambos factores incluyen la necrosis de sarcomas, la inducción de la expresión de antígenos de clase I y II del CMH, moléculas de adhesión y receptores de la familia de Ig en células epiteliales secretorias, la activación de leucocitos polimorfonucleares, la activación de osteoclastos y reabsorción en médula, la citostasis e inducción de la proliferación celular y la regulación de la actividad lipasa y de la actividad antiviral. Sin embargo a diferencia del TNF- α , el TNF- β es incapaz de inducir la actividad de factor de crecimiento hematopoyético a partir del cultivo de células endoteliales. Además el TNF- α es el principal mediador en el shock tóxico y actúa sinérgicamente con otras citoquinas. Comparte también algunas acciones con la IL-1, además de inducir su liberación y la de otros factores de crecimiento a partir de diversos orígenes (Smith M.R., 1990; Kindler V. et al., 1989).

El I. cruzi es un potente inductor de la producción de TNF. Los

tripomastigotes vivos estimulan más eficientemente que los epimastigotes y los parásitos muertos (Tarleton R.L. et al., 1988). No es sorprendente que la infección con T. cruzi induzca la producción de TNF ya que se ha comprobado que los macrófagos, células productoras de TNF, son activados durante la infección (Nogueira N. et al., 1977). Por otro lado, la presencia de TNF inhibe la multiplicación intracelular del parásito (de Titto E. et al., 1986; Titus R. et al., 1992). Sin embargo, cuando se administra TNF a ratones infectados con T. cruzi, los animales se mueren antes que los controles no tratados (revisado en Titus R. et al., 1992).

Las características descritas para citoquinas se resumen en la Tabla 1.1.

Regulación de la producción de citoquinas en la infección por T. cruzi.

Las citoquinas juegan un rol fundamental en la respuesta inmune. Permiten la interacción del sistema inmune con otros sistemas como el neuroendócrino, mielopoyético y hematopoyético. Aunque en muchos casos un solo tipo celular puede secretar varias citoquinas el perfil de producción de las mismas varía con el estímulo recibido. Otra observación común es que muchas citoquinas actúan en forma sinérgica o antagónica con otras citoquinas. Por ejemplo, en la síntesis de Ig la IL-5 aumenta la capacidad de la IL-4 para inducir la síntesis de IgE, y el IFN- γ potencia la actividad citotóxica del TNF- α sobre una variedad de células blanco; el IFN- γ inhibe a la IL-4 en la inducción de antígenos de clase II del CMH en células B y en la producción de IgE, y el TGF- β inhibe la proliferación de células T y la expresión del receptor para IL-2. Las interacciones sinérgicas requieren concentraciones menores para que una citoquina medie su acción o acelera su efecto.

Por otro lado la producción excesiva de citoquinas, como se observa por ejemplo en las inflamaciones crónicas, podría desencadenar fenómenos patológicos.

La producción de IL-2 esta severamente suprimida durante la fase aguda de la infección (Harel-Bellán A. et al., 1983; Tarleton R.L. & Kuhn R.E., 1984). Por otro lado, IL-2 exógena puede alterar la respuesta de los linfocitos de ratones infectados con T. cruzi así también como el curso de la infección, pero no puede revertir completamente el fenómeno de inmunosupresión (Tarleton R.L. & Kuhn R.E., 1984; Choromanski L. & Kuhn R.E., 1985, 1987).

Los mecanismos celulares y moleculares de la supresión de la IL-2 no han sido aún aclarados. En general la regulación en la producción de IL-2 es a nivel transcripcional. La correlación hallada entre la supresión en la producción de IL-2 con niveles bajos o ausentes de ARN mensajero para IL-2 en células T provenientes de ratones infectados con T. cruzi sugieren que este sería también el nivel de regulación en la infección por T. cruzi. Sin embargo, la producción de otros productos de las células T no se ve afectada durante la infección. La producción de IL-3 es suprimida, aunque no al mismo nivel que la IL-2 mientras que la producción de GM-CSF, IL-4, IL-5 e IL-6 en células de bazo estimuladas con T. cruzi no se ve afectada o es mayor (Nabors G.S. & Tarleton R.L., resultados no publicados).

Sin embargo, el cambio más drástico en la producción de linfoquinas en ratones infectados con T. cruzi es el aumento en los niveles de IFN- γ (Nabors G.S. &

Tarleton R.L., 1991). Durante el curso de la infección la capacidad de las células T esplénicas para producir IFN γ es mayor que la de las células provenientes de ratones normales. Además, las células de bazo de ratones infectados producen IFN γ al ser estimuladas con antígenos parasitarios o mitógenos. Los niveles de IFN γ en suero son también elevados así como los niveles de ARN mensajero para IFN γ y la producción espontánea en células de bazo no estimuladas provenientes de ratones en etapa aguda de infección. Sin embargo, los niveles de IFN γ disminuyen significativamente a los 18-20 días post-infección, cuando la producción de IL-2 es mínima. El tratamiento de las células de bazo de ratones infectados con IL-2 aumenta tanto la producción espontánea de IFN- γ como la inducida por antígeno .

Por lo tanto, aunque la producción in vitro de IFN- γ inducida por mitógenos se mantenga relativamente intacta en los ratones infectados con T. cruzi, la producción in vivo puede verse afectada por la incapacidad de producir suficientes cantidades de IL-2. Se ha visto que el IFN γ disminuye la carga parasitaria in vitro e in vivo (Reed S.G. et al., 1987; Wirth J.J. et al., 1985); sin embargo la producción endógena parece ser insuficiente para mediar la resistencia in vivo.

DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD HUMANA

El diagnóstico es el primer paso para el control o reducción de una enfermedad, tanto a nivel individual como de una comunidad. Los mayores progresos en el control de diversas enfermedades han seguido frecuentemente al mejoramiento de los métodos diagnósticos, al permitir, por ejemplo, un diagnóstico diferencial y/o la instalación de procedimientos preventivos o terapéuticos en fases más precoces de la enfermedad. Sin embargo, las necesidades de pruebas diagnósticas varían enormemente, ya que dependen no solamente de las circunstancias epidemiológicas de cada enfermedad sino también de las estrategias para el control de la enfermedad que se intente aplicar.

El diagnóstico de laboratorio se basa en procedimientos que ponen en evidencia al parásito (tripomastigotes en sangre periférica) o que permiten detectar anticuerpos. Si bien la demostración de la presencia del parásito es el diagnóstico de certeza, sólo es posible practicarlo con éxito en la etapa aguda de la enfermedad, cuando la concentración de parásitos es alta y la de anticuerpos es baja.

El método de Strout (Strout R.G., 1962) es el más práctico y sensible (95-100% en casos agudos) y se basa en la observación microscópica del sedimento de la sangre coagulada centrifugada en su totalidad. El método de los capilares o microhematocrito posee también una alta sensibilidad (Marteleur L. et al., 1986).

Otros métodos de observación directa de la sangre al microscopio, gota fresca y gota gruesa, son también de gran utilidad, pero la capacidad de detección de parásitos depende del observador (Manual de Actualización de Chagas, Leishmania y Paludismo., 1987).

El xenodiagnóstico se utiliza también para investigar la presencia de T. cruzi

en sangre periférica; aprovecha el mecanismo de transmisión por el vector que se alimenta sobre el paciente (insectos en el 2º y 3º estadio ninfal), permitiendo que el parásito se multiplique en la luz del intestino del insecto. Luego de un período fijo (30 y 60 días), se observan las heces al microscopio (Cerisola J.A. et al., 1974). La sensibilidad del método es del 100% en los casos agudos y del 50% en los casos de infección crónica.

El hemocultivo (Abramo-Orrego L. et al., 1980) es otro método de diagnóstico parasitológico; sin embargo, aunque el parásito se desarrolla bien en diversos medios de cultivo, la sensibilidad de este método es buena en casos agudos y congénitos pero insuficiente en los casos crónicos. El hemocultivo es un buen método auxiliar del xenodiagnóstico y realizados conjuntamente aumentan el porcentaje de casos positivos detectados en el período crónico de la Enfermedad de Chagas (Abramo-Orrego L. et al., 1980).

La detección de componentes del parásito en el período crónico en diferentes fluidos biológicos, esta siendo actualmente estudiada por diferentes métodos como el uso de anticuerpos monoclonales o sondas de ácidos nucleicos (Avila H.A. et al., 1992).

La utilidad y aplicabilidad de las pruebas serológicas de diagnóstico no es, universal. Las diferencias parten de las distintas situaciones epidemiológicas, de los recursos disponibles, de la organización de los servicios de salud donde se emplean, etc. Una gran variedad de pruebas serológicas, con diferente sensibilidad, especificidad y "nivel de reactividad", está disponible para el diagnóstico de laboratorio de infecciones parasitarias. La reactividad depende de la cantidad de antígeno y anticuerpo necesarios para la interacción serológica. El inmunoensayo enzimático o enzimoimmunoensayo (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA) tienen altos niveles de reactividad. Estas pruebas pueden detectar niveles de anticuerpos del orden del nanogramo y se caracterizan por dar altos títulos.

Pruebas de reactividad intermedia son la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la homoaglutinación indirecta (HAI). Pruebas con bajo nivel de reactividad son: la fijación de complemento (FC), los ensayos de aglutinación (latex, bentonita, colesterol), la aglutinación directa de organismos (AD), y los ensayos en gel de agar como la doble difusión, la inmunoelectroforesis y la contrainmunolectroforesis (Manual sobre Control de Calidad del Inmunodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas, 1992).

La sensibilidad de las reacciones serológicas oscilan entre 95-100% y tienen alta especificidad, debiéndose determinar para cada zona geográfica en que se unen, los títulos reactivos específicos que no correspondan a reacciones cruzadas con otras infecciones (Manual de Actualización de chagas, Leishmania y Paludismo, 1987).

La obtención y conservación de las muestras de sangre, que serán estudiadas en el laboratorio, generalmente implican disponer tanto de laboratorios equipados para centrifugación y separación de sueros como de personal calificado en las extracciones. Estos problemas pueden ser evitados con la extracción de sangre de pulpejo del dedo, de mayor facilidad operativa y menor costo. En ambos casos la conservación de la muestra puede ser conseguida por congelación o mezcla de la misma con glicerina al 50%; cuando se trate de sueros se puede

utilizar papel de filtro o un conservador a base de glicerina e inhibidores de proteasas. En el caso de sangre entera, la elección de métodos depende del tipo de estudio a realizar contemplando la infraestructura, personal y costos de los que se dispone.

QUIMIOTERAPIA ESPECIFICA

Hasta el momento no existe una droga ideal para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Una droga así debería tener capacidad de actuar exclusivamente sobre el parásito en la ubicación en que este se encuentra en el hospedador, sin producir reacciones secundarias. El nifurtimox, evidencia un importante efecto supresivo en animales infectados experimentalmente. Su efectividad depende de la cepa de T. cruzi infectante. Los resultados comunicados en pacientes con infección crónica son discordantes; por ejemplo, en el centro de Brasil se señaló un efecto supresor pasajero, mientras que en el Sur de Brasil y en la Argentina y Chile se comunicó la negativización persistente de la parasitemia en un elevado porcentaje de pacientes (Cançado J.R. & Brener Z., 1979). La droga que se administra por períodos prolongados por vía oral, puede inducir efectos colaterales (anorexia, pérdida de peso, trastornos gástricos, excitación, pérdida de memoria, cefaleas, neuritis periférica) que en general se revierten al suspender el tratamiento. Recientemente se ha comunicado que el nifurtimox estimula la peroxidación lipídica en tejidos de mamíferos, lo que determina modificaciones estructurales de membranas celulares (Moreno S. et al., 1980).

El benznidazol, derivado del nitroimidazol, también mostró actividad contra este parásito. Entre los efectos secundarios más comunes presenta: polineuritis periférica, eritema cutáneo urticariano y maculoso y trastornos hematopoyéticos que en general retrogradan con la suspensión de la medicación. Los resultados comunicados sobre su efectividad también son discordantes para la infección crónica, registrándose según algunos autores un 40% de fracasos terapéuticos, mientras que para otros el resultado ha sido efectivo (Paulone I. et al., 1987; Viotti A. et al., 1990).

REACCIONES AUTOINMUNES EN LA INFECCION POR TRYPANOSOMA CRUZI

El largo lapso que va desde la infección hasta la aparición de síntomas, la aparente independencia de las lesiones histológicas de la presencia o ausencia de parásitos, la presencia de células mononucleares en los infiltrados inflamatorios, la identidad fenotípica de las células mononucleares infiltrantes y su capacidad para adherirse, penetrar y aún lizar las células del músculo esquelético, la demostración de fenómenos de inmunidad humoral y celular anti-tejido en seres humanos y animales crónicamente infectados con el T. cruzi y la posibilidad de inducir daño tisular por inoculación de antígenos del parásito son evidencias para sostener que el daño se debe a la participación de mecanismos inmunológicos (revisado en Laucella S.A. & de Titto E., 1993).

Tres mecanismos no mutuamente excluyentes, pueden ser responsables de este proceso: las perturbaciones de la respuesta inmune del huésped, los cambios

en antígenos endógenos y los fenómenos de mimetismo molecular.

1. Perturbaciones de la respuesta inmune del huésped

La infección perturba generalizadamente al sistema inmune modificando componentes efectores y reguladores de la respuesta, lo que también podría desencadenar mecanismos autoagresivos. Esto incluye la expansión de poblaciones celulares capaces de regular la respuesta inmune en pacientes estimulados por antígenos del parásito y por la actividad de anticuerpos específicos, la liberación de linfoquinas y otros mediadores solubles que pueden atraer y estimular células presentadoras de antígeno, el aumento en la expresión de antígenos de histocompatibilidad y su expresión aberrante, y el estímulo inespecífico del sistema inmune del huésped (revisado por Rottenberg M.E. et al., 1991).

En este marco, puede entenderse la creciente evidencia que vincula las células T, especialmente las CD4⁺, a procesos patológicos (Said G. et al., 1985; Hontebeyrie-Joskowicz M et al., 1987; Ben Younes-Chennoufi A. et al., 1988; Russo M. et al., 1988).

En particular, cabe recordarse que líneas celulares T-CD4⁺, específicas para T.cruzi, desarrolladas in vitro fueron capaces de transferir una reacción de hipersensibilidad retardada in vivo. Dicha línea celular tenía características de células colaboradoras del tipo II (TC₂), secretoras de IL4 pero no de IFN e IL2 e inducen a las células B a producir Igs (Hontebeyrie-Joskowicz M., 1991). La características inusuales de esta línea celular que tiene el perfil de secreción de citoquinas de un subset TC₂ pero la habilidad de mediar fenómenos de hipersensibilidad tardía usualmente producidos por el subset de TC₁ no ha sido aún aclarado.

Por otro lado, la activación de macrófagos por linfoquinas incrementa la generación de intermediarios del oxígeno de alta toxicidad. Estos productos y el TNF podrían mediar reacciones inflamatorias (Monfurar O.M.B. et al., 1977; Mosca W. y Plaja J., 1980; De Bracco M.M.E. et al., 1986; de Titto E. et al., 1985; Morato M.J.F. et al., 1986; Beltz L.A. & Kierszenbaum F., 1987; Cardoni R.L., et al 1990; Colley D.G., 1990; Gazinelli R.T & Brener Z., 1991; Petray P. et al., 1994).

En la infección experimental se han descrito células musculares que expresan antígenos de histocompatibilidad clase II (Cabeza Meckert P. et al., 1991). Más aún, el estudio de autopsias de pacientes chagásicos ha mostrado que las células de miocardio dentro de las lesiones inflamatorias expresaban niveles mayores de moléculas clase I del CMH mientras que las células endoteliales dentro de estas lesiones (especialmente células endoteliales en pequeños vasos y paredes capilares) habían aumentado la expresión de moléculas tipo clase II (Reis D. et al., 1993 en prensa).

2. Cambios en antígenos endógenos

La infección podría promover de varias maneras la presentación de antígenos propios como "no propios". Así, la inserción de antígenos del parásito en

la membrana de células del huésped puede transformar a estructuras propias en inmunogénicas y/o en blanco de mecanismos citotóxicos y la necrosis celular puede exponer constituyentes celulares del huésped normalmente no expuestos.

De hecho, amastigotes y tripomastigotes de T.cruzi cultivados in vitro en una línea de células de sarcoma incorporaron a su superficie componentes antigénicos de la célula huésped y constituyentes del medio de cultivo, lo que puede interpretarse como intento de evasión de la respuesta inmune a través de la exposición de componentes del huésped en un contexto inmunogénico (Bretaña A. & O'Daly J.A., 1976; Chess Q. et al., 1983).

3. Mimetismo Molecular

Los fenómenos de mimetismo molecular -determinantes antigénicos comunes al parásito y al huésped- pueden resultar en la ruptura de la tolerancia inmunológica y por ende en procesos autoinmunitarios. Igual efecto resulta de la acción de anticuerpos anti-idiotipo dirigidos contra los anticuerpos que reconocen aquella porción del parásito que forma parte del sistema de unión con las células del huésped, ya que el idiotipo del primer anticuerpo tendría la arquitectura del receptor de la célula huésped.

3.1. Tolerancia Inmunológica

Se entiende por Tolerancia Inmunológica a la falta de respuesta inmune a un antígeno determinado. La tolerancia a antígenos propios es fundamental para el funcionamiento normal del sistema inmune, y su ruptura, desencadenaría un fenómeno autoinmune.

Durante el desarrollo fetal y en las primeras semanas de vida neonatal, ninguna de las células del sistema inmune ha llegado a la madurez y por esta razón el sistema inmune de un individuo es particularmente susceptible a la inducción de tolerancia.

Para asegurar la tolerancia a antígenos propios, el sistema inmunológico debe tomar dos decisiones para cada antígeno con el que se enfrenta. En primer lugar, el antígeno debe ser reconocido de alguna manera como propio o extraño. En general el enfrentamiento con antígenos propios, no así con los extraños se produce en un estadio más temprano de la ontogenia del sistema inmunológico.

Además, para los antígenos extraños existen señales secundarias que activan mecanismos de defensa no específicos y sistemas de reparación tales como interferón, prostaglandinas y sistema complemento. Así, el momento en que se produce el enfrentamiento y o asociación de señales secundarias pueden influir en la elección de lo propio y lo extraño.

En segundo lugar, una vez identificado un antígeno particular como "propio", existen distintos mecanismos por los cuales los linfocitos B y T capaces de responder hacia autoantígenos se hacen silentes:

a) Deleción selectiva de las mismas del repertorio periférico ("Deleción Clonal"): en los estadios precoces del desarrollo linfocitario dentro de los órganos primarios (el timo para los linfocitos T y la médula ósea para los B), el contacto con las moléculas propias suele conducir a la deleción de los clones que reconocen a

los antígenos propios.

b) Alteración de la habilidad intrínseca de las células autorreactivas para responder hacia los antígenos ("Anergia Clonal"): los linfocitos maduros que abandonan los órganos primarios pueden hacerse tolerantes a las moléculas propias en la periferia, particularmente cuando éstas no están presentes en las células convencionales presentadoras de antígenos. La presencia en la circulación y en el tejido linfoide de estas células, normalmente respondedoras, ha sido demostrada.

c) Tolerancia producida por "falta de comunicación": es claro que si la molécula propia no puede contactar con las células T, no puede haber respuesta. Las moléculas restringidas a determinados órganos que entran en contacto con los linfocitos circulantes habitualmente no pueden ser reconocidos debido a que, si bien no están presentes en el timo para producir la delección clonal de los linfocitos autorreactivos complementarios, los órganos en que aparecen no suelen expresar moléculas del CMH de clase II. También como consecuencia de ello, no hay oportunidad para la tolerización de los linfocitos T cooperadores en la periferia.

d) Inhibición continua de la respuesta de tales células por acción de las células supresoras o de la red anti-idiotipo. Durante muchos años se propuso que las células T supresoras podrían inducir tolerancia a lo propio y que la autoinmunidad podría ser el resultado de una falta de actividad T supresora. Sin embargo la naturaleza, e incluso la existencia separada de tales células se han vuelto controvertidas. La actividad supresora que se ve en las respuestas inmunológicas suele adscribirse, en la actualidad, a una combinación de posibles interacciones que incluyen:

- cambio en el modo de respuesta inmunológica, de inmunidad mediada por células a inmunidad mediada por anticuerpos (o viceversa), debido a la producción de diferentes grupos de citoquinas por distintas subpoblaciones de células T;
- absorción de citoquinas esenciales por las células supresoras, lo que evitaría la división de otros linfocitos;
- liberación de moléculas inmunosupresoras inespecíficas tales como prostaglandinas o ACTH;
- actividad citostática específica de las células supresoras sobre las células autorreactivas; e
- inducción de anergia en la población autorreactiva producida por células estimuladoras que dan sólo una señal parcial de activación.

Esto sugiere que la supresión mediada por células T puede ser importante en el control de la autorreactividad, si bien la identidad exacta de la población efectora y los mecanismos efectores siguen sin ser precisadas.

La elección entre estas opciones depende por un lado de la naturaleza de la célula a ser tolerizada y de la frecuencia, duración e intensidad del contacto entre la célula a ser tolerizada y el tejido tolerizante. Dicho contacto depende del número de células que llevan el antígeno dentro de un tejido, su accesibilidad a los linfocitos, y de la expresión de moléculas de adhesión en un determinado tipo celular. Por otro lado, la naturaleza del antígeno propio, su concentración y localización tisular tienen un rol importante en la tolerización (Arnold B. et al., 1993).

Existen dos modelos para explicar la selección positiva y negativa de células

T en el timo :

1) Selección negativa y positiva de células T con receptores de alta y baja afinidad hacia componentes propios respectivamente. Existirían entonces dos umbrales para gatillar la selección correspondiente, basados en el grado de ocupación del receptor T. Un mayor grado de ocupación induce un aborto clonal y por ende un estado tolerante, mientras que un grado menor permite una selección positiva.

2) Existe un único umbral pero se emiten distintas señales a lo largo del desarrollo del sistema inmunológico. Así, en las células T inmaduras dichas señales inician un programa de muerte celular por apoptosis, mientras que en estadios posteriores de diferenciación, inducen una selección positiva o activación.

Se ha demostrado que las principales células estromáticas responsables de la inducción de tolerancia intratímica de las células T son las células dendríticas del timo. Las células dendríticas derivadas de la médula ósea, se localizan en el timo y en las áreas T de los órganos linfoides periféricos - como el bazo o los ganglios linfáticos -, donde reciben el nombre de células interdigitantes, y en diversos tejidos epiteliales, donde son denominadas células de Langerhans. Las células dendríticas periféricas están especializadas en la presentación antigénica y en la activación de las células T maduras; sin embargo, su función en el timo tiene que ver con la inactivación de los clones T autorreactivos. Las células dendríticas del timo se originan en una población intratímica de precursores con capacidad de formación tanto de células T, como de células dendríticas (Investigación y Ciencia enero 1994).

Sin embargo no todos los antígenos propios se expresan en el timo y más aún la expresión de ciertos antígenos comienza después del nacimiento cuando un significativo número de células T ya han pasado el punto de maduración en el que se produce el aborto clonal. En este caso la anergia clonal y la supresión T serían responsables de tolerizar células T que ya han madurado y abandonado el timo. La presencia o ausencia de señales secundarias determinarían la activación o tolerización de dichas células (Goodnow C.C., 1989).

El mecanismo de tolerización presenta las siguientes características:

- a) La tolerancia es desarrollada por determinantes antigénicos particulares y no por antígenos particulares,
- b) El antígeno debe estar continuamente presente para mantener el estado de tolerancia,
- c) Los niveles requeridos de antígeno para tolerizar células B son 100 a 1000 veces mayor que para las células T.

El síntesis el sistema inmune recaería primariamente en la delección de células T colaboradoras (efectiva para la vida neonatal en adelante) y secundariamente en la generación de células T supresoras y en la anergia clonal los cuales serían requeridos para eliminar anticuerpos anti-propio encontradas más tardiamente por ejemplo en la pubertad (Roitt I.M et al., 1992).

3.2 Ruptura de la tolerancia como origen de autoinmunidad

Las células B autorreactivas, las células T efectoras y los autoantígenos están normalmente presentes, pero las células T colaboradoras capaces de inducir una respuesta autoinmune están funcionalmente ausentes, ya sea debido a su aborto clonal, anergia clonal o a la acción de células T supresoras. Así las células T y B autorreactivas no son capaces de activarse. En circunstancias normales, existen mecanismos de control de la autorreactividad, pero dichos mecanismos pueden ser burlados generando una respuesta autoinmune. Un antígeno extraño que presente reacción cruzada con un antígeno propio puede revertir esta tolerancia. El efecto se debe a otras células T colaboradoras, específicas para determinantes antigénicos que no están en el antígeno propio pero sí en el extraño. Alternativamente adyuvantes y mitógenos de células B pueden reemplazar el requerimiento de las células T colaboradoras (Figura 1.1).

El fenómeno de autorreactividad puede originarse también por una evasión regulatoria que provoque una activación directa de las células T colaboradoras (Figura 1.2). Por otro lado, los autoantígenos pueden también evadir a las células T colaboradoras, estimulando directamente a las células T efectoras y a las células B productoras de anticuerpos.

Algunos receptores de superficie son inmunológicamente silentes debido a que su membrana no expresa antígenos de histocompatibilidad de clase II; contrariamente, la expresión aberrante de los mismos convertiría a la célula portadora en una célula presentadora de antígeno, siendo capaz de estimular células autorreactivas. Se ha demostrado que tras la estimulación con interferón y se puede inducir a muchos tipos celulares a que expresen moléculas de clase II.

Sin embargo no está claro aún hasta qué punto pueden estas células iniciar realmente una respuesta autoinmune, ya que no pueden proporcionar las señales coestimuladoras o las citoquinas necesarias a las células T. Por tanto, no se sabe aún si la expresión del CMH de clase II es causa o consecuencia de reacciones de autoinmunidad en los tejidos, o si ello tiene algún significado funcional.

Por último, células T o B autorreactivas que lleven un idiotipo público que presente reactividad cruzada con el idiotipo del antígeno extraño o con los anticuerpos por él originados, llevan a la ruptura de la tolerancia inmunológica (Roitt I.M. et al., 1992 y 1994).

Así, la unión de un antígeno a su receptor complementario en un linfocito T o B puede tener alguna de las siguientes consecuencias:

- 1) El linfocito puede dividirse y diferenciarse convirtiéndose en una célula efectora o una célula de memoria;
- 2) el linfocito puede hacerse tolerante;
- 3) el linfocito puede ser inafectado por el encuentro.

La resultante depende de la naturaleza y de la concentración del antígeno y de las complejas interacciones entre diferentes clases de linfocitos y, entre linfocitos y células presentadoras de antígeno, así como del grado de madurez del linfocito (Alberts B. et al., 1983).

3.3 Evidencias de Mimetismo Molecular en la Enfermedad de Chagas

Varios investigadores han descrito el desarrollo de autoinmunidad mediada por fenómenos de mimetismo molecular. Así, la enfermedad reumática del corazón resulta aparentemente de un mimetismo molecular entre antígenos de *Streptococcus* y antígenos de la válvula cardíaca (Cunningham M. et al., 1986).

También se ha descrito mimetismo antigénico en sistemas virales (Fujinami R.S. et al., 1983; Srinivasapa et al., 1986). Se ha demostrado que existe reactividad cruzada entre un anticuerpo neutralizante del virus Coxsackie B y miocardio de ratón.

En la enfermedad de Chagas se han encontrado evidencias de mimetismo molecular pero su rol en la fisiopatogenia no ha sido aún aclarado.

Por un lado existe diversa información mostrando reactividad cruzada entre el parásito y el huésped mamífero y por el otro fenómenos de autorreactividad que puede deberse o no a un mimetismo molecular.

Así, se ha demostrado que linfocitos de conejos crónicamente infectados con *T. cruzi* o conejos inmunizados con una pequeña partícula o fracción de membrana obtenida del *T. cruzi* eran capaces de destruir *in vitro* células alogeneicas de corazón pero no de riñón parasitadas o no, sugiriendo que las células blanco son específicas. La existencia de componentes comunes a células de miocardio y *T. cruzi* haría que los linfocitos sensibilizados ante la infección con *T. cruzi* desencadenen una respuesta hacia antígenos propios, causando el daño tisular (Santos Bush C.A. et al., 1974 y 1977; Teixeira A.R.L. et al., 1975). Más aún, ratones inoculados con corazón homólogo y adyuvante de Freund desarrollaron una miocarditis semejante a la de la infección crónica experimental, sugiriendo que componentes propios estarían involucrados en la fisiopatogenia de la enfermedad (Cossio P.M., 1984).

Por otro lado, algunos individuos infectados crónicamente, no así los no infectados, mostraron una reacción linfoproliferativa contra extractos de tejido cardíaco (de Titto E.H. et al., 1985) y sueros de pacientes chagásicos con cardiopatía evidente reaccionaron con cortes histológicos de corazón humano (Cossio P.M., 1985), constituyendo otra fuerte evidencia de una verdadera reacción contra miocardio en la Enfermedad de Chagas.

También se han descrito determinantes antigénicos compartidos por varias cepas de *T. cruzi* y preparaciones del retículo sarcoplásmico de músculo estriado de conejo (Sadigursky M. et al., 1982; Acosta A.M. et al., 1983). El antígeno parásito-músculo (SRA) compartido se encontraba presente en preparaciones purificadas de retículo sarcoplásmico ricas en adenosina trifosfatasa activada por magnesio. A la luz de estos resultados, se investigó si *T. cruzi* era capaz de originar una respuesta autoinmune contra corazón, si esta respuesta era desarrollada por SRA y si SRA inducía una reacción autoinmune que pudiera reproducir las lesiones cardíacas encontradas en la Enfermedad de Chagas. Los resultados de estos estudios indicaron que ratones infectados por 150 días mostraban una miocarditis mononuclear con miocitolisis libre de parásitos y que la inoculación con SRA en ratones inducía lesiones similares. Estos fueron las primeras evidencias directas de un fenómeno de mimetismo molecular como origen del daño tisular en la

Enfermedad de Chagas, ya que la inoculación de un antígeno de reactividad cruzada fue capaz de producir lesiones cardíacas similares a las encontradas en la enfermedad crónica (Acosta A.M. et al., 1985).

Además, los pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica que poseían títulos de inmunoglobulinas anti-sarcolema más elevados que los individuos infectados sin manifestaciones cardíacas, reconocieron también una proteína de 25 kDa del *T. cruzi*, que estaría intimamente relacionada con la destrucción de fibras de músculo estriado (Santos Bush C.A. et al., 1985).

Por otro lado, anticuerpos presentes en el suero de ratones crónicamente infectados reaccionan con epitopes presentes en el sarcolema del músculo esquelético y del miocardio. Estos anticuerpos se unen selectivamente a células del músculo esquelético del tipo II pero no a las del tipo I y el antígeno presenta las características de un glicolípido (Laguens R.P. et al., 1989). Ratones infectados con *T. cruzi* desarrollaron anticuerpos anti-miocardio durante las fases aguda y crónica.

Dichos anticuerpos purificados por inmutafinidad reaccionaron con antígenos del parásito (Mc Cormick T.S. & Rowland E., 1989).

Por otra parte, se ha demostrado que ribosomas y polirribosomas de *T. cruzi* inducen inmunidad específica al tiempo que dan reactividad cruzada con células de mamífero. En particular, se han descrito antígenos ribosomales del parásito cuya región C-terminal presenta un alto grado de homología con la región C-terminal de proteínas ribosomales humanas (Lopetegui R. & Sosa Miatello C., 1977; León L.L. et al., 1980; Lopetegui R. & Sosa Miatello C., 1981; Sosa Miatello C. & Fiorotto E.R., 1989; Levitus J. et al., 1991) y proteínas ribosomales del parásito que mimetizan con proteínas ribosomales humanas de 23 y 38 kDa respectivamente (Skeiky Y. et al., 1992, 1993; Bonfa E. et al., 1993).

Desde otro enfoque técnico, se han descrito diversos anticuerpos monoclonales reactivos con el parásito y con diversas estructuras tisulares de los mamíferos. Los epitopes proteicos y glicolípidos fueron reconocidos por sueros de pacientes chagásicos y ratones infectados. Más aún, la transferencia en ratones de uno de dichos monoclonales produjo parálisis letal (Wood J.N. et al., 1982; Hudson L., 1983; Snary D. et al., 1983; Petry K. et al., 1987, 1988 y 1991; Van Voorhis et al., 1991).

También se ha visto que los pacientes chagásicos reconocen receptores para neurotransmisores en los linfocitos (Sterin-Borda L. et al., 1990) y que anticuerpos monoclonales anti-parásito reconocen un antígeno de 28 kDa expresado en la membrana de linfocitos B y T activados (Hernández-Munain C., 1992).

Más recientemente se ha observado la presencia de células productoras de anticuerpos anti-miocardio en los infiltrados inflamatorios de las lesiones cardíacas en la miocarditis crónica de Chagas (Laguens R.P. et al., 1989; Lozykowski M.G. & McCormick T.S., 1991).

El origen de la autoinmunidad en la Enfermedad de Chagas no ha sido aún aclarada pero es probable que la activación policlonal en la fase aguda de la infección por *T. cruzi* (Minoprio P.S. et al., 1989) sea responsable del origen de esta aparente ruptura del sistema de tolerancia inmunológica (Eisen H. & Kahn S., 1991). Así, se ha propuesto que la acción combinada de la activación policlonal y la presencia crónica de antígenos de reactividad cruzada originan la patología

autoinmune de la Enfermedad de Chagas. Por lo tanto es muy importante caracterizar estos antígenos de reactividad cruzada para clarificar su rol en la fisiopatogenia. Cualquiera fuese el mecanismo involucrado en el desarrollo de las lesiones, la información acumulada hasta el presente sugiere que fenómenos inmunorregulatorios determinarían la progresión desde la forma indeterminada hacia la forma cardíaca de la enfermedad así también como la intensidad de dichas lesiones.

RELACION HUESPED - PARASITO

Todo lo dicho deja asentado que después de la infección se establece una relación bidireccional entre el huésped y parásito en el cual, además de los mecanismos de escape parasitario, intervienen factores genéticos, ambientales y de regulación.

1. FACTORES GENETICOS Y AMBIENTALES

Numerosos trabajos ya mencionados demuestran que la resistencia a la infección aguda en animales de experimentación depende del contenido genético del huésped y del parásito. Desde hace muchos años se sabe que hay diferente sensibilidad según el sexo y la edad de los ratones: la resistencia crece con la edad, las hembras son más resistentes. Otras diferencias en la resistencia de un huésped estarían basadas en distintos mecanismos bajo control poligenético, que se transmite a la progenie de una manera relativamente simple. El control de la parasitemia y de la resistencia/sensibilidad al T. cruzi compromete genes dentro y fuera del locus H-2, muy probablemente como fenómenos independientes.

Muy pocos estudios han buscado diferencias en factores no inmunológicos entre animales sensibles y resistentes y, hasta donde sabemos, ninguno ha explorado las bases genéticas de tales factores. En cambio numerosas evidencias demuestran que el resultado de la infección por el T. cruzi depende en gran medida de la capacidad del huésped para desarrollar anticuerpos, montar una respuesta celular, desarrollar actividad NK y producir citoquinas; es decir para montar normalmente una respuesta inmune, lo que está claramente bajo control genético.

Sin embargo, no se ha podido demostrar correlación entre la sensibilidad/resistencia de los huéspedes inmunocompetentes con la capacidad de los macrófagos para ser activados o para digerir parásitos, ni con los anticuerpos circulantes, aunque sí se ha informado diferencias en el perfil de anticuerpos según las cepas de ratones y parásitos empleados. Más aún, los ratones resistentes presentan menores niveles séricos de anticuerpos IgM específicos que los ratones sensibles, sugiriendo que factores no inmunológicos son determinantes críticos de la sensibilidad en la fase temprana de la infección. Entonces, la resistencia del ratón a la infección aguda con el T. cruzi está gobernada por múltiples componentes genéticos, dentro y fuera del H-2. El resultado de la infección depende de las características del parásito infectante y de la combinación de alelos presentes en cada cepa de ratones, incluyendo factores inmunológicos y no inmunológicos.

La evolución de la infección crónica con el T. cruzi depende de la naturaleza

tanto del parásito infectante como del huésped infectado. En las infecciones experimentales la mayoría de los órganos son parasitados pero toda relación entre parasitismo y daño tisular es todavía especulativa frente a la importancia reconocida de las características genéticas del huésped en la definición de la extensión del daño. Por otro lado, la falta de correlación de las anomalías del ECG y las lesiones histológicas sugiere que las lesiones cardíacas son el resultado de más de un proceso fisiopatológico. Está claro que la capacidad para montar una respuesta inmune es crucial para controlar la infección y que en ese control juegan productos codificados por genes pertenecientes al CMH y otros fuera de él, aunque su completa identificación todavía no se ha logrado. Pocos estudios experimentales han sido orientados al estudio de los factores genéticos relacionados con la infección crónica, y la tendencia a usar dosis masivas de parásitos en las infecciones experimentales no permite que los ocasionales huéspedes desplieguen con naturalidad todos sus mecanismos de defensa.

Lo hasta aquí expuesto demuestra que la sensibilidad de los mamíferos a la infección aguda y crónica con el *T. cruzi* tiene componentes de base genética.

En la infección humana existen algunas evidencias que asocian la sensibilidad del huésped al parásito con factores genéticos. Se ha visto que el antígeno A3 es aproximadamente 2 veces más frecuente entre los sujetos no infectados que entre los infectados, mientras los antígenos A31, CW5, B39, BW61, BW63 son entre 2,5 (B39) y 18,7 (BW63) veces más frecuentes entre los infectados que entre los no infectados. Más aún, se ha visto que el alelo BW60 se encuentra con una frecuencia más de 7 veces mayor entre los pacientes con alguna evidencia de compromiso cardíaco; siendo DRW52, el más frecuente entre ellos, el asociado a mayor riesgo etiológico. Los estudios realizados en seres humanos son menos rotundos pero esto no es sorprendente ya que la infección humana no sigue un protocolo preestablecido. El número y la naturaleza de los parásitos infectantes, el momento de la infección, el estado nutricional, inmunológico, las características genéticas de los seres humanos, la posibilidad de reinfección y la existencia de patologías sobreagregadas son variables incontrolables y muy difíciles siquiera de estimar (de Titto E., 1994).

Con respecto al parásito, las cosas tampoco están suficientemente aclaradas, pero debemos considerar algunos hechos ya demostrados o planteados.

Está claramente probado que existe un alta variabilidad genética intraespecie en el *T. cruzi*. Por ejemplo, hay diferencias de hasta un 30 % del contenido total de DNA no sólo en distintas cepas sino también entre clones de parásitos derivados de una misma cepa (Dvorak J.A. et al., 1983). Esta variabilidad estructural está acompañada de diferencias funcionales intercepas e interclones, como por ejemplo, las demostradas en tropismo tisular (Melo R.C. & Brener Z. 1978), en la infectividad de macrófagos (Alcántara A. & Brener Z., 1978; Nogueira N. et al., 1980; Villalta F. et al., 1981; Zenian A. & Kierszenbaum F., 1982), en el perfil de productos de clivaje del DNA por endonucleasas de restricción (Morel C. et al., 1980), y en el tiempo de duplicación (Engel J.C., 1982).

Es evidente que el *T. cruzi* debe de contar con un repertorio genético muy amplio: además de sucesivas metamorfosis, debe invadir distintos huéspedes, adaptarse metabólicamente a sus ambientes y evadir los mecanismos de defensas

de éstos. Ejemplos de esta variabilidad adaptativa son: la distinta capacidad de los tripomastigotes de una misma cepa para infectar macrófagos, según provengan de circulación periférica, de cultivo de células o de cultivo axénico (Villalta F. et al., 1981; Meirelles M.N.L. 1982) y el "factor antifagocítico", presente exclusivamente en las formas circulares del T. cruzi (Nogueira N. et al., 1980).

2. FACTORES REGULATORIOS

La existencia de mecanismos regulatorios en toda respuesta inmune es un hecho bien conocido. Dicha regulación se puede producir en distintos momentos del proceso: desde la captación y presentación de los antígenos por los macrófagos hasta la instancia efectora en sus diversas expresiones.

Muy poco se sabe de este tema en la infección chagásica: ya mencionamos que la infección aguda experimental es acompañada de una disminución de la respuesta tanto celular como humoral a antígenos no relacionados con el T. cruzi, y también mencionamos diversos factores que influyen en la relación entre el parásito y los macrófagos. Los siguientes pasos de la respuesta inmune han sido menos estudiados, sobre todo en la infección crónica pero, por ejemplo, está claramente demostrada la existencia de células T colaboradoras ("TC") específicas contra el parásito desde el día 10 post-infección (Burgess D.E. et al., 1981), y la presencia de células T supresoras específicas para reacciones de hipersensibilidad tardía anti-T. cruzi en el bazo de animales crónicamente infectados (Scott M.T., 1981).

Estos datos aislados indican que, en la enfermedad de Chagas, están presentes distintos mecanismos reguladores que, si bien no impiden la existencia de reacciones anti-T. cruzi controlan su potencia en un nivel evidentemente insuficiente para eliminar al parásito.

3. MECANISMOS DE ESCAPE

Cuando se establece la infección en un huésped susceptible, el T. cruzi es capaz de desarrollar mecanismos de "escape" de la defensa del huésped antes, durante y después de la entrada en las células de mamíferos. Los factores de virulencia

que permiten la evasión de tales defensas se han desarrollado a largo de su evolución, representando una forma de preadaptación para sobrevivir en un ambiente biológicamente hostil.

La metaciclogénesis ocurre en respuesta a una variedad de cambios en los estímulos del medio, y es acompañada por dramáticos cambios en la expresión génica, síntesis de proteínas y en la morfología (revisado por Williams G.T., 1985).

Durante el curso de la diferenciación, el T. cruzi, como otros protozoos parasitarios, se preadapta para sobrevivir a la próxima etapa de su ciclo de vida. Así los epimastigotes; estadio naturalmente presente sólo en el insecto vector, son susceptibles a lisis mediada por complemento (Nogueira N. et al., 1975), mientras que los tripomastigotes metacíclicos o sanguíneos, estadios que conviven con el huésped mamífero, son resistentes (Nogueira N. et al., 1975; kipnis T.L. et al., 1981).

Además, los epimastigotes son capturados únicamente por células fagocíticas dentro de vacuolas donde son eliminados mientras que los tripomastigotes son capaces de entrar en tipos celulares fagocíticos o no con la formación de una vacuola que es posteriormente destruída a medida que los parásitos entran en el citoplasma.

Evasión del sistema complemento.

Los mecanismos de evasión del sistema complemento pueden agruparse en tres categorías: fallas en la activación del sistema, en la opsonización del patógeno y fallas en la lisis del patógeno. A diferencia de los estadios menos virulentos como epimastigotes, capaces de activar el sistema complemento, los tripomastigotes son resistentes al complemento y se unen mucho menos al componente C3 cuando se lo incubaba con un suero no inmune (Joiner K.A., 1985 y 1986). Aunque se une al C1q, esta unión no está asociada con la activación convencional de la vía clásica (Rimoldi M. et al., 1989).

Los mecanismos de resistencia al complemento en los estadios de tripomastigotes son multifactoriales. Así se han descrito diversas moléculas producidas por tripomastigotes e involucradas en la regulación del complemento (Kipnis T.L. et al., 1981; Fisher E. et al., 1988; Rimoldi M.T. et al., 1988; Norris K.A. et al., 1991). A pesar de poseer pesos moleculares diferentes estas moléculas regulatorias exhiben funciones que se superponen considerablemente; por ejemplo, todas ellas inhiben la formación o aceleran la disminución intrínseca de las C3 convertasas, bloqueando así la activación del complemento sobre la superficie del parásito.

Por otro lado, el tratamiento de los tripomastigotes con neuraminidasa los hace susceptibles a la lisis mediada por complemento, sugiriendo que la presencia del ácido siálico sobre la superficie del parásito le confiere resistencia (Kipnis T.L. et al., 1981). Sin embargo, estos hallazgos son contradictorios ya que se ha demostrado que los tripomastigotes infectivos producen neuraminidasa (Pereira M.E.A. 1983; Harth G. et al., 1987). La neuraminidasa se expresa mínimamente en tripomastigotes y amastigotes. Sin embargo, trabajos recientes han tratado de explicar esta paradoja. La actividad de neuraminidasa y trans-sialidasa son compartidos por una única glicoproteína con un peso molecular de 120 - 220 kDa y que presenta reactividad cruzada con el antígeno SAPA (Parodi A.J. et al., 1992). La función predominante depende de la habilidad para transferir el ácido siálico a aceptores adecuados. Recientemente se ha demostrado que una trans - sialidasa recombinante transfiere residuos de ácido siálico a la superficie de células de mamíferos, confiriendo así resistencia a la lisis mediada por complemento (Nussenzweig V. comunicación personal).

Evasión de la respuesta del huésped durante la entrada a la célula

La captura de microorganismos por los fagocitos está frecuentemente asociada a la generación de productos tóxicos derivados del oxígeno. Entonces una estrategia para acceder al medio intracelular sería el uso de un receptor cuya

unión no esté asociada con un estallido respiratorio. Alternativamente, los parásitos intracelulares pueden producir "basureros" de metabolitos tóxicos o entrar a células incapaces de montar un estallido respiratorio (Hall B.F. et al., 1991).

Ya que los tripomastigotes se unen débilmente al C3 y son capaces de infectar células que no tienen receptores para el fragmento C3, otros residuos de superficie de la célula huésped con una distribución tisular más amplia estarían implicados en el proceso de entrada. Así se ha sugerido que la fibronectina actuaría como un puente para facilitar la unión del parásito a la célula blanco (Ouasssi M.A. & Caprón A., 1989). Se ha observado que los tripomastigotes entran a la célula huésped preferentemente a través de la membrana basolateral donde se hallan concentrados la fibronectina y sus receptores (miembros de la familia de las B1 integrinas). Sin embargo, el rol de la fibronectina en la entrada y en la supervivencia del parásito no ha sido aún aclarado. Mientras todos los estadios del T. cruzi son capaces de unirse a la fibronectina y aumentan la unión a la célula blanco en su presencia, sólo los estadios virulentos son capaces de entrar a células no fagocíticas (Ouasssi M. et al., 1984; Peyrol S. et al., 1987; Noisin E.L. & Villalta F., 1989). Más aún, las B1 integrinas han sido detectadas en las vacuolas conteniendo epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos en células J774 (Hall B.F. et al., 1991).

Evasión de la defensa después de la entrada.

Muchos investigadores concuerdan en que el T. cruzi entra al macrófago por un evento fagocítico (Zingales B. & Colli W., 1985), aunque existen algunos estudios que sugieren que la entrada podría ocurrir por un proceso activo mediado por el parásito (Kipnis T.L. et al., 1979). El proceso de entrada del parásito en células fagocíticas no profesionales no es claro, sin embargo existe consenso en que en todos los estadios el T. cruzi entra a la célula a través de la formación de una vacuola unida a membrana.

Se ha visto que independientemente del estadio del parásito, las vacuolas conteniendo parásitos son capaces de unirse a los lisosomas (Nogueira N. & Cohn Z., 1976; Kress Y. et al., 1977; Milder R. & Kloetzel J., 1980; Carvalho R.M.G. et al., 1981 y 1989; Meirelles M.N.L. et al., 1983, 1985 y 1987; Ley V. et al., 1989), aunque existe un estudio indicando que las vacuolas conteniendo tripomastigotes metacíclicos no se unirían a los lisosomas (Osuna A. et al., 1986).

En los estadios virulentos los parásitos son capaces de romper la membrana vacuolar dentro de las primeras 1-2 horas después de la entrada, ingresando así al citoplasma donde se replican. El mecanismo por el cual el T. cruzi se escapa de la vacuola hacia el citoplasma requiere acidificación (Ley V. et al., 1990) y está asociada con la liberación de una proteína formadora de poro, denominada Tc-TOX, que es antigénicamente similar a las proteínas membranolíticas C9 (componente terminal de la cascada de complemento) y a la perforina, una molécula formadora de poro secretada por los linfocitos T citotóxicos (Andrews N.W. et al., 1990). Escapando de la vacuola al citoplasma de la célula del huésped, los estadios infectivos del T. cruzi pueden evitar el bajo pH y las altas concentraciones de hidrolasas lisosomales características de los lisosomas maduros.

Los lisosomas se unen a las vacuolas conteniendo parásitos pero en

ausencia de una activación inmunológica, este evento no está asociado con la muerte intracelular del parásito infectivo. En los macrófagos las glicoproteínas de membrana lisosomal (Igp), ricas en residuos de ácido siálico (Kornfeld S. & Mellman I., 1989), son incorporadas dentro de la vacuola conteniendo parásitos, independientemente del estadio del parásito y de la presencia de receptores fagocíticos en la membrana vacuolar (Andrews N.W. et al., 1990; Hall B.F. et al., 1991).

Existe diversa evidencia mostrando que la modificación de estas estructuras facilitarían la salida del parásito desde la vacuola (Hall B.F. & Joiner K.A. 1993):

- 1) La liberación de neuraminidasa del T. cruzi aumenta bajo condiciones acidificantes,
- 2) Las glicoproteínas de membrana lisosomal (Igp) son sustratos de la neuraminidasa del T. cruzi,
- 3) El T. cruzi se escapa más rápido de la vacuola al citoplasma si se usan células deficientes en la expresión en membrana de ácido siálico comparado con células con expresión normal,
- 4) La desialización hace que la membrana vacuolar sea más susceptible a la actividad de hemolisina de la Tc - TOX.

En función de los resultados descritos anteriormente se postula la siguiente secuencia de eventos como modelo de interacción huésped - parásito durante el curso de la infección.

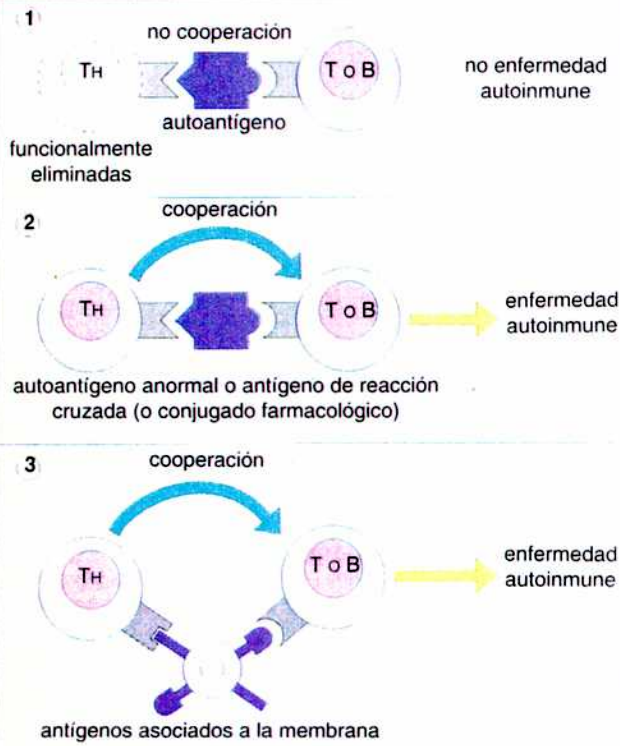
Los epimastigotes del T. cruzi no expresan en su superficie o lo hacen en pequeñas cantidades, actividades de trans-sialidasa y de factor acelerador de la caída de C3 convertasas (T-DAF). Sin embargo, la diferenciación a tripomastigotes se correlaciona con el aumento de expresión en superficie de ambas actividades. Inicialmente la superficie del tripomastigote puede activar el sistema complemento, pero el T - DAF limita el grado de activación a través de su habilidad para acelerar la caída intrínseca de C3 y C5 convertasas en la superficie del parásito. Seguidamente la adquisición sobre la superficie del parásito de residuos de ácido siálico a partir del huésped mamífero permite el reconocimiento de la superficie del parásito y la activación del sistema complemento. Además la adquisición de los residuos de ácido siálico permite la preadaptación al tripomastigote para sobrevivir en la vacuola durante el proceso de escape desde la vacuola al citoplasma de la célula.

La entrada a la célula huésped y la formación de la vacuola unida a membrana que rodea al parásito tendría varias consecuencias. En primer lugar, el restringido volumen previene la dilución de la neuraminidasa del T. cruzi liberada en el espacio vacuolar y aislaría a la enzima de los inhibidores del suero. En segundo lugar, a medida que se acidifica el medio, aumenta la liberación de la enzima desde la superficie del parásito hacia el medio vacuolar. Por la ley de acción de masas tal liberación serviría para prevenir la remoción de residuos de ácido siálico de la superficie del parásito por la actividad reversible de la trans-sialidasa y favorecer la desialización de los constituyentes de la membrana vacuolar del huésped, principalmente Igp y posiblemente glicolípidos. En tercer lugar, a medida que continúa la acidificación del medio hacia un pH aproximado de

5,5 aumenta la actividad de Tc - TOX. La Tc - TOX activa difunde y se inserta más eficientemente dentro de la bicapa lipídica de la membrana vacuolar desializada, desencadenando la ruptura de la membrana. En principio, la superficie del tripomastigote cubierta por ácido siálico permanece relativamente resistente a la acción lítica de la Tc - TOX.

Figura 1.1. Inducción de autoinmunidad por bypass celular T.

Inducción de autoinmunidad por bypass celular T-I



Inducción de autoinmunidad por bypass celular T-II



Figura 1.2. Enfermedad autoinmune resultante del escape de los controles de la autorreactividad.

Enfermedad autoinmune resultante del escape de los controles de la autorreactividad

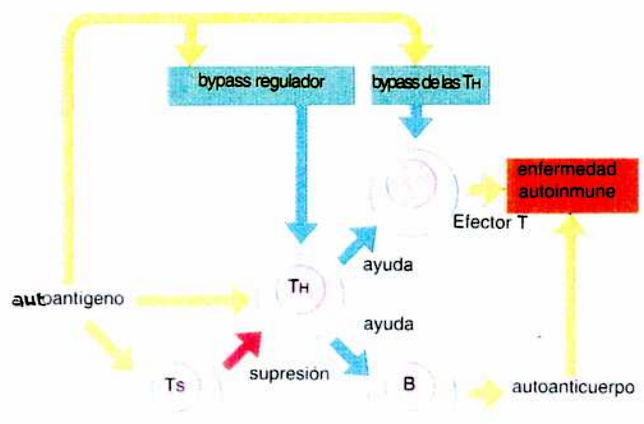


Tabla 1.1

CITOQUINAS. ORIGEN Y FUNCIONES

Citoquina	origen	cél. B	Efecto sobre: otras cél.
IFN γ	linfocitos T activados y células NK	aumenta la síntesis IgG2a, disminuye IgG2b, IgG1, IgG3, inhibe efecto IL-4	activador de macrófagos, aumenta la actividad NK, inhibe la proliferación de células Tc2, inhibe la replicación viral
TNF	α : neutrófilos, linfocitos T activados, macrófagos, células NK, LAK y células endoteliales B: linfocitos T		factor de necrosis tumoral, inicia la cascada de producción de citoquinas (TNF, IL-1, IL-6) y otros factores asociados con inflamación
IL-1	macrófagos, keratinocitos, células endoteliales	proliferación y maduración ,aumenta la síntesis de Ig	estimula producción de IL-2 y expresión de sus receptores, induce producción de GM-CSF e IL-4 por células T activadas activación células NK, induce producción IL-1, IL-6 y TNF
IL-2	células T activadas, NK y linfocitos granulares gigantes	proliferación y diferenciación de linfocitos B activados, en presencia de otras interleuquinas o factores, proliferación de líneas celulares B	proliferación linfocitos T activados y timocitos, liberación de linfoquinas por linfocitos T activados, activación de linfocitos T citotóxicos, > actividad NK, activación citotóxica de monocitos
IL-3	Tc1 y Tc 2, NK, células cebadas	mantiene el crecimiento de líneas pre-B	Estimula y mantiene el crecimiento de células troncales multipotentes, estimula y mantiene el crecimiento de células progenitoras eritroides y mieloides, mantiene el crecimiento de células cebadas
IL-4	células T y algunas células cebadas	> proliferación de células B activadas y su secreción de Ig G1 e Ig E, > expresión de Ags de clase II y de receptores para el Fc E, ,secreción de IgG2a, IgG2b e IgM en células B activadas	factor de crecimiento para células T y células cebadas , induce actividad citotóxica t y proliferación timocitos, induce formación de células gigantes multinucleadas, > actividad tumoricida de macrófagos

Citoquina	origen	cél. B	Efecto sobre: otras cél.
IL-5	linfocitos CD4 activados y mastocitos activados	> expresión de Ag de clase II y habilidad para presentar Ags en macrófagos, > la proliferación, la secreción IgM, IgG e IgA y la expresión del receptor para IL-2 en linfocitos B activados	colabora con la inducción de células T citotóxicas, induce la diferenciación de los eosinófilos
IL-6	macrófagos, cél. T, cél. B	estimula diferenciación y secreción de Ig	proliferación cél. T, diferenciación cél. Tc
IL-10	células Tc 2		> la proliferación de timocitos murinos en respuesta a la IL-2 o IL-4, < en monocitos la expresión de Ag de clase II, inhibe la síntesis de IFN-g, IL-2 y otras citoquinas producidas por las células TC 1, suprime la liberación de TNF-a por los macrófagos y actúa sinérgicamente con las IL-4 e IL-10 sobre la viabilidad de líneas de células cebas.
GM-CSF	células del estroma, células T, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y células cebas		afecta células progenitoras granulocíticas y monocíticas, participa en la activación de macrófagos y monocitos, induce la expresión de moléculas de adhesión
G-CSF	macrófagos, fibroblastos y células endoteliales estimuladas con IL-1 o TNF		induce el crecimiento de células progenitoras granulocíticas, actúa sobre neutrófilos aumentando la producción de superóxidos, actividad ADCC y fagocitosis

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es identificar y caracterizar componentes subcelulares del T. cruzi asociados con el gatillado y/o desarrollo de daño tisular en la forma crónica de la Enfermedad de Chagas; según el siguiente proyecto:

1. Identificación de los componentes del parásito reconocidos por sueros de PChCr.
2. Selección de antígenos específicamente reconocidos por PChCr con cardiopatía severa.
3. Producción de anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos contra antígenos de la fracción microsomal de T. cruzi.
4. Clonado de los AcMo.
5. Investigar la potencial reacción cruzada entre proteínas del parásito y de células de tejidos de mamífero con los AcMo.
6. Caracterización química de antígenos relevantes.
7. Estudiar la actividad biológica de los antígenos del punto 6.

TESIS

La hipótesis del trabajo plantea la existencia de marcadores de evolución hacia la Enfermedad de Chagas Crónica. La correlación de una respuesta inmunológica diferencial hacia ciertos antígenos parasitarios con el estadio clínico del paciente pondría de manifiesto el rol potencial de esos antígenos como marcadores de patología.

CAPITULO II

COMPOSICION POLIPEPTIDICA Y ANTIGENICA DE LA FRACCION CITOSOLICA DEL TRYPANOSOMA CRUZI

INTRODUCCION

En trabajos previos (de Titto E.H. et al., 1983, 1985, 1987) se ha demostrado que los pacientes chagásicos crónicos (PChCr) son capaces de reconocer antígenos de las fracciones microsomal (Mc) y citosólica (CS) del T. cruzi y que responden humoral y celularmente en forma específica ante ambas fracciones.

Estudios previos (Dasso M. & de Titto E.H., 1992) reveló que Mc contiene 22 componentes proteicos reconocidos por sueros de PChCr, 14 de los cuales son visibles por tinción con Negro de Amido. Se observó asimismo que los PChCr sintomáticos presentaban mayor reactividad contra dicha fracción que los PChCr asintomáticos, siendo posible identificar algunos polipéptidos más frecuentemente reconocidos por sueros de PChCr con compromiso cardíaco severo que por PChCr sin compromiso cardíaco evidenciable. Sin embargo, esta diferencia entre PChCr con distinto compromiso clínico involucra un complejo grupo de antígenos y fue imposible asociar a alguno de los 4 grupos de PChCr con un perfil definido de reactividad humoral contra Mc.

La complejidad del perfil de antígenos encontrados en Mc y la dificultad para identificar un número reducido de péptidos diferencialmente reconocidos por los sueros de PChCr con cardiopatía, junto con el hecho de que dada la metodología de fraccionamiento subcelular Mc y CS tienen componentes comunes unido al hecho de que ambas fracciones son capaces de inducir daño tisular semejante al que resulta de la infección crónica experimental con el parásito (Ruiz A.M. et al., 1985), sugirieron la conveniencia de analizar a la fracción de CS, con el propósito de caracterizar sus componentes proteicos e identificar aquellos cuyo reconocimiento por el sistema inmune del huésped infectado pueda ser asociado con la presencia de daño tisular.

MATERIALES Y METODOS

2.1. Antígeno.

La fracción citosólica se aisló a partir de epimastigotes de la cepa Tulahuén de T. cruzi siguiendo el protocolo descrito por Segura E.L. et al. [1974]. Brevemente, los parásitos cosechados luego de seis días de cultivo fueron lavados, rotos por compresión-descompresión (Fraccionador Sorvall-Ribi) y se separaron distintas fracciones por centrifugación diferencial (Figura 2.1). Se recuperó el sobrenadante de 105000 x g, alícuotado y almacenado a -20°C hasta el momento de su utilización. El contenido proteico se determinó por la técnica de Folin Cicalau, utilizando seroalbumina bovina (BSA) como standard.

2.2. Sueros.

Se estudiaron sueros de 43 individuos, 23 hombres y 20 mujeres, con edades entre 18 y 65 años y antecedentes fehacientes de haber vivido en zonas reconocidas como endémicas para el T. cruzi. Las personas fueron elegidas entre aquellas que concurren al Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía de la ciudad de Buenos Aires. Se realizó un estudio clínico y cardiológico de los pacientes incluyendo radiografía de tórax, electrocardiograma, ecocardiograma y angiografía. El diagnóstico serológico de infección con el T. cruzi se realizó por fijación de complemento, hemoaglutinación indirecta e inmunofluorescencia indirecta, considerándose como seroreactivos a aquellos sueros que reaccionaron por al menos dos de las técnicas empleadas.

A la luz de los resultados clínicos y serológicos los pacientes fueron agrupados en 5 categorías según se las describe en las Tablas 2.1 y 2.2.

Fueron condiciones de exclusión de pacientes las enfermedades valvular, isquémica, cardiopatía hipertensiva, congénita, sífilis, diabetes, enfermedad renal o cualquier otra enfermedad severa. Fueron excluidos también los pacientes mayores de 65 años o menores de 16 años y las mujeres embarazadas.

Todos los sueros fueron diluidos volumen a volumen con glicerol, fraccionados y almacenados a -20°C hasta el momento de su uso.

2.3. ELISA.

El contenido de anticuerpos contra CS se determinó por el método de ELISA indirecto (de Titto E. et al, 1987). Brevemente, se fijó CS en una concentración de 5 µg/ml diluida en buffer bicarbonato (0.1 M, pH 9.5) a microplacas de fondo plano (Costar, Cambridge, MA, EEUU) durante toda la noche a 4°C. Tras bloquear los sitios libres de antígeno con leche descremada al 5% (M, Molico, Nestlé, Buenos Aires) en PBS conteniendo 0.05% Tween 20 (PBS-T), la placa fue enfrentada a los sueros diluidos en M 1% en PBS-T e incubada durante una hora a 37 °C. Como segundo anticuerpo se utilizó un conjugado de cabra anti-Inmunoglobulina G humana marcado con peroxidasa (Sigma, Saint Louis, MO, EEUU) diluido en PBS-T-M, y para completar la reacción peróxido de hidrógeno, el cromógeno orto-fenildiamina (Sigma) y HCl 1N. Las placas se leyeron en un lector automático de ELISA (MR 700, Dynatech Lab., Alexandria, VA., EEUU). Los sueros se ensayaron utilizando diluciones seriadas comenzando desde 1:12.5 y se definió el título para

cada suero como la máxima dilución que daba una lectura superior al doble de la de los controles.

2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se utilizó el sistema de buffer discontinuo [Dasso M. & de Titto E., 1992], con un gel de separación de 75 x 65 x 1mm con 12% de poliacrilamida. El gel de empaquetamiento con un 5% de poliacrilamida contenía una calle de 5 mm de ancho y otra de 60 mm. La más pequeña se utilizó para los marcadores de peso molecular (lactoalbúmina -14200-, inhibidor de tripsina de semilla de soja -20100-, tripsinógeno -24000-, anhidrasa carbónica bovina -29000-, ovoalbúmina de huevo de gallina -45000- y BSA -66200-, Bio-Rad Lab) y la calle más ancha para sembrar 170 μ l de la muestra, conteniendo 870-1000 μ g de CS, por gel.

La muestra se solubilizó por calentamiento a 100°C por 5 min luego de diluirla volumen a volumen con un buffer de disociación conteniendo SDS 2%, glicerol 20% y 2-mercaptoetanol (2ME) 2% en buffer Tris HCl, pH 6.8, 0.5 M.

Para determinar el frente de corrida se agregó azul de bromofenol en una concentración final de 0.016% tanto a los marcadores como a la muestra. La electroforesis se realizó a tensión constante (12 mA) en un buffer de corrida que contiene Tris 25 mM, glicina 192 mM, y SDS 0.1% p/v, pH 8.8 hasta que el frente de corrida haya llegado hasta el tope del gel.

2.5. Western blotting

Los componentes de CS separados por electroforesis en geles de poliacrilamida fueron transferidos a hojas de nitrocelulosa (poro de 0.45 μ de diámetro; Schleicher & Schuell BA 1985, Dassel, Alemania) a 40 volts por 18 horas empleando un buffer Tris HCl 25 mM (pH 8.3) conteniendo glicina 192 mM, SDS 0.015% p/v y metanol 20% v/v.

Luego de la transferencia se cortó una tira vertical de la calle más pequeña que contenía los marcadores de peso molecular y se la tiñó con Negro de Amido (0.1% p/v Negro de Amido, 45% metanol, 10% ácido acético). El resto de cada hoja fue bloqueada con PBS-T-5% M (pH 7.2) y lavada con PBS-T-M. Para la detección del antígeno la nitrocelulosa fue cortada verticalmente en tiras de 5 por 65 mm e incubada toda la noche a temperatura ambiente con las muestras de suero diluidas en PBS-T-M. Luego de ser lavadas con PBS-T-M, las tiras fueron tratadas con un conjugado anti-IgG humana marcado con peroxidasa, a la dilución óptima determinada (Sigma) por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de otro lavado, las tiras fueron reveladas con una solución conteniendo 0.5 mg de 3,3' tetraclorhidrato de diaminobencidina (DAB) (Sigma) por ml y peróxido de hidrógeno 0.1 % en PBS.

El color fue desarrollado durante 8 minutos y se interrumpió la reacción por lavado exhaustivo con PBS-T, secadas y fotografiadas. Todas las incubaciones se desarrollaron con un agitador con rotación.

Considerando crucial la decisión de si un determinado suero reacciona o no con ciertos polipéptidos y ante la dificultad en interpretar los resultados cuando una mezcla antigénica compleja, como la aquí estudiada se hace reaccionar con muchos sueros diferentes, más aún, la interpretación se hace incierta en el caso en que las bandas de reacción se encuentren en zonas de la nitrocelulosa con mucho material. Por lo tanto, se decidió ensayar cada suero al menos tres veces con

nitrocelulosas provenientes de diferentes geles y realizar la inspección ocular por dos observadores independientes cada vez.

Por otro lado, el amplio rango de títulos de anticuerpos anti-CS encontrado en los PChCr refleja la diferencia en el contenido de anticuerpos circulantes entre los pacientes estudiados, por lo que se decidió comparar el perfil individual de antígenos reconocidos por los diferentes sueros estudiando cada suero a la dilución correspondiente a la de su título, de manera tal de analizar cantidades comparables de anticuerpos.

En cada corrida los pesos moleculares aparentes de los polipéptidos desconocidos se estimaron por análisis de regresión lineal usando una curva standard construída a partir de la distancia de migración de los marcadores internos de peso molecular. Sólo se tomaron en cuenta para este estudio los geles cuyos coeficientes de regresión para los marcadores de peso molecular standards fueran superiores a 0.99.

2.6 Tinción para carbohidratos.

Las proteínas de CS separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y transferidas a membranas de nitrocelulosa como se describió anteriormente fueron lavadas repetidamente con PBS e incubadas por una hora a temperatura ambiente con BSA 1% pretratada con ácido periódico 10 mM (Sigma) en acetato de sodio, pH 4.5, (buffer de lavado) bajo agitación (Goding J.W. & Handman E., 1984).

Luego de tres lavados con PBS, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con el buffer de lavados conteniendo MnCl_2 1 mM y 50 μg de Concanavalina A (Con A, Type III Sigma) por ml. Al día siguiente, se realizaron lavados exhaustivos con PBS suplementado con MnCl_2 1 mM (sPBS) y la membrana se incubó con peroxidasa de rabanito (Type VI Sigma) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en sPBS. Luego de lavar con sPBS, las tiras se revelaron con una solución conteniendo tetraclorhidrato de 3,3' diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno en PBS, como se describió anteriormente. Como control negativo una porción de nitrocelulosa fue sometida a oxidación exhaustiva con ácido periódico 0.05 M en buffer acetato pH 4.5 (Graves D. et al., 1986) con agitación durante toda la noche. Luego se procedió con el protocolo descrito para determinación de azúcares.

RESULTADOS

2.1 Análisis de la fracción citosólica de T. cruzi por electroforesis en geles de poliacrilamida.

La fracción CS fue separada en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y teñida con Negro de Amido para identificar las proteínas.

Debido a que los pesos moleculares presentaron pequeñas diferencias entre las distintas corridas, las bandas se consideraron feacientemente como distintas cuando eran identificadas en un mismo gel. Se revelaron así un total de 12 bandas densas (fuertemente teñidas) y 22 livianas (débilmente teñidas) sumando un total de 34 componentes proteicos (Figura 2.2 y columna del extremo izquierdo de la Tabla 2.3). Las bandas densas correspondieron a polipéptidos con pesos moleculares aparentes de 62, 59, 56, 54, 44, 43 a 42, 40, 38, 37, 35, 31 y 30 kDa.

2.2. Identificación de glicoproteínas.

La identificación de las glicoproteínas ricas en residuos de manosa y glucosa presentes en la fracción CS fue investigada luego de separar a CS por SDS-PAGE, aprovechando la capacidad de dichos residuos para unirse a la Con A. La detección de Con A con peroxidasa y DAB reveló 16 bandas en un rango de peso molecular aparente de 83 a 17 kDa, todas ellas también visibles para tinción con Negro de Amido (Figura 2.2 y Tabla 2.3). Las bandas más densas correspondieron a polipéptidos con pesos moleculares de 83, 56, 54, 52, 35 y 32 kDa.

2.3. Respuesta inmune humoral hacia la fracción citosólica del T. cruzi.

El suero de los 36 PChCr estudiados contenían anticuerpos del tipo IgG hacia antígenos citosólicos, con títulos comprendidos entre 1:50 y 1:800, mientras que los 7 individuos seronegativos no reaccionaron en ninguna de las concentraciones ensayadas. Como se muestra en la Tabla 2.2, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios y los rangos de anticuerpos anti-CS de los distintos grupos clínicos.

2.4. Antígenos citosólicos del T. cruzi reconocidos por los sueros humanos.

Con el fin de identificar los componentes de CS reconocidos por los anticuerpos presentes en individuos crónicamente infectados con T. cruzi, los sueros de 36 PChCr clínicamente caracterizados y 7 controles no chagásicos se estudiaron empleando la técnica de inmunoblotting. Los sueros controles ensayados no reaccionaron a diluciones mayores o iguales a 1:25. Todos los sueros de PChCr, ensayados de 3 a 7 veces cada uno en la dilución correspondiente al título anti-CS, presentaron un perfil de reactividad reproducible, con discrepancias menores limitadas a bandas débiles que aparecieron ocasionalmente en algunos blots y que por no presentarse reproduciblemente no fueron considerados en el presente estudio. Los inmunoblots revelaron que los perfiles de reconocimiento antigénico variaban considerablemente entre los pacientes: de paciente a paciente algunas bandas diferían en intensidad y otras estaban ausentes. Cada uno de los sueros de los PChCr estudiados reconoció de 4 a 20 bandas sobre la fracción CS tratada con 2 ME (valor medio 12.6) sumando 32 polipéptidos diferentes. No se hallaron diferencias significativas entre los distintos

grupos clínicos de PChCr considerados; PChCr-0 (n=10): valor medio 8.0, rango 4-14, PChCr-1(n=11): 9.0 y 4-16 y PChCr 2/3 (n=11): 14.9 y 5-18. La amplia variedad de polipéptidos reconocidos incluyó 31 de las 34 bandas visibles por tinción para proteínas y una banda con peso molecular aparente de 73 kDa que se tiñe con Negro de Amido. Los blots se ilustran en la Figura 2.3, aunque la fotografía muestra menos detalles que las tiras originales.

Sin embargo, las bandas consideradas individualmente fueron reconocidas por diferente número de sueros de PChCr (Figura 2.4).

Las bandas con peso molecular aparente de 52 y 43/42 kDa fueron reconocidas por 30 (83%) y 28 (78%) sueros respectivamente, las bandas con PM de 70, 56, 54, 47, 40, 35, 28, 23, 21 y 19 kDa por 19 a 25 (53 a 69%) sueros, las bandas con PM de 92/88, 83, 73, 67, 59, 37, 32, 30 y 17 kDa por 10 a 17 (28 a 47%) y las 10 bandas restantes por menos de 9 (25%) de los sueros de los PChCr.

Cuando se evaluó la frecuencia de reconocimiento de las diferentes bandas resultó que 24 de los 36 sueros ensayados, contenían anticuerpos hacia las dos bandas mayoritarias, mientras que 10 de los 12 sueros restantes reconocieron al menos una de ellas, restando sólo 2 sueros (5.5%) no reactivos con ninguno de estos polipéptidos. Es interesante destacar que la banda equivalente a la de 52 kDa en el gel correspondía a una banda teñida débilmente para proteínas y fuertemente teñida para azúcares mientras que la banda de 43/42 aparecía intensamente teñida para proteínas y débilmente para azúcares.

Aunque las bandas fuertemente teñidas en el inmunoblotting aparecieron con la mayoría de los sueros ensayados, la comparación de la intensidad de marca entre los diferentes sueros no reveló ningún componente antigénico universal.

CONCLUSIONES Y DISCUSION

El análisis electroforético de los componentes polipeptídicos de la fracción CS proveniente de distintas preparaciones de homogenato del parásito mostró perfiles prácticamente idénticos entre las diferentes corridas. La tinción para proteínas reveló un total de 34 bandas, 16 de las cuales incluían residuos de manosa glucosa.

Concordando con resultados previos (de Titto E. et al., 1987) se detectaron anticuerpos anti-CS en los 36 PChCr caracterizados serológica y clínicamente y no en ninguno de los controles sanos ni en los pacientes con miocarditis idiopática. El estudio por inmunoblotting reveló la complejidad antigénica de la fracción CS, mostrando una variación de reactividad considerable entre los sueros de distintos PChCr. Entre las múltiples bandas detectadas, dos de ellas con PM de 52 y 43/2 kDa fueron reconocidas por la gran mayoría de los sueros (95%), sugiriendo la potencial utilidad de dichos componentes antigénicos en el inmunodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas. La intensidad de tinción para proteínas no pudo ser relacionada con la frecuencia de reconocimiento inmunológico, sugiriendo así que la inmunogenicidad de los diferentes polipéptidos no está ligada a la abundancia relativa de los mismos en el parásito.

Durante largo tiempo se ha sostenido que las diferencias encontradas en el reconocimiento antigénico de los pacientes, resultando en procesos de inmunidad protectivos y/o autoagresivos podría reflejarse en la distinta producción de anticuerpos durante la infección. Sin embargo, en el presente trabajo, el estudio por inmunoblotting si bien mostró la variada heterogeneidad de las respuestas de los diferentes individuos no permitió poner en evidencia ninguna diferencia en la cantidad y/o identidad de los polipéptidos de CS reconocidos por los diferentes grupos de pacientes siendo así más difícil relacionar los perfiles de producción de anticuerpos con el estadio clínico. Por lo tanto no se pudo confirmar los resultados previos reportados por [Hudson L., 1983 y Cerbán F.M. et al., 1993] sugiriendo que algunos polipéptidos citosólicos eran diferencialmente reconocidos por PChCr de acuerdo a su estadio clínico; aunque esta discrepancia puede deberse a las diferencias en la metodología empleada en cada caso. Cabe destacar que los resultados experimentales se hallan fuertemente condicionados por la metodología empleada, como se ha demostrado para antígenos de superficie (Schechter M. & Nogueira N., 1988) y de la fracción microsomal (Dasso M. & de Titto E., 1992] de T. cruzi. Más aún, se ha aceptado que el perfil de reactividad observado refleja, al menos en parte, las diferencias antigénicas entre la cepa de parásito empleada en el laboratorio y la responsable de la infección original de los pacientes estudiados.

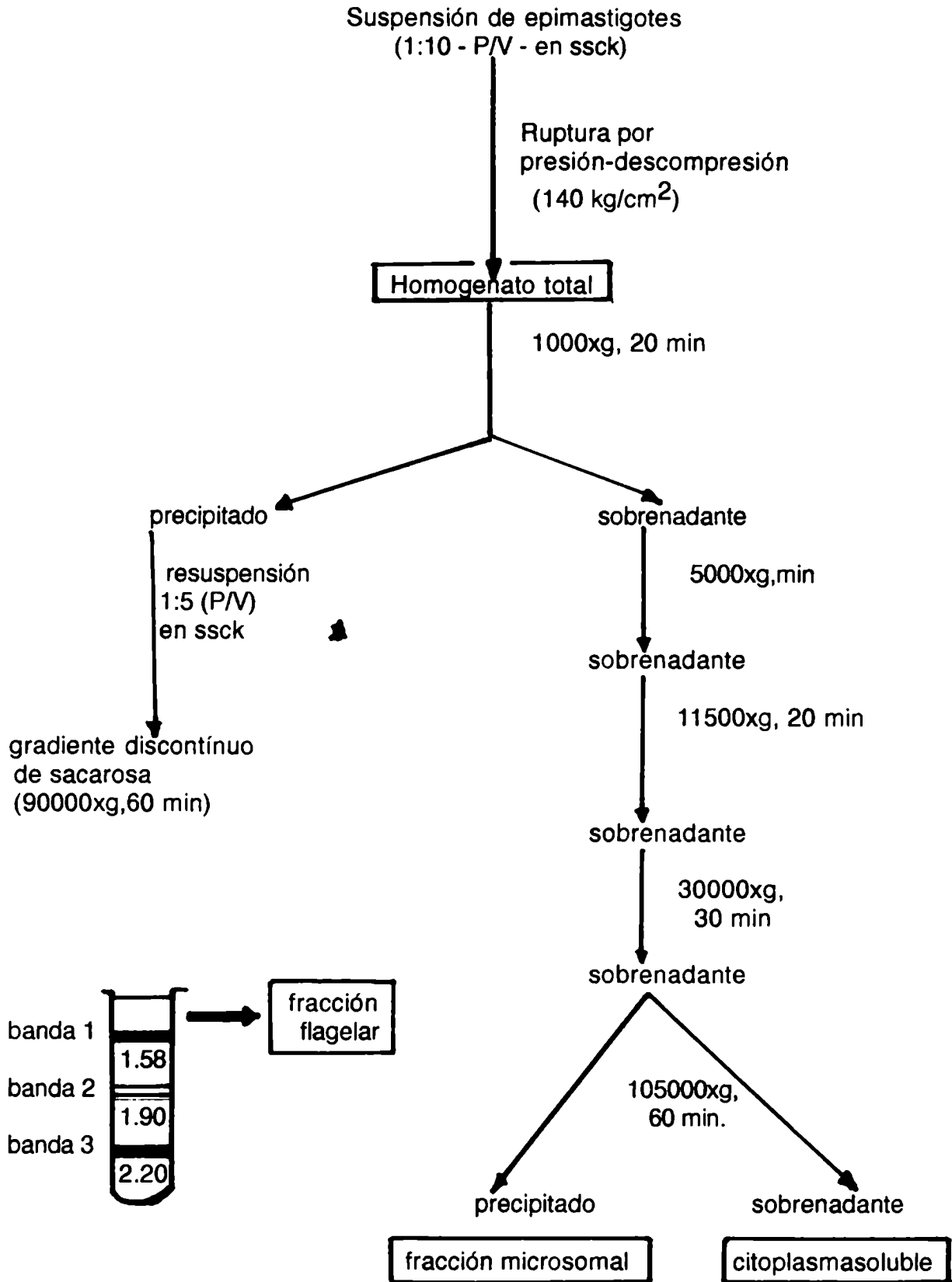
Por otro lado, para varias enfermedades causadas por protozoos - leishmaniasis (Evans T.G. et al., 1988), toxoplasmosis (Remington J.S. et al., 1985)- y helmintos - hidatidosis (Larralde C. et al., 1989), strongilodiasis (Sato Y. et al., 1990)- se ha descrito la heterogeneidad en los perfiles de anticuerpos dirigidos contra antígenos parasitarios, sugiriendo que la selección de los antígenos blanco de la respuesta inmune individual depende de factores que están más allá de la estructura química del parásito.

En síntesis, la fracción CS del T. cruzi, capaz de inducir en huéspedes no infectados daño tisular semejante a la infección experimental crónica, mostró en el presente estudio contener un amplio número de componentes proteicos y glicopeptídicos, la mejor parte de los cuales induce la formación de anticuerpos específicos en el curso de la infección natural.

Los resultados presentados serán de gran utilidad para el entendimiento de los mecanismos inmunes asociados a la infección crónica y para el desarrollo de nuevas herramientas para mejorar la asistencia de los pacientes chagásicos crónicos.

Figura 2.1

Método de obtención de fracciones subcelulares de Trypanosoma cruzi



kDa

66 -

45 -

29 -

24 -

14 -

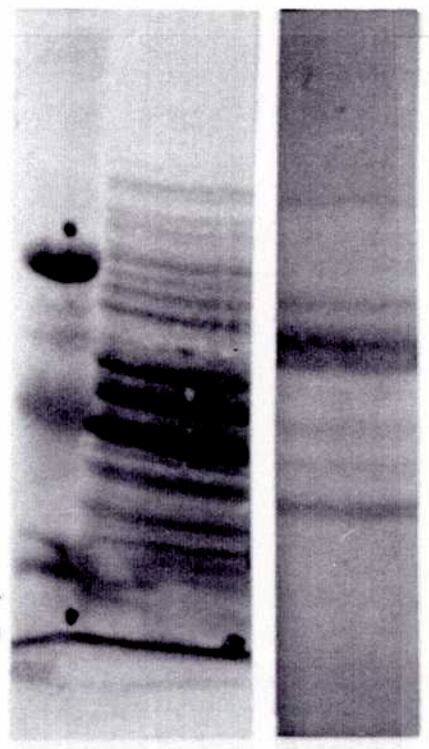


Figura 2.2. Perfil polipeptídico y glicoproteínas del CS del T. cruzi determinado por tinción con Negro de Amido y con CON A respectivamente. De izquierda a derecha: PM, tinción para proteínas y determinación de glicoproteínas.

Figura 2.3. Inmunoblots de sueros de PChCr contra CS luego de la separación de CS por SDS-PAGE y transferencia a nitrocelulosa. Polipéptidos de CS reconocidos por sueros normales (línea 1) y por sueros de PChCr (líneas 2 a 6) y tinción con Negro de Amido (línea 7). Los números a la derecha indican marcadores de peso molecular conocidos (PM).

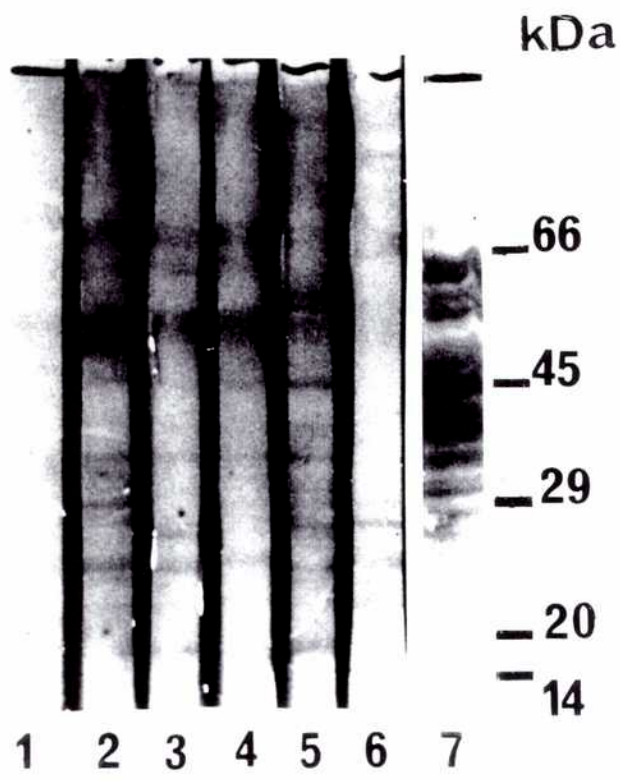


Figura 2.4. Distribución y frecuencia del reconocimiento de los componentes del CS de T. cruzi por los sueros de PChCr.

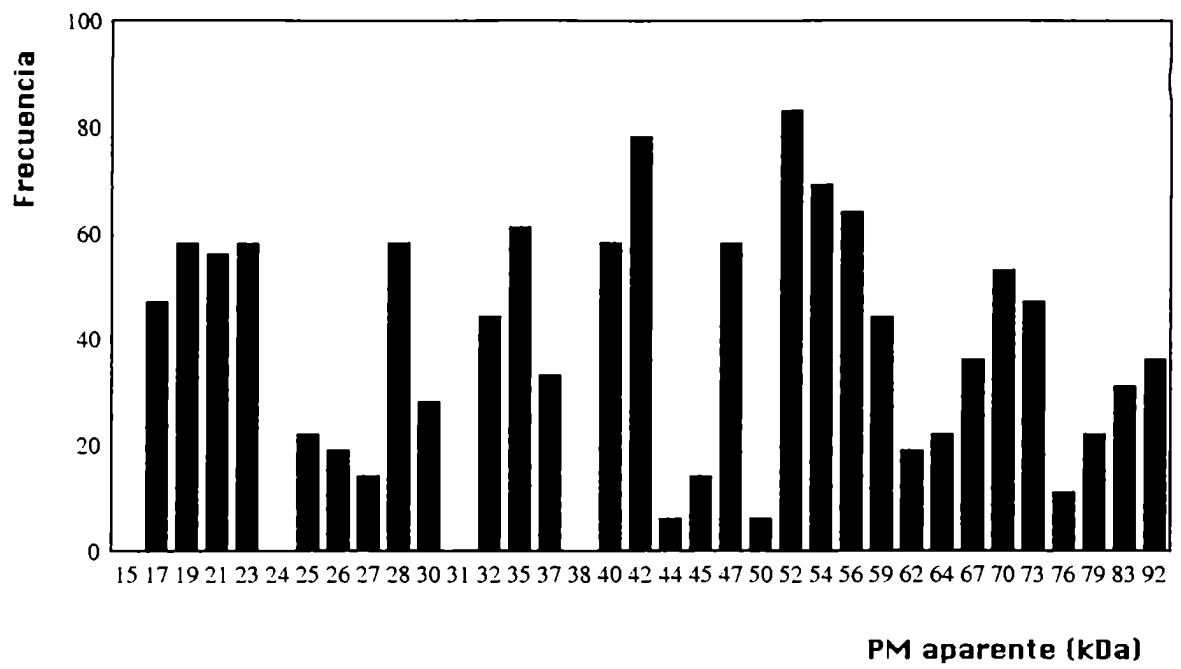


TABLA 2.1

CLASIFICACION DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS

Grupo	Características clínicas
<p>PChCr-0: pacientes chagásicos sin compromiso cardíaco.</p>	<p>Comprende los pacientes asintomáticos que no se hallan dentro de la categoría de exclusión. Presentan electrocardiograma y ecocardiograma normales. Además, deben tener una fracción de eyección mayor de 0.50 y no presentar alteraciones de la motilidad parietal.</p>
<p>PChCr-1: pacientes chagásicos, con cardiopatía compatible con Chagas en grado menor o en el límite.</p>	<p>Se incluyen en este grupo a aquellos pacientes que muestran anomalías cardíacas menores o aisladas, demostradas por:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) Fracción de eyección mayor o igual a 0.40 con motilidad parietal normal. b) Alguna forma de bloqueo intraventricular (bloqueo incompleto o completo de rama derecha -BRD-, hemibloqueo anterior -HBA- o posterior -HBP-). c) BAV de segundo o tercer grado. d) Disfunción del nódulo sinusal. e) Taquicardia ventricular sostenida y/o fibrilación ventricular. f) Extrasístoles ventriculares polifocales o con formas repetitivas (dúplas y/o taquicardia ventricular autolimitadas). g) Anormalidades en el segmento ST y/o onda T del ECG convencional.

PChCr-2: Estos pacientes tienen una cardiopatía chagásica clásica. La clínica muestra evidencia de lesión principalmente en los tejidos de conducción. Los criterios seguidos son similares a los de la categoría 1, con excepción de las siguientes observaciones:

pacientes chagásicos con lesión cardíaca, con injuria predominante en el sistema de conducción, incluídos los nódulos auriculoventricular y sinoatrial.

a) Fracción de eyección entre 0.31 y 0.40 y/o la presencia de aneurisma apical.
b) La radiografía y la ecocardiografía muestran un corazón de tamaño normal o ligeramente alargado (grado 0 a 2) que puede mostrar disquinesias focales o poco perceptibles. El daño predominante en los tejidos de conducción esta determinado por las siguientes observaciones:
c) Bloqueo auriculoventricular (BAV) de segundo o tercer grado, casi invariablemente por debajo del Haz de Hiss.
d) Bloqueo de rama derecha (BRD) y hemibloqueo anterior izquierdo (HAI) o hemibloqueo posterior izquierdo (HPI)
e) Depresión del nódulo sinusal.

PChCr-3: Presentan evidencia definitiva de injuria miocárdica de acuerdo a por lo menos tres de los siguientes elementos:

pacientes con patología cardíaca compatible con la Enfermedad de Chagas avanzada.

a) Fracción de eyección menor o igual a 0.30 y anomalías de la motilidad parietal (hipoquinesia global, disquinesia regional o aquinesia), determinada por ventriculografía radioisotópica y ecocardiografía bidimensional.
b) Radiografía y ecocardiografía con cardiomegalia (grado 3 y 4) y disquinesia.
c) Bloqueo intraventricular de rama derecha o hemibloqueo izquierdo, o ambos.
d) Depresión del nódulo sinusal.
e) Arritmias ventriculares (extrasístoles ventriculares multiformes y frecuentes, con taquicardia ventricular).

Tabla 2.2
Características de la población estudiada.

Grupo	Características Clínicas	n	Sexo M-F	Edad media \pm SD ^a (rango)	Serología para <u>T. cruzi</u>	Título anti-Mc media \pm SD ^b (rango)
PChCr-0	Sin manifestaciones cardíacas	14	7-7	31.6 \pm 10.5 (18-50)	Positivo	6.9 \pm 1.2 (1:50-1:400)
PChCr-1	Con manifestaciones cardíacas en grado menor o en el límite	11	6-5	36.7 \pm 13.6 (18-65)	Positivo	7.0 \pm 1.2 (1:50-1:800)
PChCr-2	Con manifestaciones cardíacas moderadas o graves	11	6-5	48.8 \pm 10.7 (28-63)	Positivo	8.2 \pm 1.5 (1:50-1:1600)
C.N	Controles sanos	4	2-2	40.2 \pm 10 (33-55)	Negativo	< 3,6 < 1:12
I.M.P.	Pacientes con miocardiopatía idiopática.	3	2-1	46,3 \pm 8,6 (37-54)	Negativo	< 3,6 < 1:12

a. Diferencias no significativas entre grupos.

b. Log 2 de los títulos. Diferencias no significativas entre grupos.

PROTEINAS, GLICOPROTEINAS Y WB EN CS NATIVO Y SOMETIDO A DISTINTOS TRATAMIENTOS QUIMICOS

PM Aparente (kDa)	CS Nativo		CS tratado c/ ác. periódico		CS clivado con tripsina		CS solubilizado sin 2 ME		CS solubilizado a 4° C	
	PROTEINA	AZUCAR	WB	WB	PROTEINA	WB	PROTEINA	WB	PROTEINA	WB
126							DEBIL			
118							DEBIL			GANADA
100							DEBIL			
96							DEBIL			
92/88	DEBIL		SI*	PERDIDA			DEBIL	PERDIDA	DEBIL	RETENIDA
83	DEBIL	DENSA	SI*	PERDIDA			PERDIDA		PERDIDA	
79	DEBIL		SI*	PERDIDA			RETENIDA		DEBIL	PERDIDA
76	DEBIL	LIVIANA	SI				DEBIL		DEBIL	
73			SI							
70	DEBIL		SI				FUERTE			
67	DEBIL		SI				DEBIL			
64	DEBIL		SI				FUERTE			
62	FUERTE	LIVIANA	SI				DEBIL			
59	FUERTE	LIVIANA	SI*	PERDIDA			FUERTE	RETENIDA		
56	FUERTE	DENSA	SI*	PERDIDA			DEBIL	PERDIDA		DEBIL
54	FUERTE	DENSA	SI*	PERDIDA			DEBIL	PERDIDA		DEBIL
52	DEBIL	DENSA	SI*	DISMINUIDA			FUERTE	PERDIDA		RETENIDA
50	DEBIL		SI				FUERTE			DEBIL
47	DEBIL	LIVIANA	SI*	PERDIDA			DEBIL	PERDIDA		DEBIL
45	DEBIL		SI*	PERDIDA			DEBIL	PERDIDA		DEBIL
44	FUERTE		SI*	DISMINUIDA			DEBIL	PERDIDA		DEBIL
43/42	FUERTE	LIVIANA	SI*	PERDIDA			DEBIL	RETENIDA		DEBIL
40	FUERTE		SI				FUERTE			DEBIL
38	FUERTE	LIVIANA	SI	GANADA			DEBIL			DEBIL
37	FUERTE		SI				DEBIL			DEBIL
35	FUERTE	DENSA	SI				DEBIL			DEBIL
32	DEBIL	DENSA	SI*	PERDIDA			DEBIL			DEBIL
31	FUERTE		SI				FUERTE	DISMINUIDA		DEBIL
30	FUERTE		SI				DEBIL			DEBIL
28	DEBIL		SI	DISMINUIDA			DEBIL			DEBIL
27	DEBIL		SI				DEBIL			DEBIL
26	DEBIL		SI				DEBIL			DEBIL
25	DEBIL	LIVIANA	SI*	RETENIDA			DEBIL			DEBIL
24	DEBIL		SI				DEBIL			DEBIL
23	DEBIL		SI	GANADA			DEBIL			DEBIL
21	DEBIL	LIVIANA	SI*	RETENIDA			DEBIL	RETENIDA		DEBIL
19	DEBIL	LIVIANA	SI*	PERDIDA			DEBIL			DEBIL
17	DEBIL	LIVIANA	SI*	PERDIDA			DEBIL			DEBIL
15	DEBIL									

* Indican los polipéptidos estudiados por WB con los distintos tratamientos químicos

CAPITULO III

ANALISIS INMUNOQUIMICO DE LOS COMPONENTES DE LAS FRACCIONES CITOSOLICA Y MICROSOMAL DEL TRYPANOSOMA cruzi

INTRODUCCION

Una vez identificados los componentes de Mc y CS reconocidos por sueros de pacientes chagásicos crónicos resulta de particular importancia analizar las correspondencias entre estructura química y antigenicidad de cada uno de ellos.

Estos estudios permitirán mapear los determinantes inmunogénicos en los péptidos identificados anteriormente, y facilitarán la elección del camino más adecuado para su obtención en forma pura.

Para obtener una caracterización química inicial de los epitopos de la fracción citosólica y microsomal del T. cruzi, las fracciones fueron sometidas a distintos tratamientos luego de los cuales CS y Mc fueron separadas por SDS-PAGE para estudiar los cambios en la separación polipeptídica, y usadas como antígeno para los ensayos de ELISA, e inmunoblotting para investigar los cambios en la antigenicidad debidos a la modificación del antígeno, siempre en paralelo con muestras de CS y Mc nativas.

MATERIALES Y METODOS

3.1. Tratamientos de los antígenos

Los ensayos de ELISA permitieron analizar la variación en la reactividad global por efecto del tratamiento mientras que los estudios de SDS-PAGE permitieron identificar los polipéptidos sensibles a los distintos tratamientos y el inmunoblotting sus efectos sobre la inmunorreactividad.

1.1. Oxidación con periodato.

Para el ensayo de ELISA, el antígeno se llevó a una concentración de 0.8 mg/ml con una solución de $\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M en PBS 10 mM, incubado a 28°C por 2 hs con agitación y dializado toda la noche contra PBS (Schulz T.F. et al., 1987).

Alternativamente, porciones individuales de nitrocelulosa conteniendo proteínas de Mc o CS separadas por SDS-PAGE (ver 2.4) se incubaron con PBS suplementado con 1% de Tween 20 (PBS-T) por una hora a 37 °C. Luego de cinco lavados con PBS, las tiras se trataron con una solución de $\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 M en buffer acetato de sodio 0.01 M, pH 4.5, por 18 hs a 4°C (Graves D. et al., 1986) mientras que el control se trató en paralelo con buffer acetato. Después de la incubación, las tiras se lavaron tres veces con PBS-T y se realizó el ensayo de inmunoblotting como se detalló anteriormente (ver 2.5)

1.2. Tripsina.

Para el ensayo de ELISA, el antígeno en una concentración de 1mg/ml se incubó con una solución de tripsina pancreática (Sigma Chemical Co.) 100 µg/ml en buffer NET (0.1 M tris HCl, 0.14 M NaCl, 0.01 M EDTA) por una hora a 37°C con agitación. La reacción se detuvo con TLCK (Sigma Chemical Co. T7254) y PMSF (Sigma Chemical Co. P7626) en una concentración final de 2mM (Tamura A. et al., 1985).

Alternativamente, porciones individuales de nitrocelulosa conteniendo proteínas de la fracción correspondiente separadas por SDS-PAGE (ver 2.4) se incubaron por una hora a 37°C en PBS-T. Luego de cinco lavados con PBS, las tiras se trataron con una solución de tripsina 100µg/ml en PBS suplementado con MgCl_2 0.02 M, pH 7.4, por dos horas a 37 °C mientras que los controles se trataron en paralelo con PBS. Después de la incubación, se realizó el inmunoblotting como se describió anteriormente (2.5) Se realizó también un control para corroborar la funcionalidad de la enzima midiendo su actividad hacia proteínas conocidas (resultado no presentado).

1.3. 2ME.

Para el ensayo de ELISA, se agregó 2ME a la muestra antigénica en una concentración final del 10 %, y luego se incubó a temperatura ambiente por 30 min antes de ser usada. En paralelo, se utilizaron como control, muestras no tratadas con 2 ME. Muestras de CS o Mc solubilizadas con buffer de disociación sin 2ME fueron separadas por SDS-PAGE (ver 2.4) y utilizadas para experimentos de inmunoblotting (2.5).

1.4. Calor.

Muestras de CS y Mc calentadas a 100°C por 5 minutos se utilizaron como antígeno para los experimentos de ELISA en paralelo con las muestras regularmente no calentadas. Por otro lado, muestras de CS tratadas con 2ME se incubaron por 5 minutos a diferentes temperaturas desde 4°C hasta 100°C. Luego se separaron por SDS-PAGE (ver 2.4) para estudiar los efectos del tratamiento sobre la separación y se realizaron ensayos de inmunoblotting (ver 2.5) para determinar la presencia de epitopos conformacionales.

RESULTADOS

Para los ensayos de ELISA se utilizaron 8 sueros de PChCr para CS y 7 para Mc. Para los ensayos de inmunoblotting con CS posterior al tratamiento se utilizaron tres sueros de PChCr que reconocían por inmunoblotting un total de 17 polipéptidos diferentes mientras que para Mc se utilizaron 6 sueros que reconocían un total de 15 polipéptidos. Para ambos ensayos de ELISA e inmunoblotting los sueros se utilizaron a la dilución de título como se describió en el capítulo II.

En el ensayo de ELISA se calculó para cada suero el porcentaje de reactividad remanente luego del tratamiento como: $(DO \text{ sobre CS tratada} / DO \text{ sobre CS nativa}) \times 100$. Para asegurar la reproducibilidad de los resultados los sueros se ensayaron 4 veces para cada condición.

3.1. Efecto de la modificación antigénica del CS de T. cruzi sobre el perfil de proteínas y sobre la antigenicidad

1.1. Efecto del ácido periódico.

El tratamiento de CS con ácido periódico no alteró significativamente el perfil polipeptídico visible por tinción con Negro de Amido. Por el contrario, el reconocimiento de CS por anticuerpos específicos disminuyó significativamente, resultando una reactividad remanente del 51 ± 11 (SD) %. Sin embargo, parecería que el efecto depende del perfil individual de antígenos parasitarios reconocidos ya que la pérdida de reactividad varía entre un 38 y 64 % de la reactividad original (Figura 3.1).

Para los experimentos de inmunoblotting, el control del tratamiento se realizó comparando los perfiles proteicos de dos porciones de nitrocelulosa conteniendo CS tratada y no tratada respectivamente, constatando que no hubiese diferencias entre ambas. El inmunoblotting reveló que el tratamiento destruía la reactividad hacia los componentes con pesos moleculares aparentes de 88, 83, 79, 59, 56, 54, 47, 45, 43/42, 32, 19 y 17 kDa, sugiriendo que los carbohidratos son esenciales en la inmunogenicidad de los mismos. Además, disminuyó la reactividad hacia las bandas de 52, 44 y 28 kDa, señalando que los determinantes antigénicos de estos polipéptidos son parcialmente de naturaleza glucídica, mientras que los epitopos de los polipéptidos con PM de 25 y 21 kDa no fueron afectados por el tratamiento. Es interesante destacar que el tratamiento reveló epitopos en un polipéptido de 23 kDa que no había sido visto por los sueros empleados en este estudio, y en un polipéptido de 38 kDa no reconocido por ninguno de los 36 sueros ensayados inicialmente. Más aún, el tratamiento con periodato reveló residuos carbohidratados distintos de manosa y glucosa en los polipéptidos de 92/88, 79, 45 y 28 kDa (Tabla 2.3).

1.2. Efecto de la tripsinización.

En primer lugar, las diferencias en las condiciones de trabajo empleadas por otros autores (Graves D. et al., 1986; Tamura A. et al., 1985) llevaron a analizar la actividad enzimática en función del tiempo para optimizar así las condiciones a utilizarse en el presente estudio. Para ello se ensayaron por ELISA cuatro sueros

con antígeno tratado con tripsina por diferentes tiempos hasta un máximo de 60 min. Se observó que el efecto máximo se alcanzaba tan pronto como a los dos minutos de tratamiento (Figura 3.2).

El perfil proteico de CS tratada con tripsina visto por tinción con Negro de Amido mostró algunas diferencias con respecto al perfil original, incluyendo todas las bandas excepto 7 (PM de 83, 70, 67, 52, 47, 25 y 15 kDa) de las 34 descritas anteriormente. Sin embargo la imagen como un todo apareció teñida menos intensamente que la original, sugiriendo que la mayoría de los polipéptidos de CS son sensibles al tratamiento con tripsina (resultados no mostrados). Mayor evidencia sobre la sensibilidad de CS a la tripsina se demostró por ELISA e inmunoblotting.

CS tripsinizado retuvo sólo el $18 \pm 11\%$ (rango 4-38) de la reactividad original (Figura 3.1). Dos de los tres sueros estudiados por inmunoblotting mostraron solamente un banda amplia e intensa con reactividad en un rango de PM de 48-42 kDa. El tercer suero presentó esta misma banda y otra en el rango de 35-31 kDa.

Para aclarar la naturaleza de esta insensibilidad se realizó el siguiente ensayo adicional: porciones de nitrocelulosa conteniendo CS después de separada por SDS-PAGE fueron incubadas con la solución de tripsina y, luego de lavados exhaustivos, tratadas con ácido periódico como se describió anteriormente. El enfrentamiento del material resultante con los sueros chagásicos no reveló ninguna banda reactiva, sugiriendo que los epitopos de los polipéptidos con PM de 48-42 y 35-31 kDa, insensibles a la tripsina, son de naturaleza glucídica.

1.3. Efecto del 2ME.

El perfil de proteínas obtenido cuando CS se solubilizó con un buffer sin 2ME mostró algunas diferencias con respecto al obtenido empleando 2ME (Figura 3.3).

Aparecieron nuevas bandas con PM de 126, 118, 100 y 96 kDa, pero no doce bandas entre las previamente descritas (83, 79, 56, 54, 45, 38, 37, 31, 26, 24, 21 y 15 kDa) en la solubilización standard que emplea 2ME resultando entonces un perfil de 26 bandas (Tabla 2.3). La reactividad de los sueros en los ensayos de inmunoblotting con CS no tratada con 2ME fue también menor que la obtenida con la muestra de CS regularmente tratada con 2ME. Como se resume en la Tabla 2.3, la capacidad de unión de los anticuerpos a las bandas de 79, 59, 43/42, 32, 28, 25, 21 y 19 kDa es retenida, aunque las bandas correspondientes a 79 y 21 kDa no fueron visibles por tinción para proteínas cuando CS no fue tratada con 2ME. Por otro lado, los anticuerpos no reaccionaron con las bandas de PM aparente de 92/88, 83, 56, 54, 52, 47, 45, 44 y 17 kDa, algunos de ellos tampoco visibles para tinción para proteínas. Es interesante destacar que no se reveló reactividad hacia las nuevas bandas de "alto peso molecular". Sin embargo, la reactividad total de los anticuerpos hacia CS tratada con 2ME fue de $72 \pm 11\%$ (rango 51-81) de la reactividad hacia CS no tratada (Figura 3.1).

Para analizar si la unión del antígeno a la placa era afectada por el tratamiento con 2ME, este experimento se realizó de dos maneras: fijando a la placa el antígeno previamente tratado con 2 ME o tratando al antígeno después de haberlo fijado a la placa. Ambos procesos dieron resultados indistinguibles (resultados no mostrados).

1.4. Efecto del calentamiento.

La electroforesis de CS solubilizada en buffer de disociación y calentada por 5 minutos a 4, 37, 50, 80 y 100°C mostró prácticamente el mismo perfil proteico (Figura 3.4). Sin embargo, a medida que se aumentaba la temperatura de disociación, se obtuvo una mayor definición de las bandas, obteniendo los mejores resultados a la temperatura normalmente usada de 100°C. Los límites en la definición de este gradiente se observa en la Tabla 2.3: CS no calentada no presenta las bandas de 83, 70, 52, 47, 26 y 15 kDa las cuales aparecieron gradualmente con el calentamiento del antígeno.

Para analizar las consecuencias del calentamiento sobre la antigenicidad de CS se realizaron ensayos de inmunoblotting con CS solubilizada a 4°C. Al comparar estos resultados con los inmunoblots provenientes de muestras de CS calentada resultó que cuando no se calentaba el antígeno se ganaba reactividad hacia varios polipéptidos (PM de 50, 38, 37 y 23 kDa) o se modificaba parcialmente (PM de 56, 43/2, 32 y 21 kDa). Más aún, un polipéptido con PM de 100 kDa no detectado por tinción para proteínas, ya sea con CS calentada o no, fue reconocido por anticuerpos cuando se utilizó como muestra CS no calentada. Por otro lado, el reconocimiento de varios polipéptidos (PM de 83, 79, 59, 54, 47, 45 y 44 kDa) parece requerir el calentamiento del antígeno ya que no se detectan cuando CS no es calentado, mientras que los epitopes de los polipéptidos con PM de 92/88, 52, 28, 25, 19 y 17 kDa parecen resistentes al tratamiento.

De acuerdo con estos resultados, el calentamiento de la fracción CS antes de ser empleado como antígeno en experimentos de ELISA redujo la cantidad de anticuerpos anti-CS detectados por los sueros de PChCr (Figura 3.1): la unión de los anticuerpos fue del $75 \pm 14\%$ (rango 54-90%) de la obtenida con CS nativa, resultando el efecto muy heterogéneo con los diferentes sueros. Para analizar si los efectos del 2ME y del calentamiento eran acumulativos, CS diluida al 10% con 2ME y calentada por 5 minutos a 100°C se utilizó como antígeno en un ensayo de ELISA en paralelo con muestras de CS calentada o nativa tratadas únicamente con 2ME.

Tanto la muestras calentadas y tratadas con 2ME como las muestras tratadas separadamente con 2ME o calor detectaron el 75% de los anticuerpos medidos cuando se utilizó CS nativa (datos no mostrados), demostrando así que los efectos no son acumulativos.

3.2. Estudio de la estructura química de los antígenos microsomales de T. cruzi.

2.1. Oxidación con ácido periódico.

El tratamiento de Mc con ácido periódico retuvo solamente el 18 ± 7 (SD) % (rango 9-32%) de la reactividad original. Debe notarse sin embargo, que las condiciones experimentales (control de tratamiento) son responsables de una porción significativa de esta pérdida (56%). Por lo tanto si tomamos como 100% la reactividad hacia CS con tratamiento control, el efecto de la oxidación con periodato es menor, resultando una reactividad remanente del 43 ± 11 (ver Tabla 3.1).

Por inmunoblotting se estudiaron 7 de las 9 proteínas que contienen hidratos de carbono ricos en manosa y glucosa (Tabla 3.2). El tratamiento sólo abolió el

reconocimiento hacia 2 (64/66 y 58 kDa) de las 7 glicoproteínas, preservando el reconocimiento de las 5 restantes (78,40,28,22 y 19 kDa).

2.2. Efecto de la tripsina.

Después del tratamiento de Mc con tripsina el reconocimiento de la misma por anticuerpos específicos se redujo a un 13 ± 7 % (rango 7-28) de la reactividad obtenida con Mc nativa mientras que si consideramos que las drásticas condiciones necesarias para el tratamiento con tripsina (control de tratamiento) fueron responsables de la pérdida de gran parte de la reactividad, el % de reactividad remanente resulta del 45 ± 19 % (Tabla 3.1).

2.3. Efecto del 2Me.

Ya que previamente hemos demostrado que la unión del antígeno a las placas de ELISA no se ve afectada por el tratamiento con 2Me, estos experimentos se realizaron pegando a las placas el antígeno previamente tratado. La unión de los anticuerpos a Mc tratada con 2Me fue del 31 ± 9 % (rango 18-45) de la unión a Mc no tratada (Tabla 3.1).

La solubilización de Mc sin 2 ME produjo un perfil polipeptídico distinto del de Mc solubilizado con 2 ME. Se perdieron 13 de los 24 componentes identificados por tinción con Negro de Amido, resultando en un perfil de 11 componentes (Tabla 3.2).

El inmunoblotting reveló que la integridad de los puentes disulfuros es necesaria para el reconocimiento de los epitopos de los componentes con 48/51,42/43, 40/ y 23 kDa. Por otro lado la antigenicidad de las bandas con peso molecular aparente de 36/37,30, 24, 21/22, 20 y 17/18 no esta relacionada con los puentes disulfuro. Interesantemente la ruptura de los puentes disulfuro aumenta la exposición de los epitopos en los componentes de 64/66, 58, 54, 33 y 27 kDa. El reconocimiento hacia bandas no detectadas por tinción para proteínas en Mc solubilizada sin 2 ME (64/66,58, 54 y 36/37 kDa) muestra una vez más la alta sensibilidad de la técnica de WB.

2.4. Efecto del calentamiento.

El calentamiento de la fracción Mc antes de ser empleada como antígeno en ensayos de ELISA redujo significativamente la cantidad de anticuerpos anti-Mc detectada en los sueros de PChCr. La unión media fue para los sueros de PChCr del 28 ± 10 % (rango 15-44) de la medida con Mc nativa (Tabla 3.1).

CONCLUSIONES Y DISCUSION

El tratamiento de CS y Mc con ácido periódico, un agente oxidante de los grupos hidroxilos de los residuos azucarados, puso en evidencia el rol central de los carbohidratos en la antigenicidad de los componentes de dichas fracciones.

Después del tratamiento de CS, se perdió la reactividad de los anticuerpos hacia 12 bandas con pesos moleculares aparentes en el rango de 92/88 a 17 kDa mientras que para otras 3 bandas hubo una disminución de la misma, revelando así que la antigenicidad de la mayoría de los polipéptidos en CS está fuertemente ligada a los carbohidratos como se sugirió, anteriormente (Xu B. & Powel M.R., 1991), para la mayoría de los anticuerpos desarrollados contra parásitos. Sólo las bandas de 25 y 21 kDa fueron insensibles al tratamiento con ácido periódico.

A pesar que para Mc parte de la reactividad se pierde por las condiciones del tratamiento, los resultados obtenidos por ELISA mostraron también que parte de la reactividad de los sueros es hacia componentes glicoproteicos. Cabe destacar que el menor efecto observado por WB en Mc comparado con los resultados por ELISA puede deberse a que la mayor parte de la reactividad de los sueros sea hacia las glicoproteínas con 64/66 y 58 kDa, las únicas dos cuyo reconocimiento se pierde por el tratamiento. Por otro lado, pudo comprobarse que la oxidación fue total ya que no fue posible detectar glicoproteínas luego del tratamiento con periodato.

Además, la técnica usada para detección de glicoproteínas sólo identifica a aquellas con residuos ricos en manosa y glucosa no permitiendo emitir ningún juicio sobre la reactividad hacia otros azúcares.

La composición polipeptídica y antigénica de CS y Mc fue analizada modificando las condiciones de solubilización antes de la separación por electroforesis y a los ensayos de inmunoblotting. Varios polipéptidos se transformaron en moléculas de mayor o menor PM al usar distintas condiciones para solubilizar la muestra.

El perfil de CS después del tratamiento con tripsina mostró la desaparición de varias bandas, indicando la sensibilidad de estos polipéptidos a la acción de enzimas proteolíticas. Por otro lado, la digestión de CS con tripsina después de haber sido separada por electroforesis y transferida a nitrocelulosa, eliminó la mayoría de la reactividad con anticuerpos específicos, indicando que la antigenicidad de la mayoría de los componentes de CS depende de la integridad de las proteínas. La reactividad remanente, dos amplias bandas con PM de 48-42 y 35-31 kDa, fueron sensibles al tratamiento con ácido periódico indicando así la naturaleza glucídica de los sitios antigénicos restantes.

El tratamiento de Mc con tripsina también disminuyó el reconocimiento antigénico, aunque parte de la reactividad se pierde por las condiciones del ensayo, efecto no observado para CS utilizando las mismas condiciones experimentales. La mayor sensibilidad observada en Mc con respecto a CS podría explicarse por las diferencias en composición química entre ambas fracciones.

Cuando CS se solubilizó con un buffer de disociación sin 2ME hubo una conversión de los polipéptidos de menor peso molecular a otros de mayor PM, presentando el nuevo perfil 26 componentes. Es interesante destacar que no se detectó reactividad hacia ninguno de los nuevos polipéptidos de alto peso

molecular. Sin embargo, las dificultades que se presentan en la transferencia de la muestra a la nitrocelulosa cuando se solubiliza la misma en un buffer sin 2ME hace incierta esta observación. Contrariamente para Mc no aparecieron en el perfil polipeptídico nuevos componentes con alto PM sino que por el contrario se perdieron 13 de los 24 componentes identificados en Mc nativa. Probablemente las componentes obtenidos sin la ruptura de los puentes disulfuro sean demasiado grandes para ser separados en un gel de separación con 12% de acrilamida.

El perfil de proteínas de CS calentado a diferentes temperaturas fue prácticamente el mismo, indicando que no existe ningún componente que sea muy sensible al calor. Sin embargo, como ya fue descrito para otros microorganismos (Behr M.G. et al., 1980; Urakami H. et al., 1986) se produjeron importantes cambios en el perfil antigénico como consecuencia del tratamiento (Tabla 2.2) debidos a los cambios conformacionales de las proteínas que modifican así el perfil de epitopos expuestos. Aunque los efectos parecen heterogéneos para los distintos sueros, esta observación apoya la sugerencia de que el tratamiento que requiere el antígeno en la técnica de SDS-PAGE e inmunoblotting no es inmunológicamente inocuo. La mayor reactividad observada con CS calentada junto con la menor reactividad de CS tratada con 2ME sugieren que los estudios de inmunoblotting, normalmente realizados con antígenos tratados con 2ME y calentados a 100°C, originan una lectura muy particular de la reactividad inmunológica.

El análisis químico e inmunológico de los componentes proteicos de CS y Mc mostró la complejidad de sus perfiles, incluyendo la identificación de numerosos polipéptidos antigénicos y cuya estructura, a través de estos estudios, ha sido parcialmente caracterizada.

Figura 3.1. Variación en la unión de anticuerpos al CS del T. cruzi por efecto de distintos tratamientos químicos. Efecto de la oxidación con ácido periódico 0.1 M (superior izquierdo), calentamiento (100 °C x 5 min) (superior derecho), 2 mercaptoetanol 10% (inferior izquierdo) y tripsina (inferior derecho). Los datos provenientes de 8 sueros diferentes se presentan como el valor medio (\pm SD) de 4 experimentos distintos, expresados como el % de unión media remanente después del tratamiento comparado con el antígeno CS no tratado.

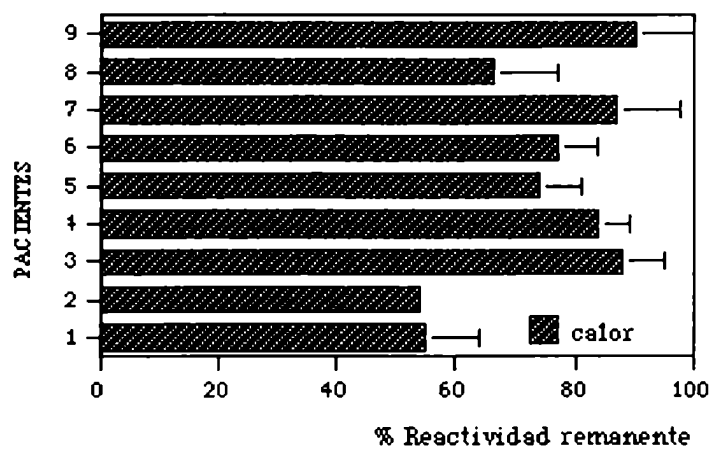
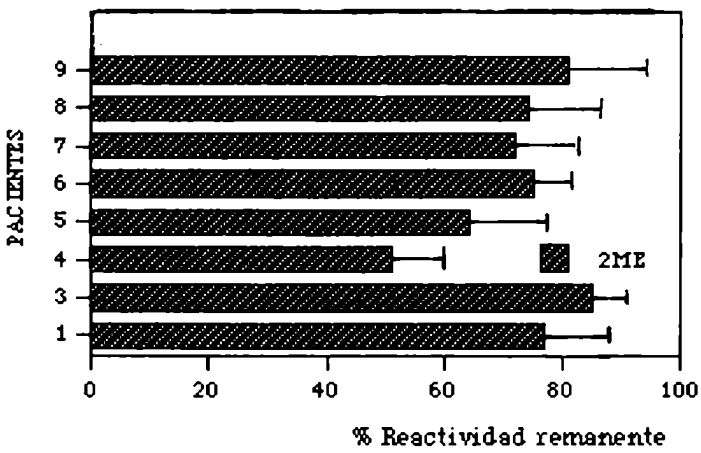
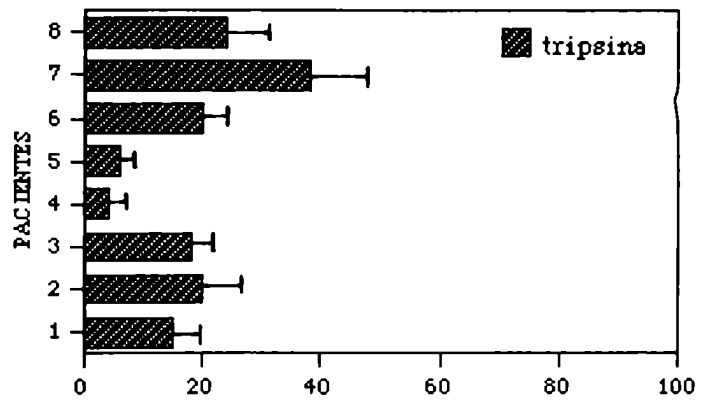
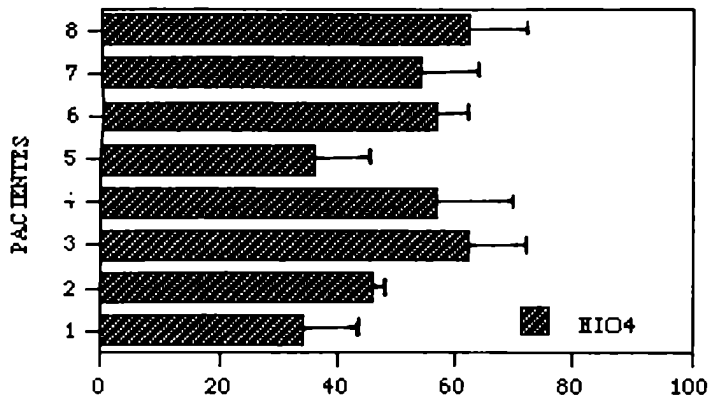


Figura 3.2. Unión de los anticuerpos al CS del T. cruzi después del tratamiento con tripsina (100 ug/ml) por los tiempos indicados. Los datos de 4 sueros distintos se presentan como el % medio de unión remanente después del tratamiento comparado con la unión a CS no tratada.

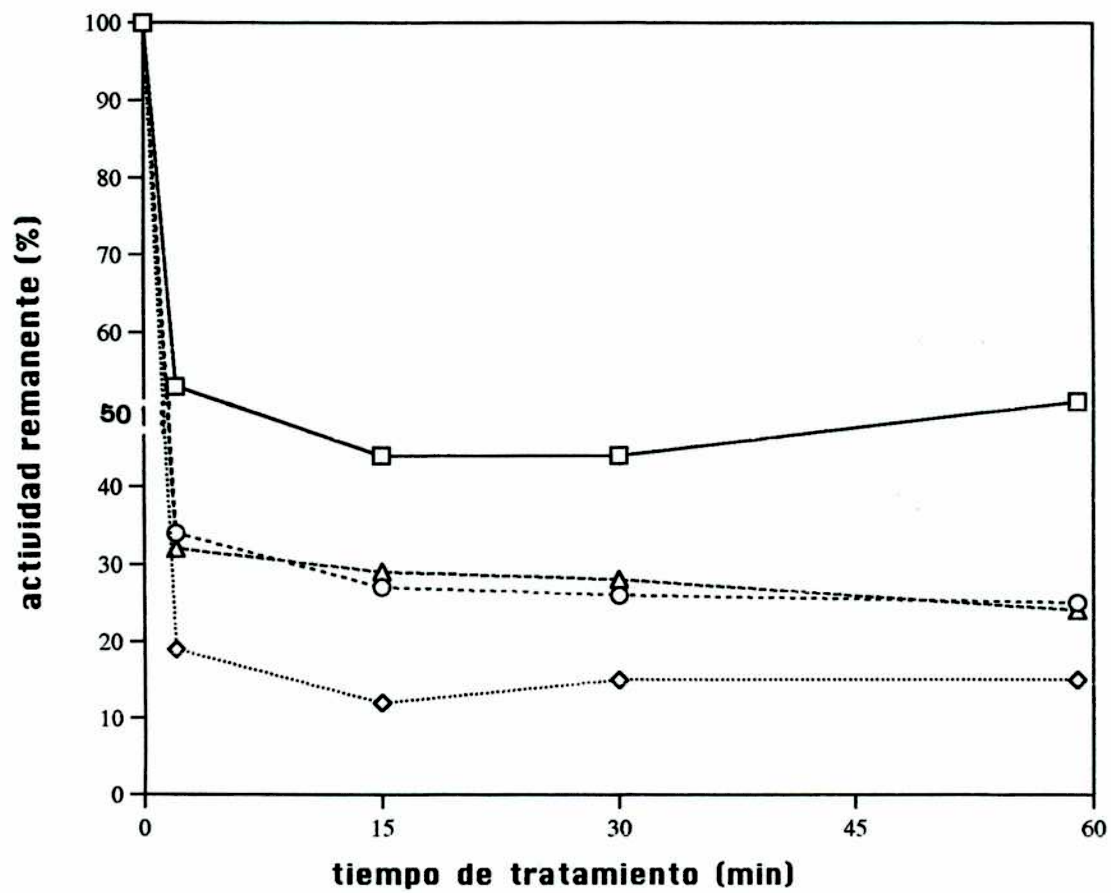


Figura 3.3. Perfil polipeptídico de CS solubilizado en buffer de disociación sin 2 mercaptoetanol 10% (línea 1) y con 2 ME (línea 3). Los marcadores de PM se presentan en la línea 2.

kDa

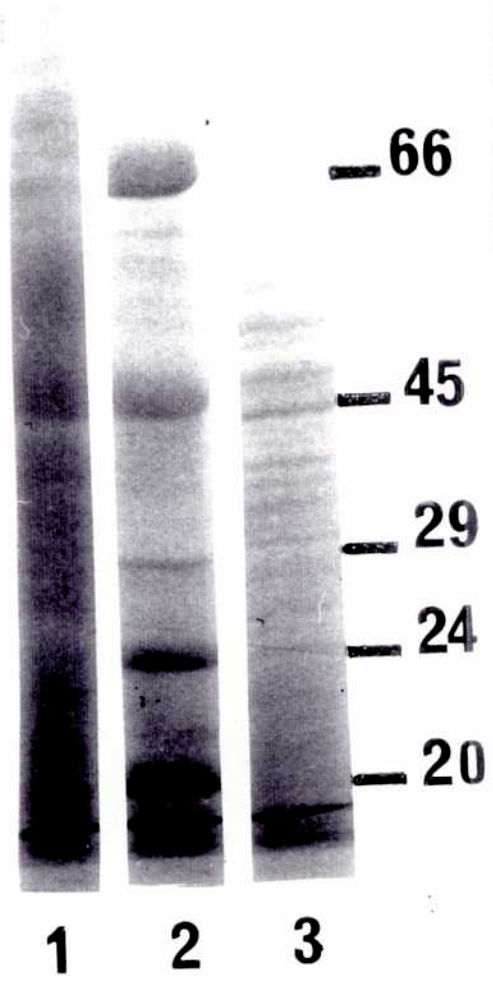


Figura 3.4. Análisis del CS de T. cruzi después de la solubilización del mismo a distintas temperaturas y posterior separación por SDS-PAGE y tinción con Negro de Amido: 100 °C (línea 1); 80 °C (línea 2); 50 °C (línea 3); 37 °C (línea 4) y 4 °C (línea 5).

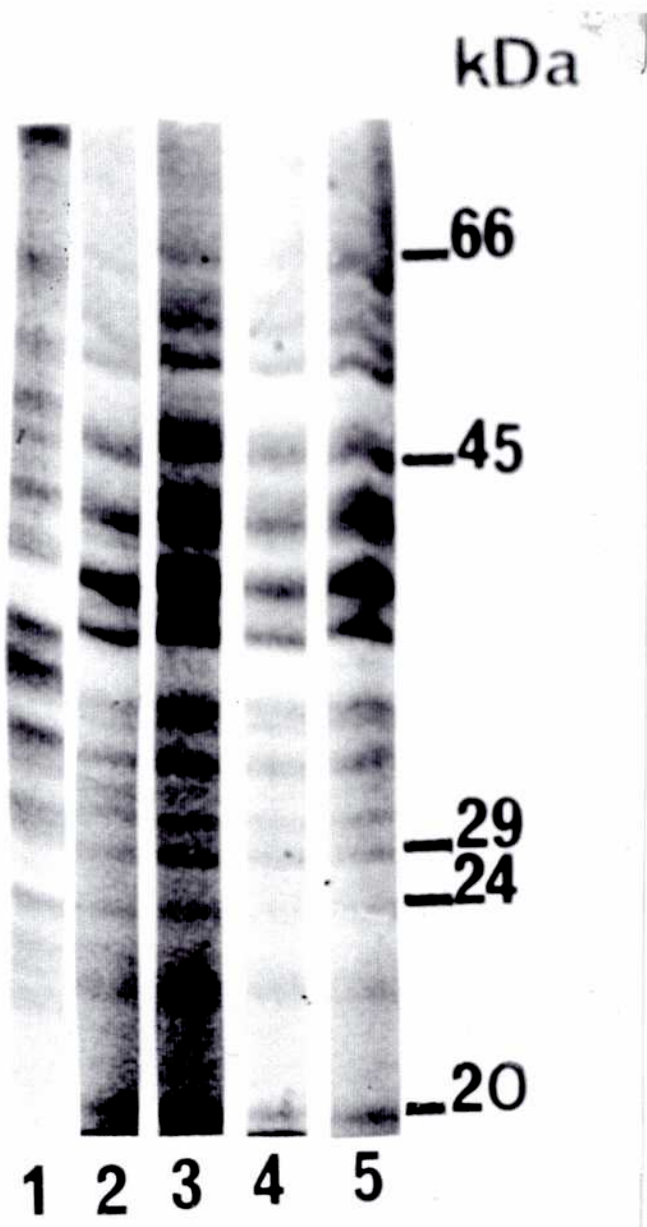


Tabla 3.1

Cambios en la unión de anticuerpos después del tratamiento de Mc con distintos agentes químicos

Sueros de PChCr	Tratamiento	DO media (rango)	% R.R del no tratado media \pm DS (rango)	% R.R del trat. control media \pm DS(rango)
7	Ninguno	0.24 (0.21-0.37)		
	Tratamiento control	0.11 (0.08-0.16)	44 \pm 5 (39-55)	
	Periodato	0.04 (0.02-0.07)	18 \pm 7 (9-32)	43 \pm 11 (24-58)
4	Ninguno	0.23 (0.21-0.37)		
	Tratamiento control	0.07 (0.05-0.09)	28 \pm 6 (24-42)	
	Tripsina	0.03 (0.02-0.06)	13 \pm 7 (7-28)	45 \pm 19 (27-76)
7	Ninguno	0.22 (0.19-0.27)		
	Calor 100°C	0.06 (0.03-0.09)	28 \pm 10 (15-44)	
7	Ninguno	0.22 (0.19-0.27)		
	2 ME	0.07 (0.04-0.10)	31 \pm 9 (18-45)	

Los sueros fueron ensayados a la dilución de título.

Los datos se expresan como reactividad remanente después del tratamiento (% R.R)

Tabla 3.2.

Sensibilidad de los componentes polipeptídicos de Mc del T.cruzi a distintos tratamientos químicos.									
PM aparente (kDa)	Mc nativa		W.B.	Mc solubilizada sin 2 ME			Mc tratada con ácido periódico		
	PROTEINA	AZUCAR		PROTEINA	W.B.(1)	AZUCAR	W.B.(2)		
96/98	SI		SI						
86/92	SI	SI			NO				
78	SI	SI	SI		NO			conservada*	
74	SI		SI						
64/66	SI	SI	SI		NO	aumentada		perdida*	
61	SI		SI						
58	SI	SI	SI		NO	aumentada		perdida*	
54	SI		SI			aumentada			
47/48	SI		SI	48/51		perdida			
43	SI	SI	SI	42/43		perdida	NO		
40	SI	SI	SI			perdida	NO	conservada*	
36/37	SI		SI			conservada		conservada	
33/34	SI		SI	33		aumentada		conservada	
31	SI		SI					conservada	
30	SI		SI	30		conservada			
28	SI	SI	SI	28			NO	conservada*	
26/27	SI		SI	27		aumentada		conservada	
24	SI		SI	24		conservada		conservada	
23	SI		SI	23		perdida			
22	SI	SI	SI	21/22		preservada	NO	conservada*	
20	SI		SI	20		preservada			
19	SI	SI	SI				NO	conservada*	
17/18	SI		SI	17/18		preservada		conservada	
14	SI							conservada	

* glicoproteínas

1 y 2: se estudiaron los componentes sobre los que aparece información, los espacios en blanco indican que esos polipéptidos no eran reconocidos en Mc nativa por los sueros empleados en este trabajo.

CAPITULO IV

PRODUCCION, SELECCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES ANTI-FRACCION Mc DE T. CRUZI

INTRODUCCION

La fracción microsomal del *T. cruzi* es considerada una fracción pluripotencial ya que es capaz de producir una respuesta inmune humoral y mediada por células (de Titto E.H et al., 1985 y 1987). Pero su contribución precisa al complejo mosaico antigénico no podrá determinarse completamente hasta que sus componentes no sean purificados.

Varios años atrás numerosos componentes antigénicos fueron identificados por técnicas de Inmunodifusión radial tanto en Mc como en CS (Segura E.L. et al., 1975). Los estudios de SDS-PAGE e inmunoblotting realizados hasta el momento revelaron los perfiles polipeptídicos y antigénicos de ambas fracciones Mc y CS, identificando así varios polipéptidos comunes a ambas fracciones.

Debido a la dificultad de purificar a homogeneidad a partir de una fracción subcelular particulada como Mc por métodos basados en tamaño y carga, decidimos producir anticuerpos monoclonales (AcMo) contra la fracción Mc como un método alternativo para seleccionar antígenos de interés.

MATERIALES Y METODOS

4.1. Antígenos.

Las fracciones Mc y CS de epimastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* se obtuvieron como se describió anteriormente (Segura E.L. et al., 1974). Brevemente, los parásitos fueron cosechados luego de seis días de cultivo, lavados y rotos por compresión-descompresión (Fraccionador Sorvall-Ribi) y, las distintas subfracciones se separaron por centrifugación diferencial. Se recuperó el sobrenadante de 105000 x g (CS) mientras que el pellet (Mc) se resuspendió en una solución de KCl 5mM, sacarosa 0.25M. Para realizar los ensayos de ELISA y SDS-PAGE, Mc fue homogeneizada por ultrasonido (de Titto E.H. et al., 1985), resuspendida en PBS-T y centrifugada a 5400 x g durante 5 minutos en una microcentrífuga Beckman (de Titto E.H. & Dasso M., 1992). Las preparaciones de Mc y CS fueron inmediatamente utilizadas o alicuotadas y almacenadas a -20°C hasta su uso. El contenido de proteínas se estimó (ensayo para proteínas de Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, Glattbrugg, Zurich, Switzerland) usando seroalbúmina bovina como standard.

4.2. Anticuerpos Monoclonales.

4.2.1. Fusión (FCHF11).

Diez ratones hembras Balb/c de 8 semanas fueron inmunizadas intraperitonealmente (i.p.) con la fracción Mc (450 µg de proteína) en un volumen de 0.2 ml de PBS (pH 7.2). A los 7, 14, 21 y 28 días los ratones recibieron sendas dosis de refuerzo del antígeno Mc (450 µg de proteínas i.p.). Se investigó la presencia de anticuerpos anti-Mc por ELISA y Western blotting (WB ver 4.2.6.). Para la fusión se seleccionó el suero del ratón que presentaba el título de Acs. más alto por ELISA y mostraba el perfil de reactividad más amplio por WB contra Mc. La fusión se llevó a cabo en el día 30 utilizando la línea celular de mieloma SP2 (Segura E.L. et al., 1986). A partir del día 10 post-fusión se comenzó a recolectar los sobrenadantes de

cultivo de hibridomas que fueron sometidos al proceso de selección que se describe a continuación.

4.2.2. Selección.

La actividad anti-Mc de los sobrenadantes de cultivo de hibridomas se testeó por ELISA (ver 4.2.4.). Aquellos sobrenadantes que reaccionaron positivamente por ELISA se ensayaron por WB (ver 4.2.6.) para identificar la especificidad antigénica. Los sobrenadantes que reaccionaron positivamente por ELISA pero que no mostraron bandas por WB se testearon por dot-blotting (DB) (ver 4.2.7.). Los 41 hibridomas que cumplieron el criterio de selección (ELISA - WB o ELISA - DB positivos) se conservaron congelados hasta su clonado.

4.2.3. Clonado celular.

Las líneas celulares de los hibridomas seleccionados se recuperaron del tanque conteniendo nitrógeno líquido y fueron sometidos al procedimiento de clonado por dilución limitante (Harlow Ed. & Lane D., Antibodies, 1988). Para ello se hicieron diluciones seriadas al medio de las células derivadas de cada uno de los hibridomas en placas de 96 pocillos. A los 7 días aproximadamente se comenzaron a recolectar los sobrenadantes de los pocillos que contenían células en crecimiento y se testeó la actividad anti-Mc por ensayos de DB. Los sobrenadantes reactivos se ensayaron por WB en paralelo con el sobrenadante del hibridoma parental para identificar la especificidad de cada clono.

4.2.4. ELISA.

La presencia de anticuerpos anti-Mc se determinó por el método de ELISA indirecto descrito previamente en 2.3. Brevemente, el antígeno diluido a 5 µg/ml en buffer bicarbonato (0.1M, pH 9.5) fue fijado a microplacas de fondo plano (Costar, Cambridge, MA, EEUU) durante toda la noche a 4°C. Se bloquearon los sitios inespecíficos incubando con leche descremada (M, Molico, Nestlé, Buenos Aires) diluida en PBS. Para determinar la presencia de anticuerpos anti-Mc en los sueros de los ratones inmunizados, muestras de sueros por duplicado se diluyeron en PBS-T-M, un suero de cabra anti-Ig G de ratón (Sigma Chemical Corp., Saint Louis, MO, USA) diluido en PBS-T-M, peróxido de hidrógeno, ortofenildiamina (Sigma) y HCl se utilizaron para completar la reacción. Como controles se utilizaron ratones de la misma edad y sexo, sanos y crónicamente infectados.

Para detectar la actividad anti-Mc de los sobrenadantes de cultivo de hibridomas, los sitios no específicos se bloquearon con 2% suero normal de caballo en PBS, durante 10 minutos a temperatura ambiente y lavados seguidamente con PBS. Para completar la reacción se utilizaron muestras de sobrenadantes por duplicado, suero de caballo anti-Ig G de ratón marcado con biotina diluido en PBS suplementado con 1% de suero normal de caballo, reactivo ABC de Vectastain diluido en PBS- 0.1% T, OPD y HCl 1N de acuerdo a las indicaciones de los productores (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA., EEUU).

Como controles se utilizaron sueros de ratones inmunizados con Mc y sobrenadantes de las células de mieloma utilizadas en la fusión. Para la lectura se utilizó un lector de ELISA automático (MR 700, Dynatech Lab., Alexandria, VA., EEUU).

4.2.5. SDS-PAGE.

Se usó el sistema de buffer discontinuo con geles de separación y empaquetamiento con 12% y 5% de acrilamida respectivamente. Los geles presentaban una calle pequeña de 5 mm de ancho y una más grande de 60 mm. La calle pequeña se utilizó para sembrar los marcadores de peso molecular (PM), (Bio-Rad lab.) y la más grande para la muestra, que consistía de 200 μ l de preparación antigénica conteniendo 1000 μ g de proteína por gel. La muestra fue solubilizada y corrida como se describió anteriormente (2.4).

4.2.6. Western blotting (WB).

Los componentes de las fracciones Mc y CS de T. cruzi fueron separadas por SDS-PAGE y transferidos a nitrocelulosa como se describió previamente (2.5).

Después de la transferencia una pequeña porción de la nitrocelulosa conteniendo los marcadores de PM fue cortada y teñida con Negro de Amido para evidenciar proteínas. Para la detección de antígeno la membrana de nitrocelulosa se cortó en porciones de 5 mm de ancho y se realizó el bloqueo por 30 minutos con PBS-5 %M. Después de ser lavadas con PBS, se incubaron con las muestras de sobrenadantes de cultivo de hibridomas (70 μ l/tira). Luego fueron lavadas e incubadas con un conjugado de cabra anti-Ig G de ratón marcado con peroxidasa en una dilución óptima en PBS, en algunos casos se utilizó un conjugado marcado con avidina-biotina para aumentar la sensibilidad de detección. Se reveló con una solución conteniendo 0.5 mg/ml de DAB (Sigma, grado II) y 0.06% de peróxido de hidrógeno en PBS. La reacción se detuvo después de 20 minutos y las tiras se lavaron exhaustivamente con agua destilada. Se leyeron por comparación con la tira conteniendo los pesos moleculares y seguidamente fueron fotografiadas. Para testear la reactividad de los sobrenadantes de hibridomas provenientes del clonado celular, las reacciones antígeno-anticuerpo se llevaron a cabo utilizando un conjugado anti-Ig G de ratón como se describió anteriormente. En todos los casos los sobrenadantes se ensayaron con nitrocelulosas provenientes de dos geles diferentes. En cada corrida los pesos moleculares aparentes de los polipéptidos desconocidos se estimaron por análisis de regresión lineal como se describió en el Capítulo II y el perfil fue monitoreado con un densitómetro (Hoefer GS 300, San Francisco, CA, EEUU).

4.2.7. Dot- blotting (DB)

La selección de los sobrenadantes de cultivo de hibridomas por el ensayo de DB se realizó utilizando un aparato de microfiltración (Bio-Rad Lab.) siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Bio Rad Bulletin 1141, 1984).

Brevemente, Mc y CS (50 y 12.5 μ g/ml fueron sembradas en las membranas de nitrocelulosa y se dejó filtrar por gravitación. Luego, las nitrocelulosas fueron secadas a temperatura ambiente, bloqueadas con M 5 % en PBS y los complejos inmunes antígeno-AcMo se detectaron usando como segundo anticuerpo un conjugado de cabra anti-Ig G de ratón marcado con peroxidasa (Sigma). Como se describió para el ensayo de ELISA, se utilizaron como controles sueros provenientes de ratones inmunizados, sobrenadantes de cultivo de la línea celular de mieloma usada para la fusión y/o sobrenadantes negativos por ELISA.

Para obtener una mejor comparación entre los resultados de DB y WB, los ensayos de DB se realizaron en algunos casos utilizando preparaciones antigénicas sujetas a los mismos tratamientos desnaturalizantes requeridos para los ensayos de SDS-PAGE en paralelo con muestras tratadas en las condiciones usualmente establecidas para el ensayo de DB.

4.2.8. Naturaleza glucídica de los epitopos reconocidos por los AcMo.

Ya habíamos documentado anteriormente la importancia de los azúcares en la antigenicidad de Mc. Más aún, gran parte de las proteínas reconocidas por los sueros humanos en Mc y por los AcMo en Mc contienen residuos hidrocarbonados. Para evaluar la naturaleza glucídica de los epitopos reconocidos por los AcMo en Mc se ensayó su reconocimiento por los AcMo tras someter a Mc a oxidación por tratamiento con ácido periódico.

a. Tratamiento de Mc con ácido periódico.

Mc fue llevada a una concentración de 0.8 mg/ml con una solución de $\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M en PBS 10 mM, incubada 2 hs a 28°C con agitación y dializada contra PBS durante toda la noche a 4°C (Schulz T.F. et al., 1987).

b. ELISA.

La reactividad de los AcMo hacia Mc tratada o no con ácido periódico se determinó por el método de ELISA (2.3.). Para ello Mc y Mc tratada fueron llevadas a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en buffer bicarbonato y absorbidas a una placa de fondo plano durante toda la noche a 4°C. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó incubando con leche Molico al 10% en PBS durante una hora. Luego se agregaron 50 μl de cada sobrenadante de hibridoma y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Para revelar la reacción se empleó un anticuerpo anti-Ig total de ratón conjugado con peroxidasa, una solución de OPD y peróxido de hidrógeno. Para cada AcMo se determinó el % de reactividad remanente hacia Mc luego del tratamiento de oxidación de los azúcares, considerando 100% de reactividad la DO resultante de enfrentar a cada AcMo contra Mc.

RESULTADOS

4.1. Producción y selección de hibridomas secretores de anticuerpos IgG anti-Mc

Los ratones inmunizados con Mc y productores de anticuerpos anti-Mc fueron estudiados por el método de ELISA. Después de la tercer dosis de inmunógeno el ratón que presentaba el mayor título (1:4000), fue seleccionado para la fusión.

La fusión de las células de bazo de un ratón inmunizado con Mc con células de mieloma SP2 produjo colonias de hibridomas que fueron distribuidas en 5 microplacas. El ensayo por ELISA de los medios de cultivo sobrenadantes de los pocillos individuales indicó que el 14% de los mismos contenían anticuerpos reactivos hacia Mc. Se seleccionaron un total de 67 pocillos que produjeron las reacciones más fuertes por ELISA (absorbancias superiores al doble de la lectura desarrollada por sobrenadantes provenientes de células no fusionadas, detectadas por lo menos a dos tiempos distintos durante el cultivo del hibridoma) para realizar estudios posteriores.

De los 67 hibridomas productores de anticuerpos, se investigaron 57 por WB. Los 10 hibridomas restantes se perdieron. Treinta y siete de los 57 sobrenadantes mostraron reactividad hacia uno (10 sobrenadantes) o más polipéptidos sobre Mc desnaturalizada, en todo el rango de PM. Cinco de los 20 sobrenadantes que reaccionaron positivamente por ELISA pero no lo hicieron por WB, reaccionaron positivamente por DB, sumando un total de 42 hibridomas positivos (Figuras 4.1, 4.2 y 4.3).

4.2. Clonado de AcMo anti-fracción Mc de T. cruzi

Cuatro de los 42 hibridomas reactivos con Mc fueron seleccionados para el clonado llevando a un total de 45 clones reactivos con Mc por DB. Los sobrenadantes reactivos se ensayaron por WB en paralelo con el sobrenadante del hibridoma parental para identificar la especificidad de cada uno. A fin de optimizar las condiciones de trabajo de acuerdo al tamaño de los polipéptidos reconocidos por el sobrenadante parental se realizó WB a partir de geles de policrilamida con distinto tamaño de poro: además de los geles 12% empleados originalmente se utilizaron geles 15% para analizar los sobrenadantes reactivos con polipéptidos de bajo peso molecular.

Se aislaron así un total de 23 clones: 3 a partir del hibridoma 1A10, 12 a partir del 1D10, 2 a partir del 3C4 y 8 a partir del 2E9, la mayoría de los cuales presentó reactividad con varios polipéptidos (3 a 9) en el mismo gel (Tabla 4.1).

Hibridoma 3C4: Los dos clones derivados del 3C4 presentan mayor especificidad de reacción que el original, cada uno de ellos con 2 bandas netas con 51 y 56 kDa de PM para el 3C4C2 y 47 y 51 kDa para el 3C4D7 (Tabla 4.1).

Hibridoma 1A10: Nuevamente los clones presentan menor número de bandas que el original, reconociendo el 1A10C8: 4 bandas; el 1A10C10: 8 bandas y el 1A10C11: 6 bandas (Tabla 4.1).

Hibridoma 1D10: Por ensayos de WB, utilizando geles de separación con 12% de acrilamida y revelado con DAB, se vió que el sobrenadante original reaccionaba contra diversos componentes de Mc, incluyendo el frente de corrida. El uso de conjugado biotinilado (mayor sensibilidad) reveló 3 bandas originales de hasta 65 kDa de PM aparente. El empleo de geles de separación con 15% de

acrilamida reveló nuevas bandas de bajo PM mientras que la banda del frente se extendió en un rango de PM entre 8 y 11 kDa incluyendo una banda netamente definida de 10 kDa. Esta banda se encontró en los blots de los 11 clones estudiados, acompañada en 10 de ellos por reactividad hacia por lo menos otros 2 polipéptidos de entre 13 y 56 kDa (Tabla 4.1).

Hibridoma 2E9: Utilizando geles de separación con 12% de acrilamida y revelado con DAB, el sobrenadante original reaccionó con seis polipéptidos en el rango 50-16 kDa. El uso de conjugado biotinilado reveló 3 bandas adicionales de PM aparente de 70, 67 y 57-52 kDa. La especificidad antigénica de 7 de los 24 clones reactivos ha sido definida: los clones E12 y F11 reconocen respectivamente 5 y 3 bandas y los restantes 5 clones reconocen una banda de 80/89 kDa de PM aparente (Tabla 4.1).

4.3. Efecto de la desnaturalización sobre la capacidad de unión del anticuerpo al antígeno.

Debido a la baja respuesta encontrada por WB, si se compara con los resultados obtenidos por ELISA yDB, se decidió investigar si este fenómeno se debía a los cambios sufridos por el antígeno por el tratamiento de desnaturalización requerido para llevar a cabo el ensayo. Para ello Mc tratada de la misma forma que para la técnica de SDS-PAGE se empleó en ensayos de DB en paralelo con Mc nativa. Los resultados demostraron que ambas preparaciones antigénicas eran capaces de distinguir sobrenadantes reactivos y no reactivos (resultados no presentados).

4.4. Selección de antígenos citosólicos reconocidos por AcMo anti-Mc.

Se estudió por la técnica de DB la reactividad anti-CS de cincuenta sobrenadantes provenientes de la fusión FChF11, incluyendo 36 sobrenadantes de hibridomas secretores de anticuerpos anti-Mc. Reaccionaron contra CS un total de 17 sobrenadantes, 14 reactivos y 3 no reactivos contra Mc. Cuando dichos sobrenadantes se ensayaron por WB sobre geles de separación con 12 % de acrilamida y revelado con un conjugado anti-Ig total de ratón resultó que la mayoría de los sobrenadantes reaccionaron claramente con un total de 21 polipéptidos en un amplio rango de PM, que comprendía desde el frente (≤ 14 kDa) hasta el tope (≥ 100 kDa) de la corrida. Todos los sobrenadantes excepto uno reactivo contra el frente de corrida, presentaban varias bandas de reactividad (hasta 10) (Figura 4.4)

4.5. Epitopes glicoproteicos

De los 30 sobrenadantes ensayados: 13 retienen menos del 50% de la reactividad luego de la oxidación -rango 20-47 %-, 3 retienen entre un 50 y 70% -rango 52-67 %- y 14 retienen más del 70 % -rango -72-100 %-. Los datos se presentan en las figuras 4.5 y 4.6.

CONCLUSIONES

La inmunización de ratones con la fracción microsomal de epimastigotes de T. cruzi permitió producir con alta eficiencia AcMo capaces de reconocer estructuras contenidas no sólo en la fracción Mc sino también en la fracción soluble de T. cruzi en un amplio rango de PM, la cual presenta una gran utilidad potencial para la purificación de antígenos relevantes ya que en general es más fácil purificar a partir de fracciones solubles que a partir de fracciones particuladas.

Se seleccionaron para su clonado algunos hibridomas entre los que contenían al menos uno de los polipéptidos de peso molecular superior a 50 kDa, identificados previamente en Mc por ser reconocidos con mayor frecuencia por los PChCr con compromiso cardíaco severo. El rendimiento de los procesos de clonado fue diverso: de 2 a 23 clones productores de AcMo reactivos con Mc según el hibridoma de partida. Sin embargo, la eficacia del clonado fue buena; en 3 de los 4 casos fue posible identificar y aislar clones productores de anticuerpos reactivos con polipéptidos del tamaño buscado, y en todos estos casos en un conjunto con reactividad más restringida que la del hibridoma original.

Por otro lado, gran parte de los epitopos reconocidos por los AcMo son al menos parcialmente de naturaleza glucídica, ya que en ningún caso se perdió totalmente la reactividad por oxidación del antígeno con ácido periódico. Cabe destacar que como han descrito otros autores (Reiss E. et al., 1986), en algunos casos en los WB se observaron amplias zonas de reactividad que en general se asocia con la reactividad hacia epitopos glucídicos.

La purificación de antígenos aislados con dichos AcMo nos permitirá determinar si un grupo reducido de antígenos es capaz de reproducir el daño tisular producido por la fracción Mc entera y estudiar los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la Enfermedad de Chagas Crónica.

En síntesis la producción de AcMo anti-Mc ha sido muy eficiente y su caracterización ha mostrado la diversidad de los mismos, disponiendo así de herramientas muy útiles para la posterior purificación de antígenos y el estudio de la actividad biológica de dichos AcMo y de los epitopos reconocidos por dichos AcMo y/o antígenos purificados a partir de ellos.

Figura 4.1. Fusión y selección de AcMo anti fracción Mc de T. cruzi.

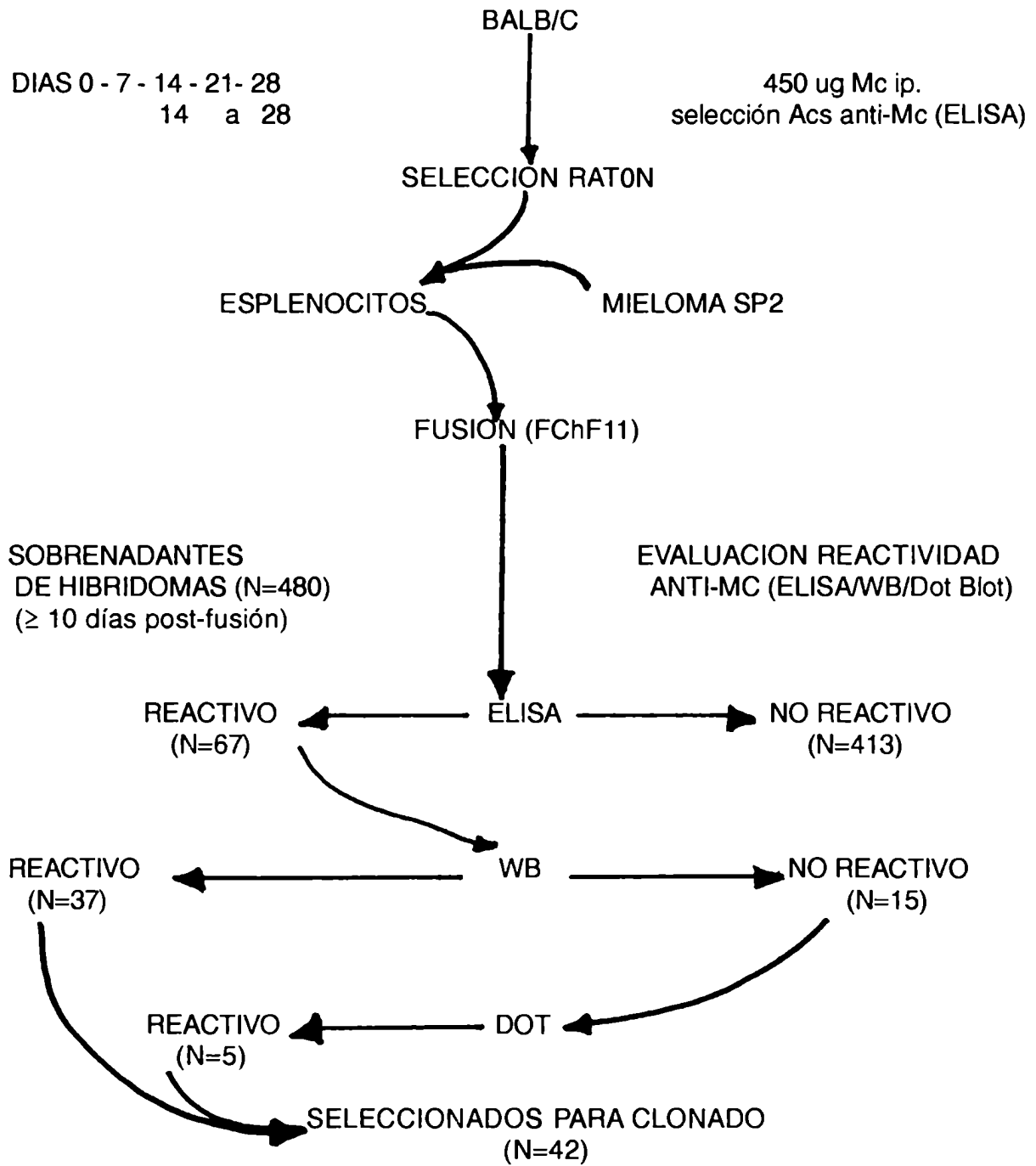


Figura 4.2. Polipéptidos de la fracción Mc de T. cruzi reconocidos por los AcMo anti-Mc después de SDS-PAGE y transferencia a nitrocelulosa: 4G1 (1), 2E9 (2), 1D10 (3), 5F2 (4), 5A9 (5), 1A10C11 (6). Los números a la derecha indican marcadores de PM conocidos.

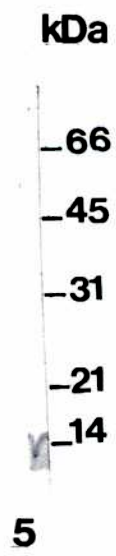
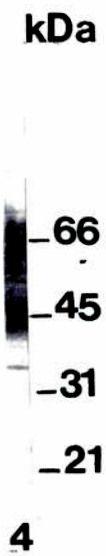
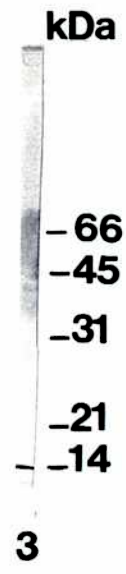
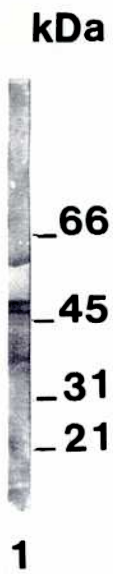


Figura 4.3. Dot-blotting de los AcMo anti-Mc contra la fracción Mc de T. cruzi.
c(+): control positivo, c(-): control negativo.

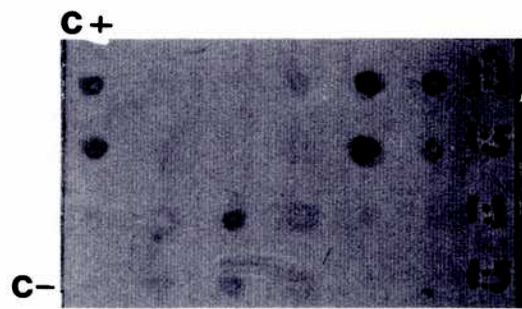


Figura 4.4. Polipéptidos de la fracción CS de T. cruzi reconocidos por los AcMo anti-Mc después de SDS-PAGE y transferencia a nitrocelulosa: 1A10, 1E7, 2E1, 2F3, 2G1, 3E9, 4A9, 5E12, 5A9, 5D6, 5E2, 5E5, 2F8, (Líneas 1 a13). Los números a la derecha indican marcadores de PM conocidos.

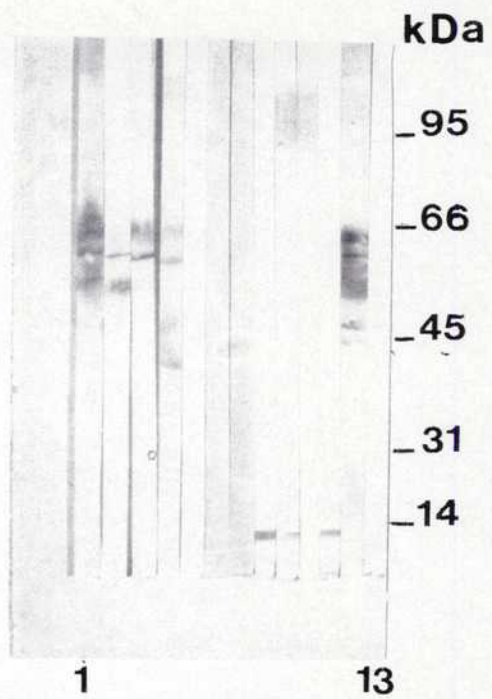


Figura 4.5. Reactividad de los AcMo anti-Mc hacia epitopes glucídicos.

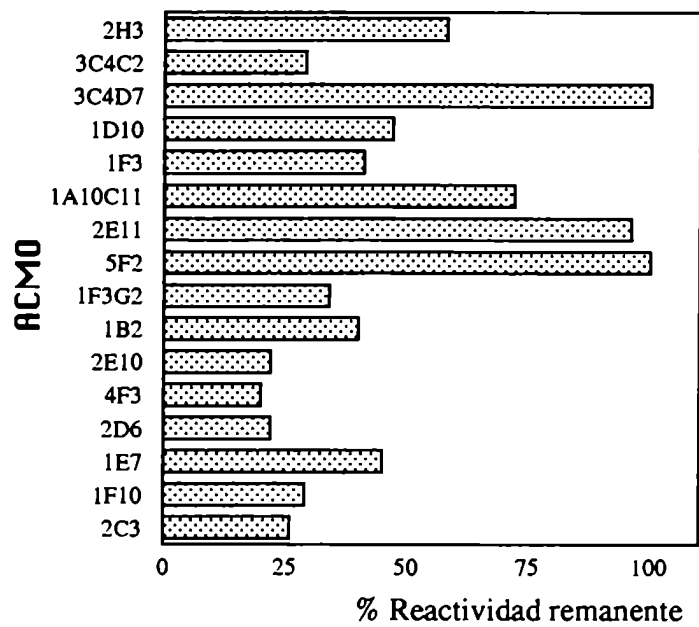


Figura 4.6. Reactividad de los AcMo anti-Mc hacia epitopes glucídicos.

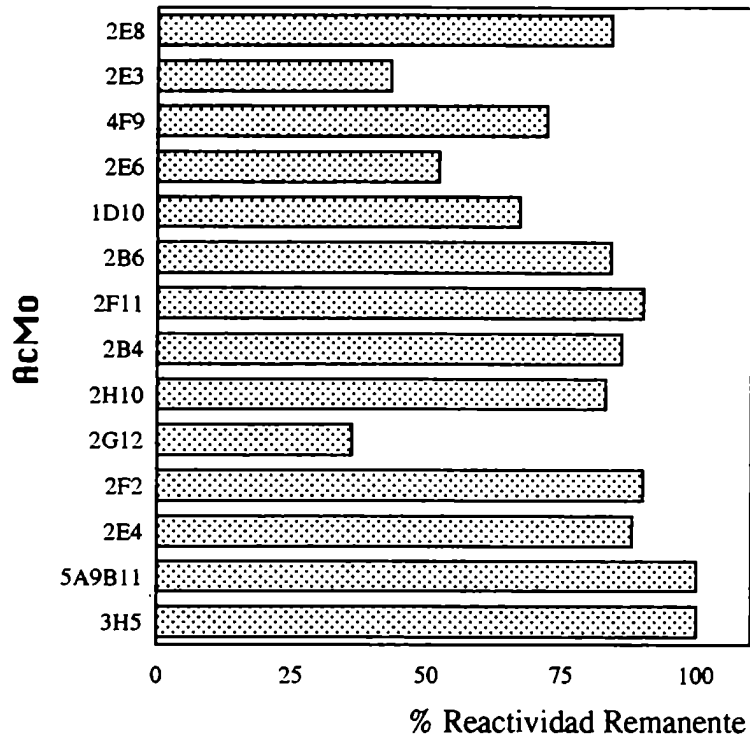


Tabla 4.1

Polipéptidos de la fracción microsomal de Trypanosoma cruzi
reconocidos por Anticuerpos Monoclonales

Sobrenadante de hibridoma	Dot-blot	Western blot*	
		gel 5-12%	gel 5-15%
1A10	+	84/66/62/52/47/44/32/28/17/14	No ensayado
1A10C8	+	66/47/44/14	No ensayado
1A10C10	+	84/66/62/52/47/44/32/28	No ensayado
1A10C11	+	62/48/47/45/44/42	No ensayado
3C4	+	84/66/56/52/47/43/28-21	R No ensayado
3C4C2	+	75-37 R/56/51	No ensayado
3C4D7	+	84-37 R/51/47	No ensayado
1D10	+	65-50 /47/43/41-40/14	70-56 R/32/30/17/16/11-8
1D10A4	+	14	32/30/16/11-8
1D10A6	+	14	32/27/11-8
1D10B1	+	14	30/16/13/11-8
1D10B2	+	14	32/30/16/13/11-8
1D10B4	+	14	30/13/11-8
1D10B5 y B7	+	14	30/16/11-8
1D10B11	+	14	56/32/30/20/14/13/11-8
1D10C1	+	14	No ensayado
1D10C2	+	14	11-8
1D10D1	+	14	32/30/20/16/14/13/11-8
1D10C8	+	Negativo	43/39/32/30/20/16/14/13/11-8
1D10D7	+	Negativo	No ensayado
1D10C3 y C10	+	No ensayado	No ensayado
2E9	+	70/67/57-52/50/47/34/29/26/16	No ensayado
2E9E12	+	77-72/59-57/55-52/50	No ensayado
2E9F11	+	86/80/68	No ensayado
2E9F12	+	80	No ensayado
2E9G3, G4, G5 y G7+		89	No ensayado
2E9E2, E4, E11, F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F9, F10, G2, G6 y H8	+	Negativo	No ensayado
2E9E5, H3 y H4	+	No ensayado	No ensayado

* Los resultados presentan el peso molecular aparente de los polipéptidos reconocidos por los distintos AcMo. R=Zona de reactividad

CAPITULO V.

MIMETISMO MOLECULAR EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS .

INTRODUCCION.

Como ya vimos con mayor detalle en la introducción, diversa evidencia concurre a sostener la hipótesis de que el daño tisular característico de la Enfermedad de Chagas crónica es el resultado de la actividad de fenómenos inmunológicos.

La hipótesis más consistente para explicar estos mecanismos se apoya en la existencia de fenómenos de mimetismo molecular, es decir a la presencia de determinantes antigénicos comunes al parásito y a tejidos del huésped mamífero, que harían que la respuesta inmune montada contra los antígenos del parásito resultara en la agresión del propio huésped.

Entre la evidencia experimental que apoya esta hipótesis se puede mencionar la descripción de determinantes antigénicos compartidos por varias cepas de T. cruzi y preparaciones del retículo sarcoplásmico de músculo estriado, cuya inoculación en ratones indujo lesiones cardíacas similares a las encontradas en la infección crónica con el parásito (Sadigursky M. et al., 1982; Acosta A.M. et al., 1983). Más recientemente, se ha demostrado la existencia de epitopos proteicos y glicolipídicos compartidos por el parásito y el tejido nervioso de mamíferos (rata, ratón, humano), algunos de los cuales son específicamente reconocidos por anticuerpos presentes en el suero de pacientes chagásicos crónicos y de ratones infectados con el parásito (Wood J.N. et al., 1982; Van Voorhis W.C. & Eisen H., 1989; Petry K. & Van Voorhis W.C., 1991; Cabeza Meckert P. et al., 1991). Por otra parte se ha demostrado que ribosomas y polirribosomas de T. cruzi inducen inmunidad específica al tiempo que reaccionan con células de mamífero (reactividad cruzada) y, más en particular, se han descrito antígenos ribosomales del parásito cuya región C-terminal presenta alta homología con idéntica región de proteínas ribosomales humanas (Lopetegui R. & Sosa Miatello C., 1977; León L.L. et al., 1980; Lopetegui R. & Sosa Miatello C., 1981; Sosa Miatello C. & Fiochetto E.R., 1989; Levitus G. et al., 1991).

En síntesis, no es escasa la evidencia experimental que apoya la posible existencia de fenómenos de mimetismo molecular en la Enfermedad de Chagas; sin embargo, la evidencia directa es escasa y aún insuficiente para entender los mecanismos participantes.

La unión de estas evidencias con la ya demostrada capacidad de la fracción Mc de T. cruzi para inducir lesiones tisulares, abrió la

posibilidad de investigar la posible existencia de determinantes antigénicos comunes a Mc y a tejidos de mamífero, utilizando como herramienta de reconocimiento los AcMo anti-Mc antes descritos.

Por lo tanto, en el presente capítulo describiremos como dichos AcMo fueron empleados para investigar la presencia de determinantes antigénicos comunes al T. cruzi y a tejido miocárdico (MIO) y músculo esquelético (MES) humano, y los resultados obtenidos.

5.1. EVALUACION DE LA REACTIVIDAD ANTI-TEJIDOS HUMANOS

MATERIALES Y METODOS

1.1. Obtención y preparación de los tejidos.

Las muestras de tejidos humanos fueron obtenidos a partir de dadores cadavéricos no chagásicos, libres de enfermedades autoinmunes, coronarias y tumorales. A fin de disminuir las chances de encontrar reacciones inespecíficas, los estudios fueron realizados en momentos distintos sobre muestras de dos dadores no relacionados. Las preparaciones fueron obtenidas por centrifugación diferencial de acuerdo con el protocolo presentado en la Figura 5.1.

1.2. Ensayos de Dot-blotting.

Se realizó siguiendo el protocolo descrito en 4.2.7. Como control se utilizó un AcMo desarrollado contra el Virus Sincicial Respiratorio (RSV).

1.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción para azúcares.

Para determinar el perfil polipeptídico de MIO y MES se efectuó el análisis electroforético de los mismos y, dado que en los trabajos anteriores hemos demostrado la importancia de los carbohidratos en la antigenicidad de Mc y CS, investigamos también la presencia de residuos azucarados en dichos polipéptidos. Se empleó el sistema de buffer discontinuo descrito anteriormente. Los homogenatos de MIO y MES humano fueron separados utilizando geles desnaturalizantes con 12% de poliacrilamida y transferidos a nitrocelulosa. Una porción de la misma se coloreó con Negro de Amido para evidenciar proteínas y la otra porción se utilizó para la determinación de glicoproteínas con Concanavalina A, que permite identificar residuos azucarados ricos en manosa y glucosa, según se describió en 2.6.

1.4. Western blotting

Para identificar los polipéptidos reconocidos en las muestras de tejidos humanos, los sobrenadantes de hibridoma reactivos por DB con MIO y/o MES fueron ensayados por WB. Para ello los homogenatos de MIO y MES fueron separados por SDS-PAGE utilizando geles de separación con 12% de poliacrilamida, transferidos a nitrocelulosa y estudiados por

immunoblotting con los AcMo anti-Mc y RSV como control, utilizando el sistema avidina-biotina como revelador a fin de maximizar la sensibilidad del ensayo.

.RESULTADOS Y DISCUSION

1.1 Evaluación de la reactividad anti tejido por dot- blot.

Se emplearon ensayos de DB para estudiar la reactividad anti-MIO y anti-MES de 52 sobrenadantes de hibridomas reactivos con Mc y/o CS y 11 sobrenadantes de la misma fusión que no reaccionen con ninguna de las fracciones. Veintisiete de los 52 sobrenadantes ensayados resultaron reactivos con MIO y/o MES (Tabla 5.1), y su identidad se muestra la Tabla 5.2.

Los resultados obtenidos responden a la exigencia de ser coincidentes sobre muestras de tejidos de más de un dador, lo que nos permite pensar que no estamos frente a un resultado accidental sino a un fenómeno real.

1.2. Composición polipeptídica e identificación de azúcares de MIO y MES humano.

Los perfiles polipeptídicos determinados para MIO y MES se muestran en la Tabla 5.3 y en la Figura 5.2, y la comparación con los perfiles de Mc y CS en la Figura 5.3. MIO presentó 25 polipéptidos en el rango 15-79 kDa, 6 de los cuales contenían residuos hidrocarbonados, mientras MES reveló 24 bandas polipeptídicas en el rango 15-88 kDa, 7 de las cuales reaccionaron también para hidratos de carbono. En las condiciones ensayadas, poco menos de la mitad de las bandas detectadas en cada tejido (11 de las 25 y 24) presentaron igual peso molecular aparente, aunque esto no dice aún nada sobre su posible identidad.

1.3. Ensayos de Western-blotting

La demostración de reactividad por WB no siempre correlacionó con los resultados del DB. Muchos sobrenadantes reactivos por DB "perdieron" la reactividad al ser estudiados por WB. En algunos casos, pero no en todos, la reactividad pudo ser "recuperada" concentrando los sobrenadantes (hasta 6 veces, Centricón-10, Amicón Corp., EEUU) antes del ensayo de WB. (por ejemplo 1F3 vs MIO y MES); otros sobrenadantes con reactividad marginal por DB se mostraron claramente reactivos por

WB (por ejemplo 1A10C11 vs MIO).

En la Tabla 5.4 se presentan todos los sobrenadantes que demostraron reactividad para las fracciones Mc y/o CS de T.cruzi y para MIO y/o MES por WB y en la Tabla 5.5 la identidad de los polipéptidos reconocidos por los 12 AcMo en Mc, MIO y MES.

Cuando se analiza la frecuencia de reconocimiento de los distintos polipéptidos se observa que algunos de ellos son más frecuentemente reconocidos. Para MIO el polipéptido de 34 kDa es reconocido por el 63% de los AcMo ensayados, los polipéptidos con 65, 45* y 27 Kda por el 50% y los componentes con 66, 55*, 32 y 29* kDa por el 38%. Para MES una franja de reactividad comprendida entre 30* y 27* kDa es reconocida por el 100% de los AcMo ensayados, el polipéptido de 44 kDa por el 75%, los de 71 y 59* por el 50% y los de 61, 50, 49, 46* y 40 por el 38%. Más aún algunas de las estructuras reconocidas (*), principalmente en MES corresponden a glicoproteínas. En la Figura 5.4 se presentan los WB contra MIO y MES para algunos de los AcMo.

5.2 CLONADO DE LOS AcMo AUTORREACTIVOS.

Los AcMo 5A9 y 1F3 reactivos con MIO y MES por DB y WB, fueron seleccionados para su clonado siguiendo el protocolo descrito en 4.2., obteniéndose 7 clones a partir del 5A9 y 5 a partir del 1F3. La Tabla 5.6 resume las características reactivas de cada uno de los clones y su relación con los AcMo originales. El WB reveló que el perfil de reconocimiento de los clones era idéntico a los sobrenadantes parentales (resultados no presentados).

5.3. LOCALIZACION DE ANTIGENOS TISULARES CON REACTIVIDAD CRUZADA CON T. CRUZI.

Con el propósito de determinar no sólo la presencia sino también la localización subcelular de los antígenos con reactividad cruzada reconocidos por los AcMo anti-Mc se realizaron ensayos inmunohistoquímicos con 7 sobrenadantes previamente concentrados utilizando muestras de tejidos humano y de hamster.

MATERIALES Y METODOS

3.1. Obtención de tejidos de mamífero.

Las muestras de tejidos humano fueron obtenidos a partir de dadores cadavéricos no chagásicos, libres de enfermedades autoinmunes, coronarias y tumorales y las muestras de hamster a partir de hembras adultas no infectadas. Después de fijadas con formol al 10%, las muestras fueron incluidas en parafina y se realizaron cortes histológicos de aproximadamente 5 μ de ancho.

3.2. Reacción por inmunohistoquímica con Avidina - Biotina - Peroxidasa.

Luego de eliminar los restos de parafina con dos pasajes por xilol (30 minutos cada uno) se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución con agua oxigenada al 2% en metanol durante 30 min. A continuación se incubó con el AcMo en estudio durante 60 min temperatura ambiente. Como controles se utilizaron PBS 1X y un AcMo no relacionado (RSV). Como segundo anticuerpo se utilizó un conjugado (anti-Ig G de ratón) biotinilado (Vector) y se reveló utilizando el complejo avidina - biotina unido a peroxidasa (Madri J.A. & Barwick K.W., 1983; Harlow et al., 1988).

Para confirmar la conservación de los tejidos uno de los cortes fue coloreado con hematoxilina - eosina. Se detalla a continuación la reactividad, según los ensayos de DB y WB recién descriptos, de los AcMo ensayados.

MIO, MES, Mc, CS	1F3, 5A9B11.
MIO, MES, Mc	1A10C11, 5F2.
MIO, Mc	2H7, 3G6.
MES, Mc	2B5.
Controles negativos	RSV* y PBS (solución de lavado).
	* AcMo anti - Virus Sincicial Respiratorio.

RESULTADOS Y DISCUSION

La Tabla 5.7 presenta los resultados obtenidos. Como puede verse allí, los AcMo 5A9, 1A10C11 y 5F2 reconocen antígenos tanto en las muestras de MIO como en las de MES, mientras 1F3, 2H7 y 3G6 sólo lo hacen en MIO. Es de destacar que en todos los casos aquí descriptos la reacción o no con las muestras de tejido fue concordante ya se tratara de tejidos humanos o de hamster.

En todos los casos los AcMo se unen a antígenos intracitoplasmáticos y, en algunos casos (5A9B11 y 5F2), también a antígenos de la capa muscular de los vasos (Tabla 5.8 y Figuras 5.5, 5.6, 5.7, y 5.8).

La localización diferencial de estos epitopos con reactividad cruzada podría hacer que los mismos tengan distinta chance de actuar como hipotéticos blancos de reacciones autoinmunes presentando cada uno, por lo tanto, una relevancia biológica particular.

5.4. ESPECIFICIDAD DE LA REACTIVIDAD ANTI-TEJIDO

5.4. A. Los parásitos de los que se purifica la fracción Mc son cultivadas en un medio no definido que contiene homogeneizado de corazón bovino (TCM). Es entonces posible que componentes del medio de cultivo acompañen la purificación y hayan "ensuciado" la producción y selección de AcMo, que en ese supuesto podría incluir anticuerpos específicos para corazón bovino y por lo tanto capaces de dar reacción cruzada con miocardio humano.

A fin de investigar esta posibilidad se realizaron los siguientes estudios de especificidad.

MATERIALES Y METODOS

A.1. Reactividad anti - TCM

Se realizaron ensayos de ELISA contra Mc y TCM en paralelo con trece de los AcMo autorreactivos siguiendo el protocolo descrito en 4.2.4.

A.2. Ensayos de absorción.

Para proseguir estos ensayos se escogieron los AcMo 5A9 y 1A10C11. Para evaluar si los AcMo reconocían los mismos epitopos en Mc y TCM se realizaron los experimentos de absorción siguiendo la metodología propuesta por Mc Cormik T.S. & Rowland E.C (1989) según:

A. 100 µl de sobrenadante de hibridoma fueron absorbidos en paralelo con Mc (1 y 5 µg/100 µl, o sea que los AcMo se absorben con una concentración de antígeno igual a 2 y 10 veces la usada normalmente para ensayos de ELISA) 60 min a 4 ° C y luego se midió ELISA la reactividad contra TCM .

B. 100 µl de sobrenadante de hibridoma fueron absorbidos con TCM (1 y 5 µg/100 µl) 60 min a 4°C y luego se midió por ELISA la reactividad contra Mc.

RESULTADOS Y DISCUSION

A.1. Reactividad anti - TCM.

Sólo tres (5A9, 1A10C11 y 5F5) de los trece AcMo ensayados reaccionaron significativamente contra TCM (Figura 5.9). La reacción contra TCM de los restantes AcMo no alcanzó al 10% de la reacción contra Mc.

A.2. Ensayos de absorción

Como puede verse en la Figura 5.10 la reactividad de los AcMo 5A9 y 1A10C11 no se vió significativamente alterada por la preabsorción del AcMo con hasta 10 veces mas TCM. Inversamente, la reacción con TCM sí fue inhibida, especialmente para 5A9, por la preabsorción del AcMo con Mc.

Estos resultados demuestran que si bien para los AcMo 5A9 y 1A10C11 existe reactividad cruzada entre Mc y TCM, los componentes de TCM que pueden reconocerse en Mc conforman una porción marginal de ésta, y que por lo tanto los AcMo están genuinamente dirigidos contra epítopos de Mc.

5.4.B El hecho de haber obtenido reactividad positiva de los AcMo contra MIO de hamster abrió la posibilidad de estudiar la actividad biológica de los mismos en sistemas experimentales con animales, por lo tanto fue considerado de interés evaluar el grado de homología de las estructuras contenidas en el miocardio de distintos mamíferos.

MATERIALES Y METODOS

B Comparación del MIO humano, de hamster y murino

Se prepararon homogenatos de MIO siguiendo el procedimiento descrito previamente y sintetizado en 5.1.1. Los homogenatos fueron separados utilizando geles desnaturalizantes con 12% de poliacrilamida en paralelo con un standard de PM (Sigma Chemical Co., EEUU) y teñidos luego con Negro de Amido para evidenciar proteínas.

RESULTADOS

La Tabla 5.9 presenta los perfiles polipeptídicos de las muestras de MIO humano, murino y de hamster que, presentaron 25, 25 y 24 bandas respectivamente. Como puede observarse los perfiles presentan un importante grado de homología entre especies: 13 de los 25 componentes contenidos en el MIO humano fueron también detectados en los de ratón y hamster (52 % de homología), ascendiendo a 15 los componentes comunes a los MIO humano y murino (60 % de homología), mientras el grado de homología entre los MIO de ratón y de hamster fue mayor del 92 %.

5.4 C Evaluación de la órgano especificidad de la reactividad de los AcMo

Materiales y métodos

Para evaluar si dicha reactividad cruzada era órgano específica se realizaron ensayos inmunohistoquímicos con los AcMo sobre muestras de pulmón, estómago, músculo esquelético, riñón y miocardio de hamster normal. La metodología empleada es la ya descrita en 5.3.2. Se ensayaron cuatro AcMo: 1A10C11, 1F3, 5A9B11 Y 5F2. Debido a que en ensayos preliminares los sobrenadantes de los hibridomas no mostraron reactividad, se decidió concentrarlos 10 veces, con Amicon, antes de ensayarlos. También, como resultado de los ensayos preliminares se decidió emplear suero normal de hamster como agente bloqueo a fin de minimizar la reactividad inespecífica.

Resultados

Todos los AcMo ensayados, reactivos con miocardio y músculo esquelético, confirmando así los resultados antes presentados en la Tabla 5.7, resultaron no reactivos con las muestras de riñón, músculo liso y pulmón.

Estos resultados, en un primer análisis que deberá ser confirmado por estudios posteriores, sugiere que los AcMo estudiados reaccionan específicamente con epitopos presentes en el músculo cardíaco y esquelético.

5.5 CARACTERIZACION DE LOS AcMos AUTOREACTIVOS

A. INMUNOFLUORECENCIA INDIRECTA

MATERIALES Y METODOS

A fin de investigar la localización de las estructuras del parásito reconocidas por los AcMo en estudio se emplearon ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Para ello se utilizaron improntas conteniendo epimastigotes enteros de la cepa Tulahuén de T. cruzi (Instituto Nacional de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatała Chabén", Manual de Laboratorio 1993). Como primer anticuerpo se utilizó el AcMo en estudio y como segundo anticuerpo una anti-Ig total de ratón conjugada con fluoresceína. Como control positivo se utilizó un AcMo anti-fracción flagelar de T. cruzi y como control negativo un AcMo producido contra el Virus Sincicial Respiratorio (RSV), empleando para la lectura un microscopio de fluorescencia con epiiluminación.

RESULTADOS

Estos ensayos mostraron que los AcMo estudiados son reactivos con distintas estructuras del T. cruzi, como se resume en la Tabla 5:11 y se ilustra en la Figura 5.11. Los AcMo 1F3G2 y 5A9B11 reaccionaron con manchas densas en el cuerpo del parásito, y débilmente con el flagelo. En cambio el AcMo 5F2 reaccionó en forma homogénea con la superficie del parásito y presentó una reactividad anti-flagelo muy fuerte, mientras el AcMo 1A10C11 sólo reaccionó con áreas definidas del cuerpo del parásito. Estos resultados muestran que a pesar de que los epitopos reconocidos por los AcMo originalmente pertenecen a una fracción interna del parásito, están también representados en la superficie y/o flagelo del mismo.

B. DETERMINACION DE ISOTIPOS

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó el método de doble difusión radial (Harlow E. & Lane D., 1988). Brevemente, se prepararon portaobjetos cubiertos con 3 ml de agar 1,5% en PBS, 0,1 % azida sódica. Luego de solidificado el gel se practicó un orificio central donde se sembró el anticuerpo anti-isotipo -en este caso se ensayaron los isotipos IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ e IgM- y 6 orificios periféricos donde se sembraron los AcMo a ensayar -en este caso los AcMo 1A10C11, 1F3G2, 5A9B11 y 5F2-. Se incubó a temperatura ambiente en cámara húmeda y se dejó difundir 24-48 horas hasta la aparición de los halos de difusión. Luego de fijado se coloreó con Amido Schwartz.

RESULTADOS

Todos los AcMo estudiados (1A10C11, 1F3G2, 5A9B11 y 5F2) son del tipo Ig M.

C. NATURALEZA GLUCIDICA DE LOS EPITOPES AUTOREACTIVOS

Ya habíamos documentado anteriormente la importancia de los azúcares en la antigenicidad de Mc. Más aún gran parte de las proteínas reconocidas por los AcMo tanto en Mc como en MIO y MES contienen residuos hidrocarbonados. Para evaluar la naturaleza glucídica de los epitopos reconocidos por los AcMo con reactividad cruzada en Mc se ensayó su reconocimiento por los AcMo tras someter a Mc a oxidación con ácido periódico según se describió en 4.2.8.

RESULTADOS

La reactividad remanente de los AcMo de reactividad cruzada resultó 34% para 1F3G2, 72% para 1A10C11 y 100% para 5A9B11 y 5F2 (Figuras 4.5 y 4.6). Estos resultados demuestran que los AcMo 1A10C11 y 1F3G2 reconocen parcialmente epitopos de naturaleza glucídica mientras que en los AcMo 5A9B11 y 5F2 los residuos hidrocarbonados no forman parte del sitio reconocido.

CONCLUSIONES Y DISCUSION

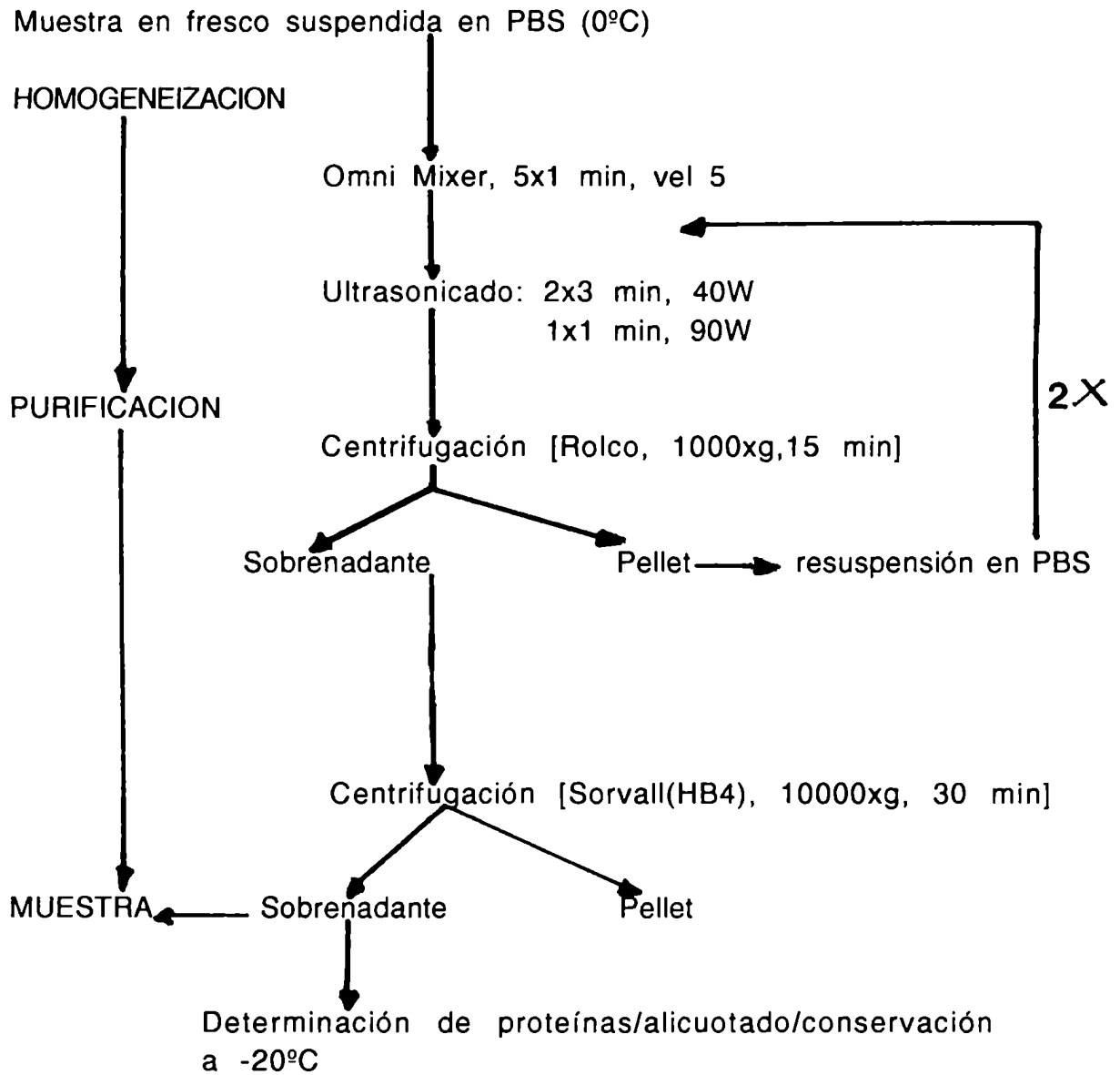
En este capítulo hemos presentado variada evidencia mostrando que la inmunización de ratones con la fracción microsomal de epimastigotes de T. cruzi permitió producir anticuerpos monoclonales capaces de reconocer estructuras contenidas no sólo en Mc sino también en el citosol del parásito y en el miocardio y el músculo esquelético humano y de hamster.

Una vez demostrado que la reactividad detectada no tiene relación con la posible contaminación con el medio de cultivo de los parásitos se hace clara la especificidad del reconocimiento que estos AcMo hacen de un amplio número de estructuras tanto en el parásito como en los tejidos de mamíferos. También se ha caracterizado parcialmente la naturaleza de dichos AcMo con reactividad cruzada y los epitopos reconocidos. En todos los casos los AcMo reconocen antígenos intracitoplasmáticos y, en algunos casos también, antígenos de la capa muscular de los vasos. Estos resultados sugieren que estos antígenos con ubicación diferencial podrían tener distinta implicancia biológica como hipotéticos blancos de reacciones autoinmunes. La demostración de que los AcMo son reactivos con tejidos animales posibilita el futuro uso de modelos experimentales para estudiar su actividad biológica. La determinación de todos los AcMo estudiados son del isotipo IgM, además de definir la naturaleza de los AcMo en estudio, permitirá seleccionar la estrategia para su aislamiento. En cuanto a la naturaleza química de los epitopos reconocidos por estos AcMo, se ha visto que para algunos de ellos el reconocimiento no es hacia residuos carbohidratados (5A9B11 y 5F2) mientras que para otros el reconocimiento es parcial (1A10C11 y 1F3G2). Por otro lado la demostración de que los epitopos reconocidos en la fracción Mc del T. cruzi son ubicables en la superficie del parásito aleja la necesidad de lisis parasitaria para que sean presentados al sistema inmune del huésped; sin embargo, si son epitopos con reacción cruzada, y por lo tanto no reconocibles como no propios, la variación de sus niveles al ritmo de la lisis parasitaria podría equivaler a una situación de inmunización permanente en el huésped que llevaría a la ruptura del mecanismo de tolerancia inmunológica originando una respuesta autorreactiva. Mas aún¹⁰², en enfermedades de origen autoinmune, como el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoidea, se ha descrito una reactividad vascular de base. En la forma crónica de la Enfermedad de Chagas se observan delgados vasos sanguíneos congestivos dentro del tejido fibrótico y entre las fibras miocárdicas. Así, la presencia de epitopos de reactividad cruzada en la capa muscular de los vasos de miocardio haría de éstos un perfecto blanco antigénico.

Uno de los puntos más controvertidos en la hipótesis de que el daño tisular es producido por un fenómeno de mimetismo molecular es la falta de evidencia directa que demuestre la inducción de patología con antígenos de reactividad cruzada. Esta limitación aparece ahora resoluble: la identificación de antígenos de reactividad cruzada en una fracción que per se es capaz de producir daño tisular acerca la posibilidad de identificar estructuras del T. cruzi involucradas en la fisiopatogenia de la forma crónica de la Enfermedad de Chagas y aclarar los

mecanismos asociados al gatillado y desarrollo de la miocardiopatía chagásica crónica.

Figura 5.1. Preparación de homogeneizados de tejidos de mamífero.



Todo el procedimiento se realizó en baño de hielo y en el día.

Figura 5.2. Perfil polipeptídico de tejidos humanos. A: miocardio y B: músculo esquelético. Los números en los márgenes indican marcadores de PM conocido.

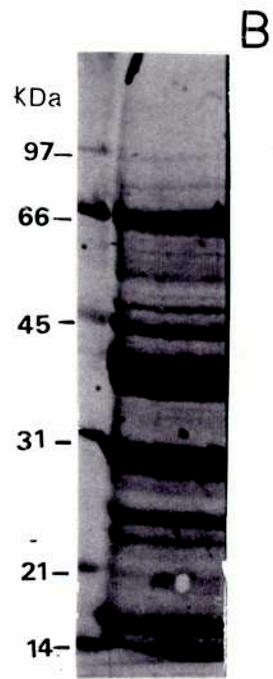
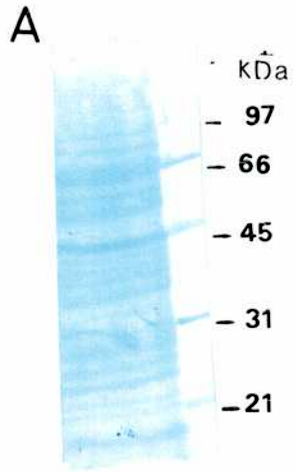


Figura 5.3. Comparación de los perfiles polipeptídicos (P) y de glicoproteínas (A) de las fracciones microsomal (Mc) y citosólica (CS) de T. cruzi y de miocardio (MIO) y músculo esquelético (MES) humano. Los números a la izquierda indican los PM.

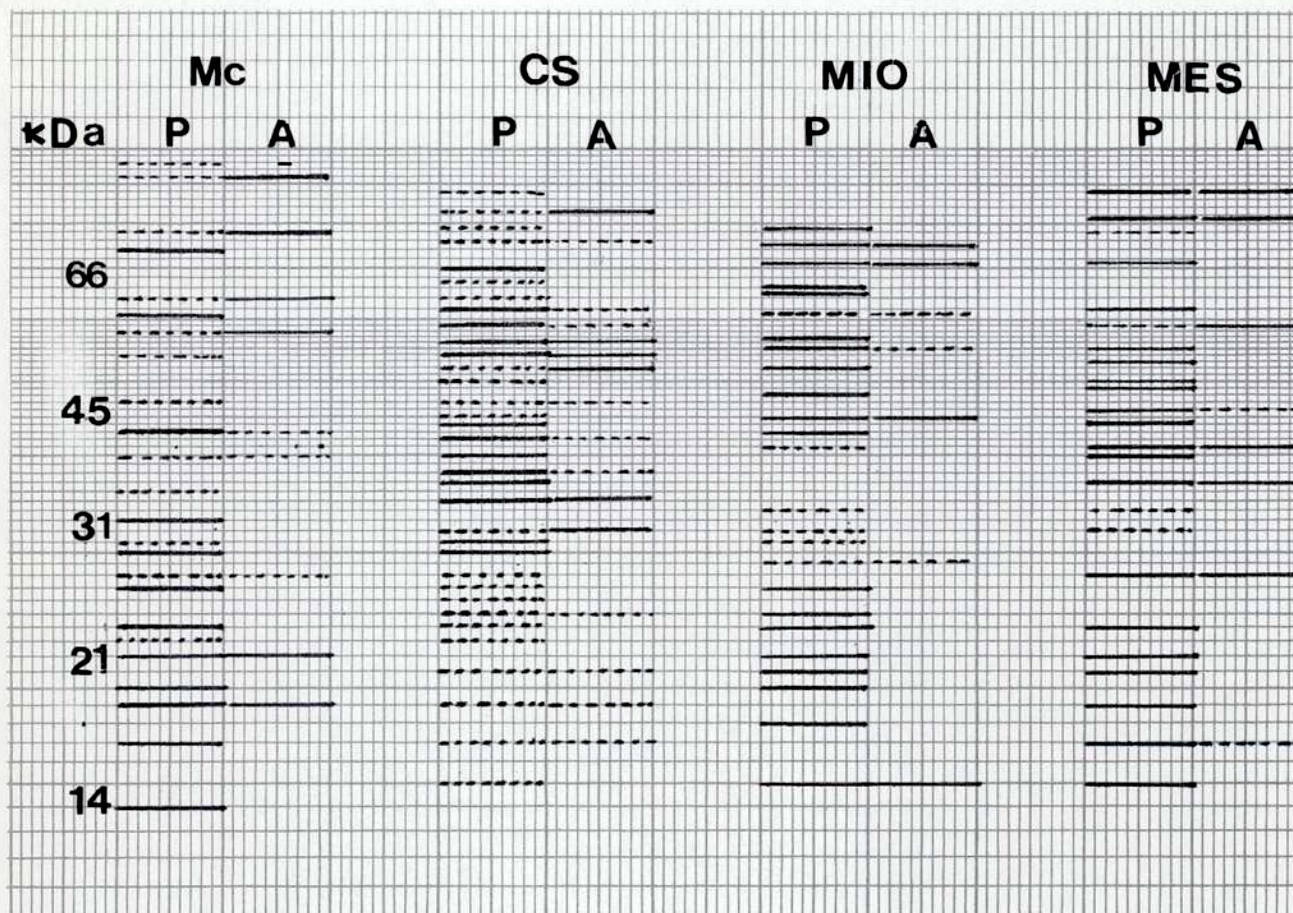


Figura 5.4. Proteínas de miocardio (A) y músculo esquelético humanos (B) reconocidas por AcMo anti-Mc después de separadas por SDS-PAGE y transferidas a nitrocelulosa. 5A9 (1), 1A10C11 (2), 5F2 (3), RSV (control negativo) (4). Los números a la derecha indican marcadores de PM conocidos.

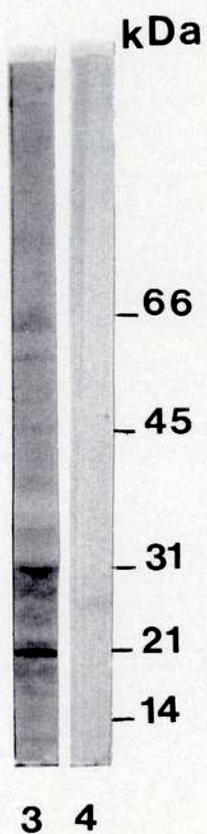
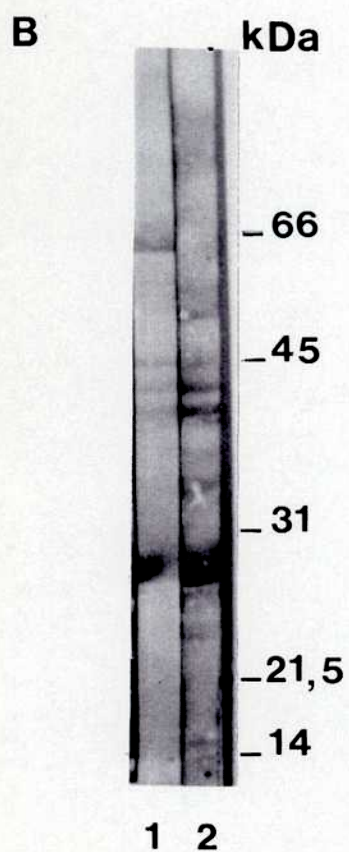
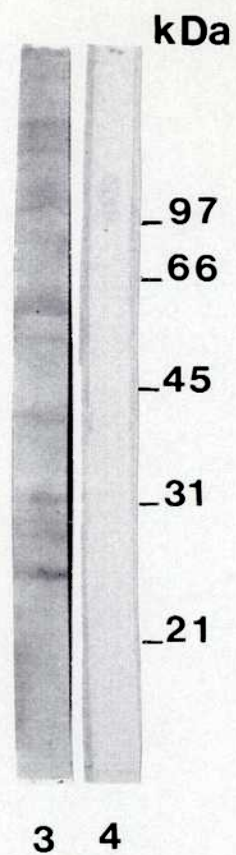
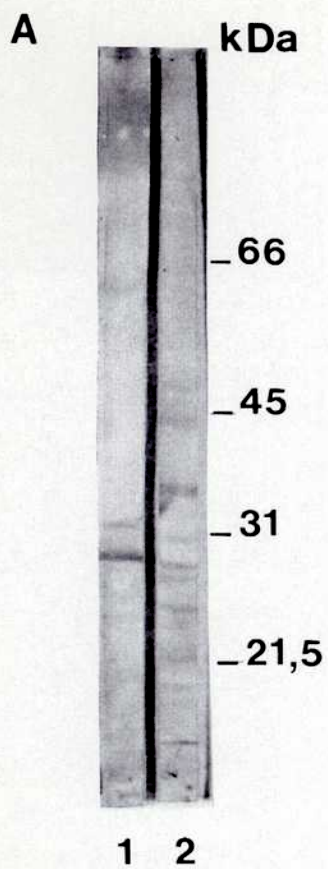
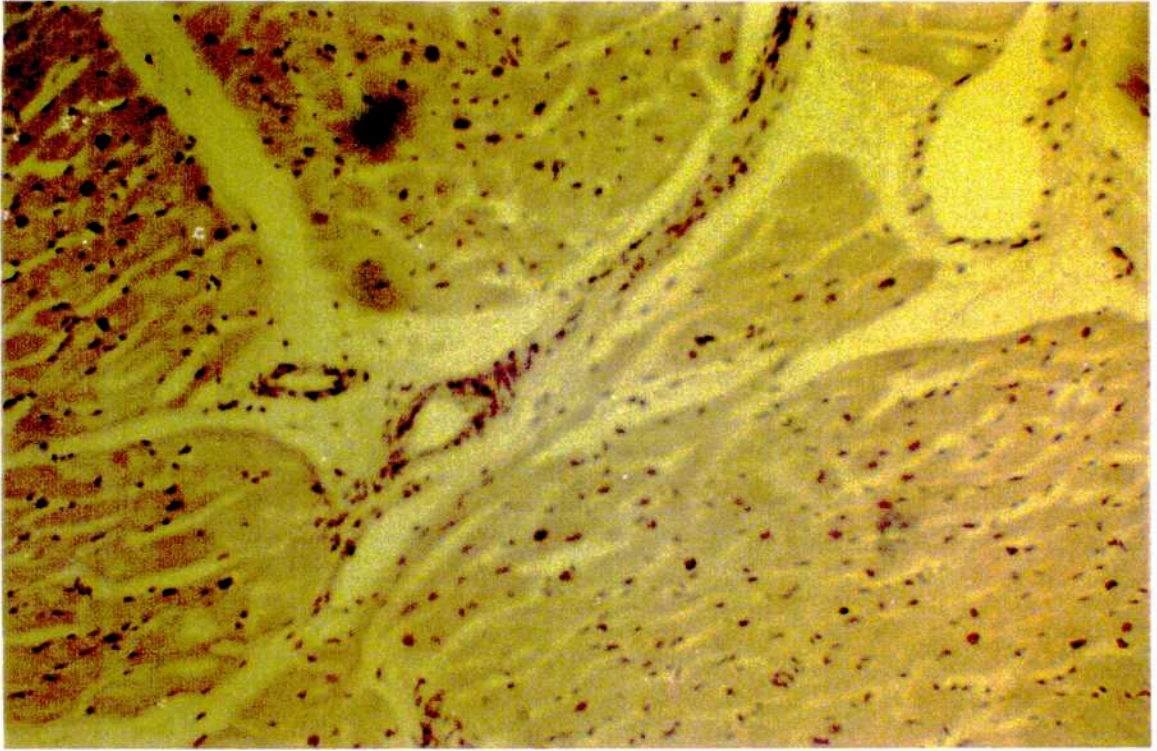


Figura 5.5. Demostración inmunohistoquímica de la reacción de un AcMo anti-Mc con miocardio humano. A:RSV, control negativo; B: 5A9B11 marcando capa muscular de vaso y fibra miocárdica.

A



B

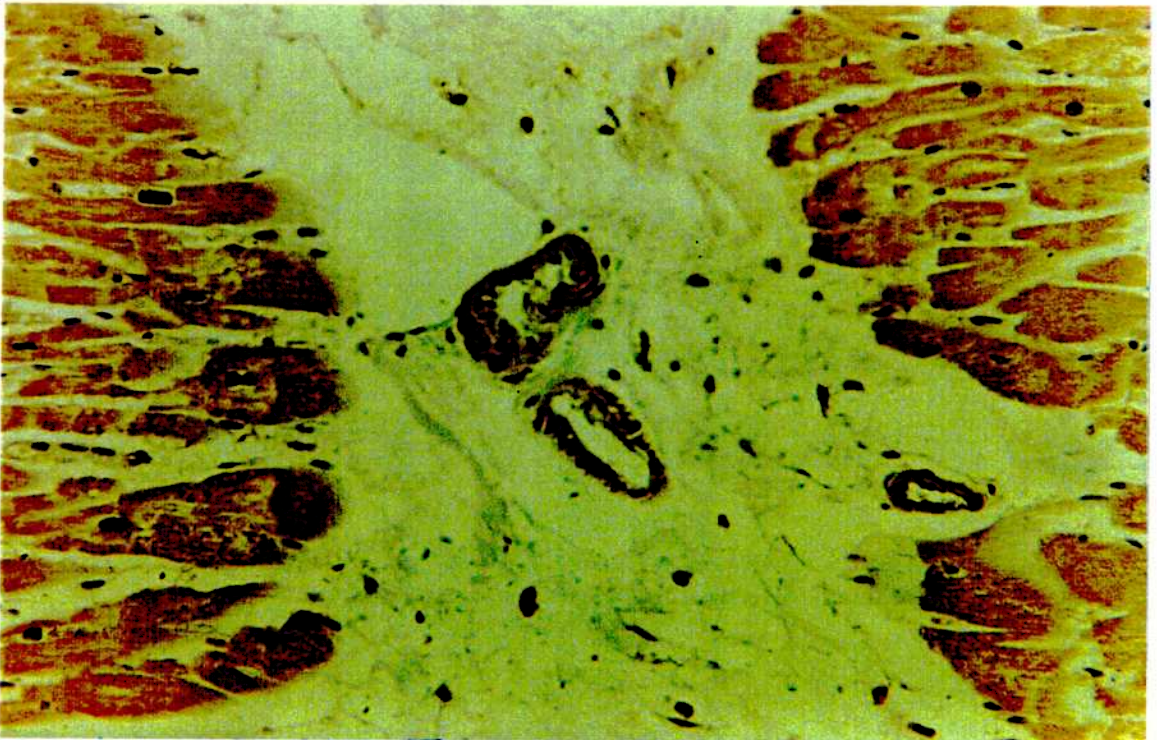


Figura 5.6. Demostración inmunohistoquímica de la reacción del AcMo 1A10C11 con miocardio humano marcando fibra miocárdica.

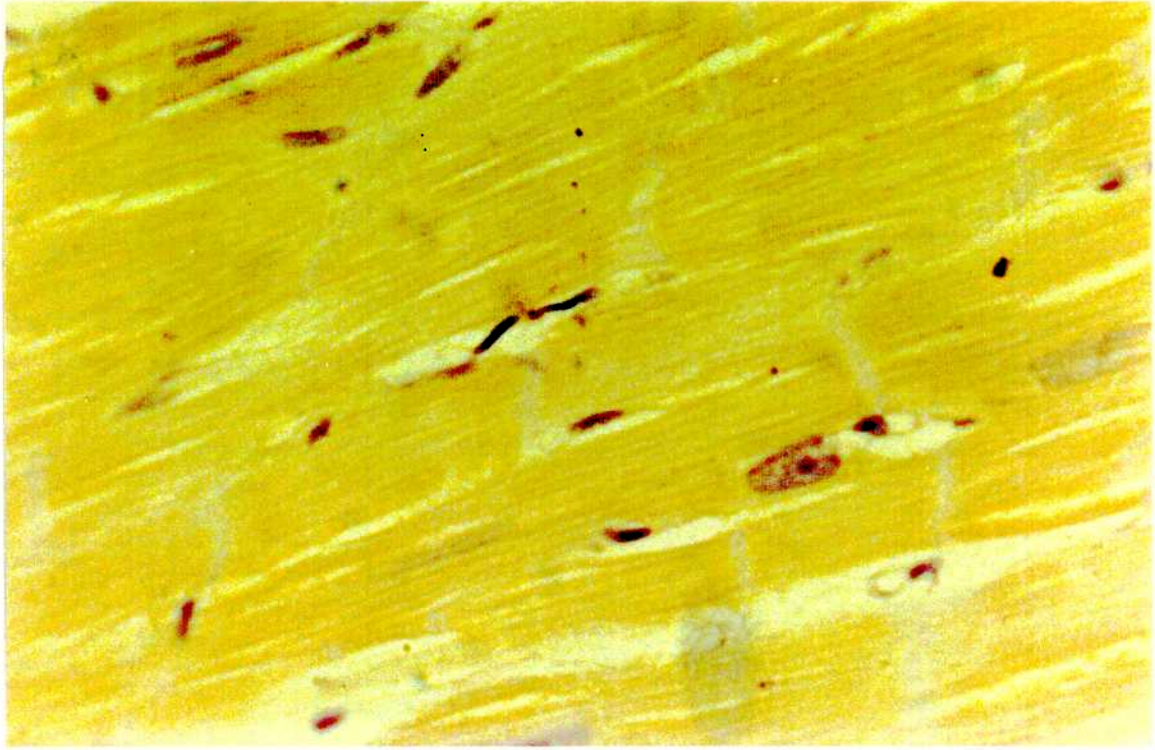
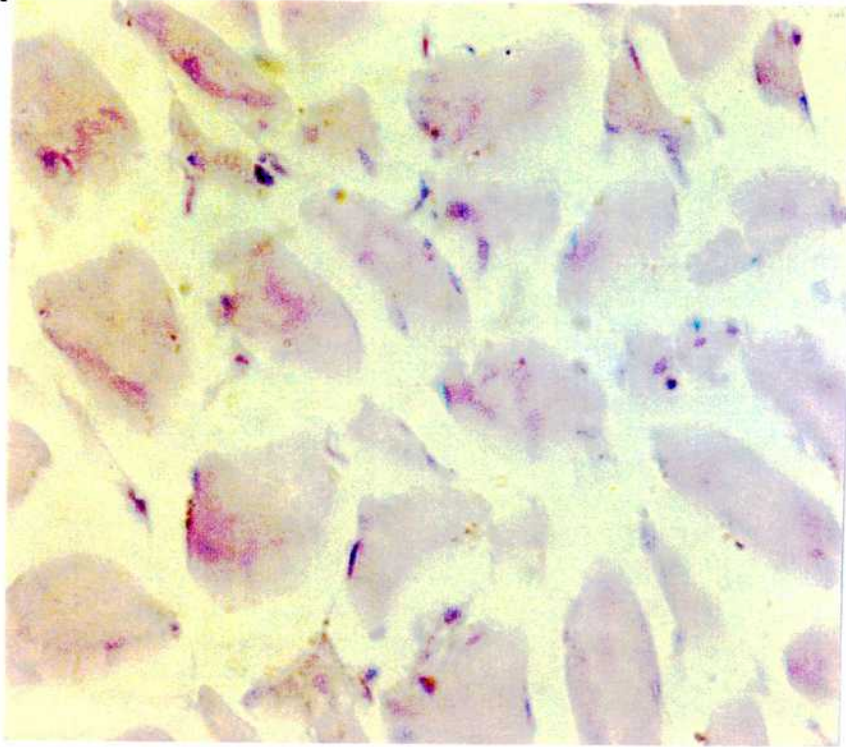


Figura 5.7. Demostración inmunohistoquímica de la reacción de un AcMo anti-Mc con músculo esquelético humano. A: RSV, control Negativo; B: 5F2.

I

A



B

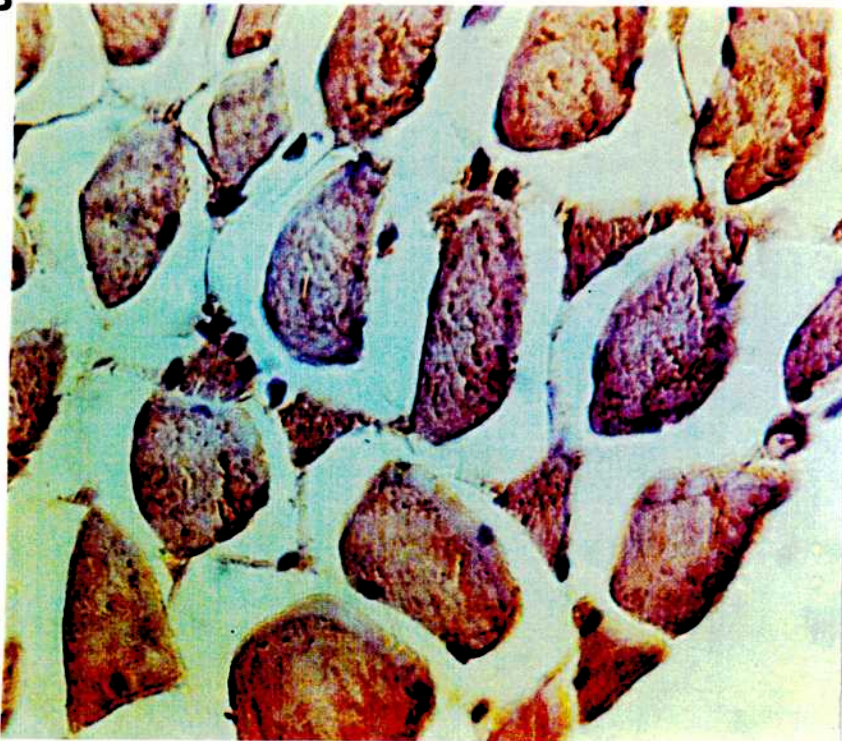
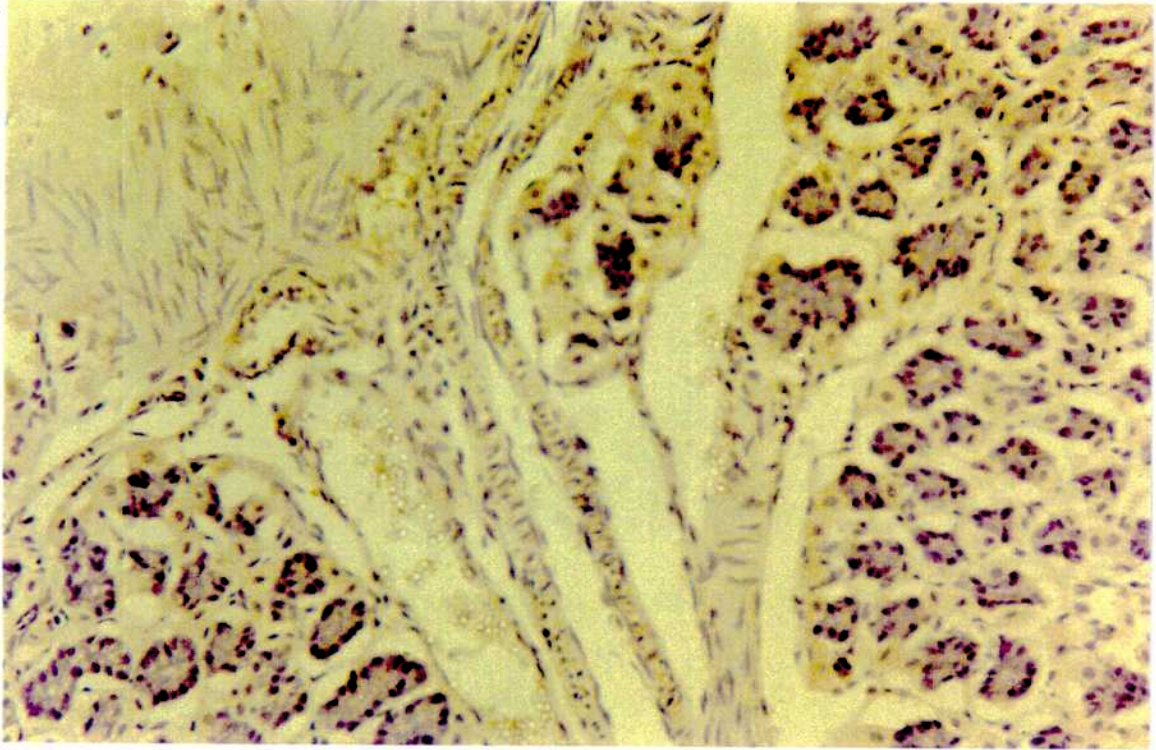


Figura 5.8. Demostración inmunohistoquímica de la reacción de un AcMo anti-Mc con miocardio de hamster. A: 5F2 negativo para músculo liso de hamster hamster; B: 5F2 positivo para miocardio.

A



B

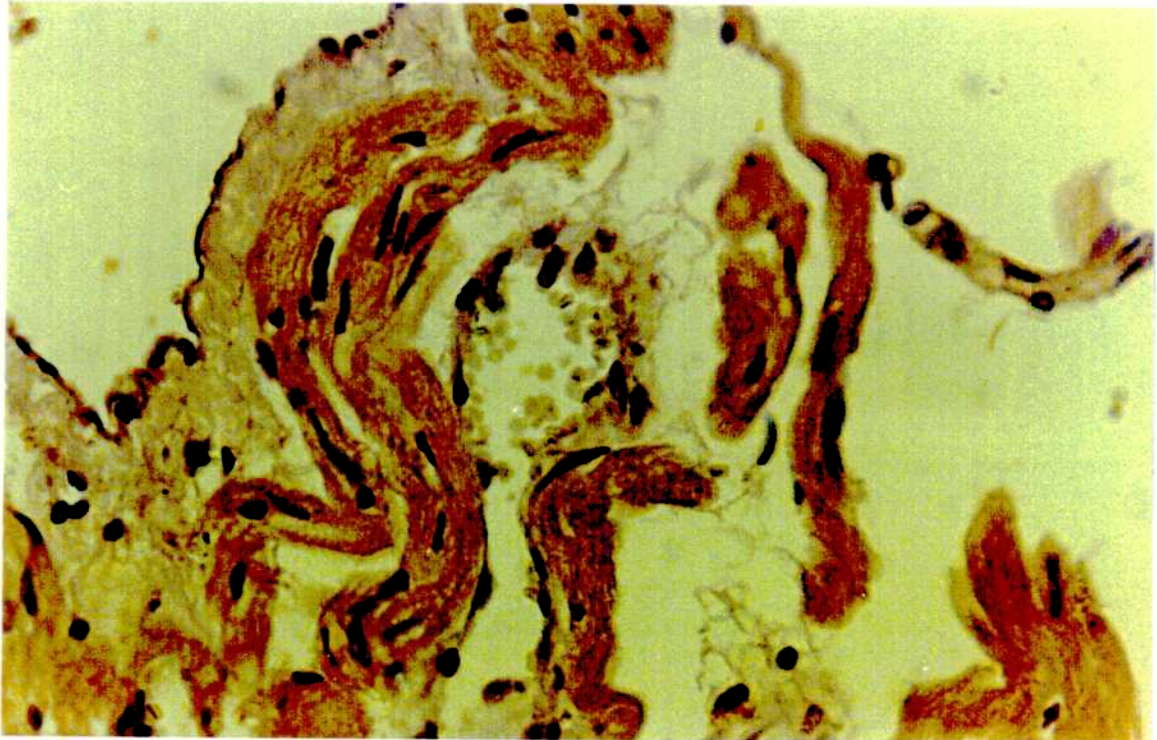


Figura 5.9. Especificidad de Reconocimiento de los AcMo con reactividad cruzada.

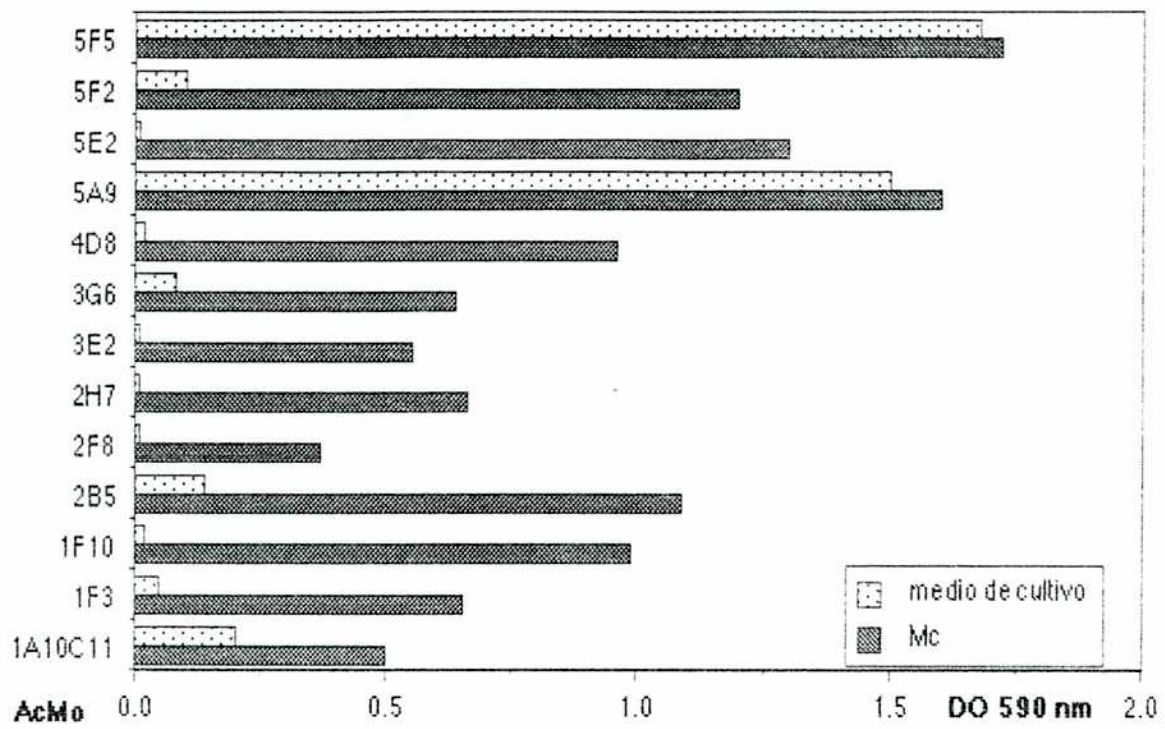


Figura 5.10. Ensayos de absorción para analizar la especificidad de la reactividad anti-tejido de los AcMo anti-Mc. AcMo 5A9 (A); 1A10C11 (B) y 1F3 como control (C). Los resultados se presentan como la DO a 590 nm de ensayos de ELISA. De abajo hacia arriba se presentan las DO del AcMo reaccionando con Mc sin absorber (anti-Mc) y después de absorbido con 2 veces la concentración de TCM (anti-Mc - tcm x2), sin absorber (anti-Mc) y después de absorbido con 10 veces la concentración de TCM (anti-Mc - tcm x 10), con tcm sin absorber (anti-tcm) y después de absorbido con 2 veces la concentración de Mc (anti-tcm - Mc x 2) y sin absorber (anti-tcm) y después de absorbido con 10 veces la concentración de Mc (anti-tcm - Mc x 10)

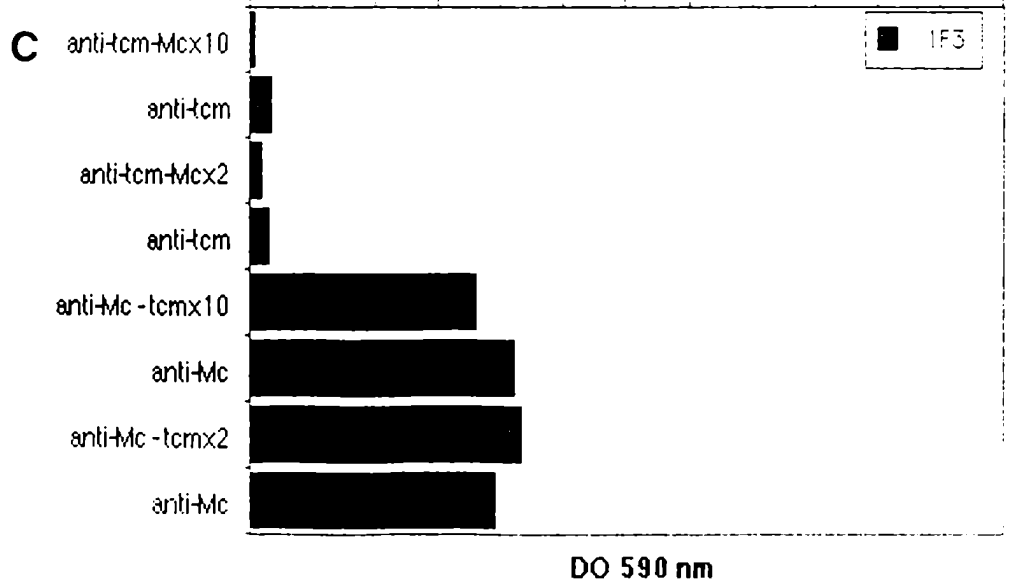
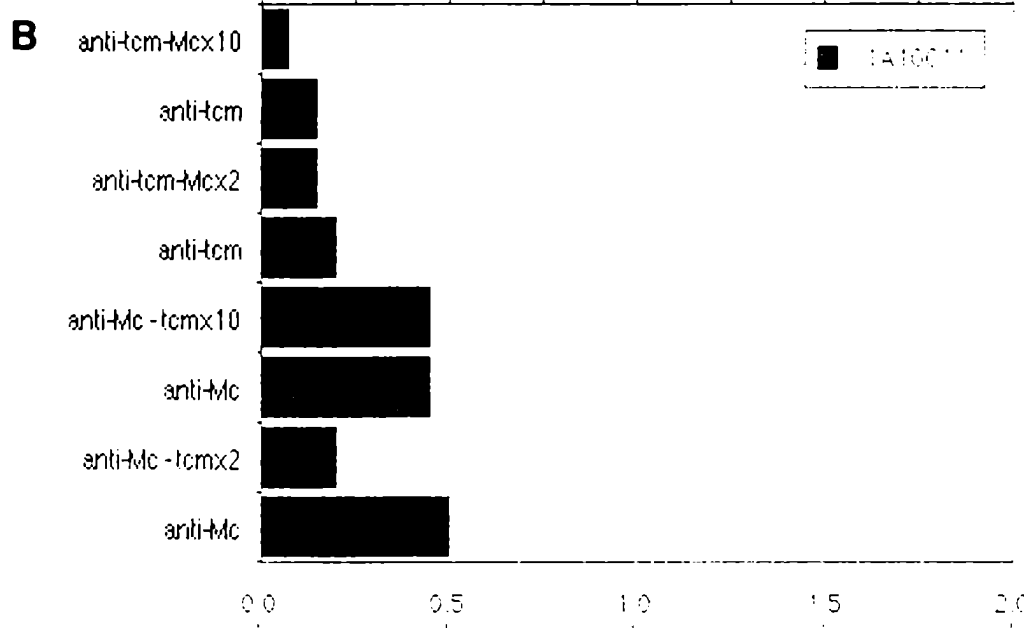
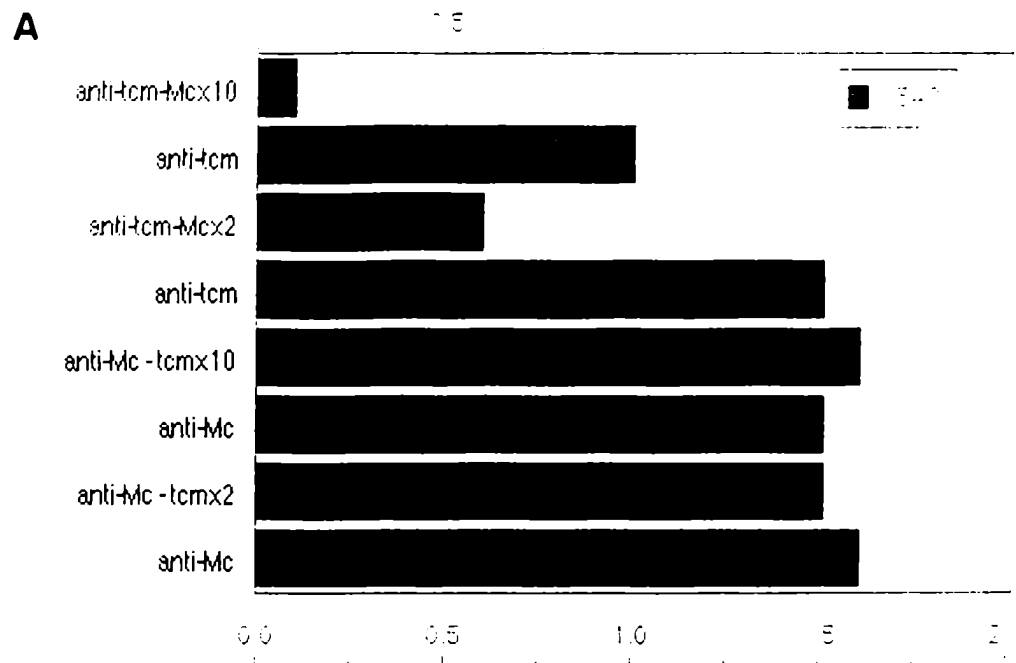


Figura 5.11. Inmunofluorescencia indirecta de un AcMo con reactividad cruzada contra epimastigotes de la cepa Tulahuén de T. cruzi. A: RSV, control negativo y B: 5F2.

A



B

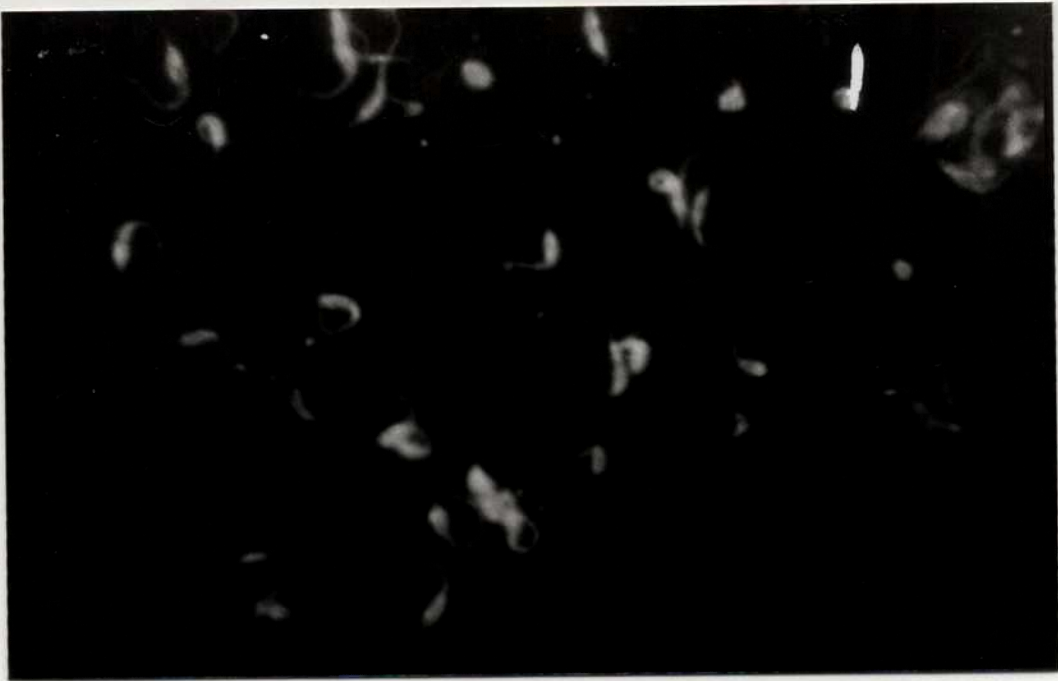


Tabla 5.1

Reactividad anti-tejido de 63 AcMo dirigidos
contra antígenos de Trypanosoma cruzi

MIO	MES	TOTAL	Mc+ CS+	Mc+ CS-	Mc- CS+	Mc- CS-
SI	SI	19	11	7	2	0
SI	NO	6	1	5	0	0
NO	SI	2	0	2	0	0
NO	NO	36	2	22	1	11
TOTAL		63	14	36	3	11

¹ La reactividad contra Mc y CS fue comprobada por ELISA, DB y WB; la reactividad contra MIO y MES fue evaluada por DB.

Tabla 5.2

Análisis por DB del reconocimiento de epitopes de MIO y MES por AcMo anti-Mc

MIO, MES, Mc, CS	4A9, 5A9, 5D6, 2E1, 3E9, 5E5, 2F3, 2G11, 3G3, 4G1, 1F3
MIO, MES, Mc	2A9, 1B2, 1B7, 3E2, 4D12, 1F8, 5F5.
MIO, MES, CS	3D3, 2F8.
MIO, Mc, CS	1A10C11
MIO, Mc	3D11, 4D8, 2E9, 3G6, 2H7.
MES, Mc	2B5, 5F2.

Tabla 5.3

Polipéptidos e hidratos de carbono en tejidos humanos

PM aparente (kDa)	MIOCARDIO		MUSCULO ESQUELETICO		PM aparente (kDa)	MIOCARDIO		MUSCULO ESQUELETICO	
	Proteína	HC	Proteína	HC		Proteína	HC	Proteína	HC
88			DENSA	DENSA	44			DENSA	
81			DENSA	DENSA	43	DENSA			
79	DEBIL				41	DEBIL		DENSA	DENSA
78			DEBIL		40			DENSA	
75	DENSA	DENSA			37			DENSA	DENSA
71	DENSA	DENSA	DENSA		34	DEBIL		DEBIL	
66	DENSA				32	DEBIL		DEBIL	
65	DENSA				31	DEBIL			
61	DEBIL		DENSA		29	DEBIL	DEBIL		
59			DEBIL	DENSA	30-28			DENSA	DENSA
57	DENSA				27	DENSA			
55	DENSA	DEBIL	DENSA		25	DENSA			
53			DENSA		24	DENSA		DENSA	
52	DENSA				22	DENSA		DENSA	
50			DENSA		21	DENSA		DENSA	
49			DENSA		20	DENSA			
48	DENSA				19			DENSA	
46			DENSA	DEBIL	18	DENSA		DENSA	
45	DENSA	DENSA			15	DENSA	DENSA	DENSA	

Muestras de miocardio y músculo esquelético humano fueron homogeneizadas y separadas por SDS-PAGE. Se empleó tinción con Negro de Amido para detectar componentes proteicos y reacción con Concanavalina A para detectar hidratos de carbono (HC).

Tabla 5.4

Análisis por WB del reconocimiento de epitopos de MIO y MES por AcMo anti-Mc

Tejido o fracción MES reconocido	Reactividad por WB de sobrenadantes reactivos por dot-blot ante MIO y/o		
	NO ENSAYADO	WB NO REACTIVO	WB REACTIVO
MIO, MES, Mc, CS	2E1, 4G1, 5E5	2G11, 3E9, 4A9, 5D6	1A10C11, 1F3, 2F3, 3G3, 5A9
MIO, MES, Mc	1B2, 1F8	1B7, 3E2.	2A9, 5F2
MIO, MES, CS	3D3		
MIO, Mc	3D11	2H7, 4D8.	2E9, 3G6, 5F5
MES, Mc		2B5.	4D12
MES, CS			2F8
TOTAL	7	9	12

NOTAS: 1A10C11 no reaccionaba con MES por DB
 5F2 no reaccionaba con MIO por DB
 4D12 no reaccionaba con MIO por DB
 2F8 no reaccionaba con MIO por DB
 5F5 no reaccionaba con MES por DB

Tabla 5.5

Reactividad por WB de sobrenadantes de hibridomas anti-T. cruzi contra Mc, MIO y/o MES

Sobrenadante de hibridoma	Western blot*		
	Mc	MIO	MES
1A10 C11	61/48-42R/47/43	75/65/61/57/	61/59/50/46/
		52/43/37/35/	44/41/40/37/
		34/31/27/24/	30-27R/22/15
		22/20	
1F3	87/64/61/30/28	55/31/29/27	55/49/44/32/ 28/24/21
2F3	61/53/17/14	66/55/45/34/ 32	71/61/53/50/ 46/44/30-27R
3G3	15	N.R.	28
5A9	61/58/54/ 36-33R/ 15-14R	75/66/65/37/	81/75-71 R/
		34/29	61/59/50/ 44/41/40/ 37/30-27R
2A9	98/33	66/55/52/45/ 34	71/59/53/49/ 44/32/27/24/ 21
4D12	28	N.R.	28
5F2	84/54/50/37/33/14	109/100/83/	71/59/49/44/
		65/61/45/32/	41/40/30-28R/
		29/27/25/18	24/21/19/18
5F5	58/48/28/22	48/43/24/20	N.D.
2F8	28	N.R.	28
2E9	74/66/54/47/33/	81/65/45/41/	N.D
	30/26/18-16R	34/32/27	
3G6	47	34	N.D

N.D: no determinado porque es no reactivo.

N.R: no reactivo y R: zona de reactividad

*Los resultados presentan el PM aparente de los polipéptidos reconocidos por los distintos AcMo.

Tabla 5.6

Perfil de reactividad contra Mc y, MIO y MES humano de los AcMo clonados

Sobrenadante de hibridoma	Anti-Mc		Anti-MIO	Anti-MES
	DB	ELISA	DB	DB
1F3	Positivo	Positivo	Positivo	
1F3E4	Positivo	Positivo	No ensayado	No ensayado
1F3E7	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1F3E9	Positivo	Positivo	No ensayado	No ensayado
1F3G2	Positivo	Positivo	No ensayado	No ensayado
1F3G3	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
5A9	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5A9A7	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5A9B7	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5A9B11	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5A9B10	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
5A9D9	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
5A9D10	Positivo	Positivo	No ensayado	No ensayado

1F3 es no reactivo con CS y TCM

5A9 es reactivo con CS y TCM

Tabla 5.7

Estudio inmunohistoquímico de la reactividad anti-MIO y anti-MES de los AcMo anti-fracción Mc de T. cruzi.

Sobrenadante de hibridoma	MIO	MES
RSV	Negativo	Negativo
PBS	Negativo	Negativo
5A9B11	Positivo	Positivo
1F3	Positivo	Negativo
1A10C11	Positivo	Positivo
5F2	Positivo	Positivo
2B5	No ensayado	Negativo
2H7	Positivo	No ensayado
3G6	Positivo	No ensayado

Tabla 5.8

Localización de los antígenos de miocardio reconocidos por AcMo anti-Mc

AcMo	CITOPLASMA	CAPA MUSCULAR DE VASOS	DISCO INTERCALAR	OTROS
1F3	SI	NO		Fibroblastos del Intersticio
5A9	SI	SI	NO	
1A10C11	SI	NO	NO	
5F2	SI	SI		

Tabla 5.9.

Perfil de proteínas de miocardio de mamíferos

kDa	HU	RA	HA	kDa	HU	RA	HA
79	Débil			37		Débil	Débil
75	Densa	Densa	Densa	36		Densa	Densa
71	Densa	Débil		34	Débil		
66	Densa	Débil		32	Débil	Densa	Densa
65	Densa			31	Débil	Densa	Densa
63		Débil	Débil	30		Densa	Densa
61	Débil	Densa	Densa	29	Débil		
57	Densa			28		Débil	Débil
55	Densa	Densa	Densa	27	Densa		
53		Débil	Débil	25	Densa	Débil	Débil
52	Densa	Débil	Débil	24	Densa	Densa	Densa
48	Densa	Densa	Débil	22	Densa		
45	Densa	Débil	Débil	21	Densa		
44		Débil	Débil	20	Densa	Densa	Densa
43	Densa	Débil	Débil	18	Densa	Débil	Débil
42		Débil	Débil	17		Débil	Débil
41	Débil			16			Débil
39		Densa	Densa	15	Densa		

HU: Miocardio humano, HA: Miocardio de hamster, RA: Miocardio de ratón

Tabla 5.10

Estudio de la órgano especificidad de la reactividad de los AcMo anti-Mc

Ac Mo ensayado	MIOCARDIO	RINON	MUSCULO LISO	MUSCULO ESQUELETICO	PULMON
PBS control	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
RSV control	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
1A10C11	POS	NEG	NEG	POS	NEG
1F3	POS	NEG	NEG	no ensayado	NEG
5A9B11	POS	NEG	NEG	no ensayado	NEG
5F2	POS	NEG	NEG	POS	NEG

Tabla 5.11.

Inmunofluorescencia de los AcMo con reactividad cruzada

AcMo	SUPERFICIE		MARCACION
	Homogénea	Otras	FLAGELO
RSV(control Neg.)	negativo	negativo	negativo
5A9B11		mayor densidad en el cuerpo	Positivo débil
5F2	Positivo denso		Positivo denso
1A10C11		zonas de reactividad selectiva	Negativo
1F3G2		Mayor densidad en el cuerpo	Positivo débil

CAPITULO VI

RELEVANCIA BIOLÓGICA DE ANTÍGENOS CON REACTIVIDAD CRUZADA

INTRODUCCION

ELISA DE INMUNOINHIBICION

Para determinar si los epitopos con reactividad cruzada son reconocidos por los PChCr y evaluar si ello tiene alguna importancia desde el punto de vista biológico, se realizaron ensayos de inhibición.

MATERIALES Y METODOS

6.1. Sueros.

Se estudiaron sueros de 53 PChCr, 24 mujeres y 29 hombres, en un rango de 16 a 68 años de edad y que hayan vivido en zonas fehacientemente reconocidas como endémicas para el T. cruzi. Las personas fueron elegidas entre aquellas que concurren al Servicio de Atención Médica del Instituto Nacional de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaben" a las que se realizó un estudio clínico y cardiológico, incluyendo radiografía de tórax y electrocardiograma y angiografía. Las técnicas serológicas empleadas fueron: ELISA, hemoaglutinación indirecta e inmunofluorescencia indirecta. Se consideró serorreactivo a todo suero que reaccionó por lo menos por dos de las técnicas empleadas.

Después del estudio serológico y clínico, los PChCr fueron agrupados de acuerdo a su estadio clínico en PChCr-0 (sin manifestaciones cardíacas), PChCr-1 (con manifestaciones cardíacas en grado menor o en el límite) y PChCr-2/3 (con manifestaciones cardíacas moderadas y graves). Como grupo control se utilizaron 17 sueros de individuos seronegativos (rango:18-54 años) para Chagas por las tres técnicas mencionadas, 3 de ellos correspondían a pacientes con miocardiopatía idiopática (ver Tabla 6.1).

6.2. Antígeno.

Se empleó la fracción Mc de epimastigotes de T. cruzi obtenida como se describió previamente.

6.3 ELISA.

Se empleó la técnica indirecta fijando a la placa Mc a la concentración (5 µg/ml) normalmente usada para medir la reactividad de los AcMo y de los sueros hacia Mc. La placa fue incubada con el antígeno toda la noche a 4°C, lavada con PBS y bloqueada con Molico 5% en PBS. Luego se realizaron lavados con PBS conteniendo Tween 20 al 0,01% (PBS-T 0,01) y se incubaron los sueros diluidos 1/4 en Molico 1% en PBS-T 0,01, 60 min a 37°C. Como control, para cada AcMo cuatro pocillos fueron sembrados con Molico 1%. Se lavó exhaustivamente con PBS 1x y se enfrentó el AcMo correspondiente en la dilución elegida, durante 60 min. a temperatura ambiente.

Para la puesta a punto del ensayo se determinó primero por ELISA la cantidad mínima de cada AcMo capaz de saturar al antígeno pegado a la placa, y

por lo tanto sensible a toda disminución en la unión específica al antígeno. Para ello se realizaron ensayos de ELISA con distintas diluciones de los AcMo, se graficaron las DO en función de la dilución y se eligió la concentración de trabajo correspondiente a la zona donde comienza a disminuir la reactividad, que resultó 1/8 para 5F2 y 1/12 para 5A9B11 y el 1A10C11 se usó sin diluir. Además, estas diluciones corresponden a una DO homogénea para los 3 AcMo de manera tal que se trabajó con cantidades comparables de anticuerpos.

El ensayo se realizó incubando primero con los sueros y luego de lavar exhaustivamente, con los AcMo (actividad remanente), mientras dos de los pocillos controles eran incubados con el AcMo en estudio (100% de reactividad o reactividad total) y los otros dos con un AcMo no relacionado (blanco). Como segundo anticuerpo se empleó una anti-Ig total de ratón hecha en conejo y conjugada con peroxidasa (Sigma Chemical Co., EEUU). El revelado se realizó con OPD en buffer citrato pH 5,0 y peróxido de hidrógeno, interrumpiendo la reacción a los 10 min con HCl 1N.

Se calculó el porcentaje de inmunoinhibición (% de II) de los sueros según:

$$\% \text{ II} = (\text{Reactividad total} - \text{Reactividad remanente}) \times 100 / \text{Reactividad total}$$

RESULTADOS

Todos los sueros ensayados presentaron alguna capacidad para inmunoinhibir la reacción del AcMo 5F2 con la fracción Mc. Este efecto, sin embargo, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los PChCr ($\%II = 50 \pm 20$ $n=46$) que en los controles ($\%II = 19 \pm 7$ $n=14$) [Figura 6.1]. Mas aún, al ser enfrentado con sueros de PChCr con distinto compromiso cardíaco el AcMo 5F2 fue capaz de diferenciar ($p < 0.05$, test de Student) a la población de de PChCr -0/1 ($n=26$, $\%II = 37 \pm 16$) de la de PChCr-2/3 ($n=20$, $\%II = 67 \pm 7$) [Figura 6.1]. Es asimismo de interés destacar que la capacidad de los sueros de los PChCr-0 para inmunoinhibir la reacción de 5F2 con la fracción Mc resultó directamente proporcional a la edad de los pacientes ($a=7.6$, $b=0.93$, $r=0.66$, $p < 0.05$), siendo también significativa ($p < 0.05$, test de Student) la diferencia entre los pacientes mayores y menores de 40 años de edad (respectivamente $n=5$, $\%II = 60 \pm 5$ y $n=13$, $\%II = 28 \pm 10$) [Figura 6.1]. Más aun, los PChCr-0 con menos de 20 años de edad se comportaron como el grupo control no infectado ($p > 0.05$) mientras los mayores de 40 años lo hicieron como el grupo de los PChCr-2/3 ($p > 0.05$). En cambio, no se encontró relación de la capacidad inmunoinhibidora con la edad en el grupo de los PChCr-2/3 (<40 años: $n=8$, $\%II = 66 \pm 8$, >40 años: $n=12$, $\%II = 67 \pm 5$).

La competencia del AcMo 5A9B11 y los sueros de PChCr por los epitopos de Mc también mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, test de Student) cuando se compararon con los sueros controles: PChCr, $n=46$, $\%II = 47 \pm 25$; Controles, $n=13$, $\%II = 5 \pm 5$ [Figura 6.2]. Cuando se comparan los $\%II$ de los distintos grupos de PChCr se percibe una tendencia a mayor reactividad asociada a un mayor compromiso clínico, pero las diferencias no son estadísticamente significativas. Sin embargo, un análisis más detallado de los PChCr-0 revela la aparente existencia de dos subgrupos de pacientes, uno de baja reactividad ($n=14$, $\%II$ medio = 15 ± 9 , rango 0-29) y uno de alta reactividad ($n=6$, $\%II$ medio = 66 ± 11 , rango 51-73) [Figura 6.2]. Más aún, el primer grupo es comparable al grupo de controles sanos y el segundo al grupo de PChCr-2/3. Si arbitrariamente este segundo grupo es excluido el resto de los PChCr-0/1 ($n=21$, $\%II = 21 \pm 12$) resulta significativamente ($p < 0.01$, test de Student) menos reactivo que el grupo de PChCr-2/3 ($n=20$, $\%II = 65 \pm 8$) [Figura 6.2]. A diferencia de los resultados encontrados para el AcMo 5F2, en este caso no se pudo encontrar relación entre el $\%II$ y la edad de los PChCr, tanto en conjunto como separados según su compromiso cardíaco. Contrariamente ningún suero de PChCr fue capaz de inhibir el reconocimiento del AcMo 1A10C11 hacia Mc ($n=11$, $\%II = 6 \pm 6$).

CONCLUSIONES Y DISCUSION

Los epitopos reconocidos por los AcMo 5F2 y 5A9B11 son también reconocidos por los sueros de los pacientes chagásicos crónicos contrariamente al epitopo reconocido por el AcMo 1A10C11. Con ambos AcMo 5F2 y 5A9B11 fue posible poner en evidencia la heterogeneidad de la respuesta inmunológica hacia los epitopos del parásito y la existencia de diferencias significativas según el grado de evolución de la enfermedad. Aunque es prematuro aventurar una explicación última para estos resultados, debe destacarse que el AcMo 5F2 reconoce algún epitopo presente en Mc hacia el cual los PChCr asintomáticos tienen anticuerpos cuya concentración crece con la edad, mientras el AcMo 5A9B11 parece capaz de distinguir entre dos subpoblaciones de pacientes asintomáticos no relacionados con la edad, una de las cuales se comporta, en este aspecto, como los pacientes con manifiesto compromiso cardíaco. Los sueros de PChCr no reconocen el epitopo correspondiente al AcMo 1A10C11 lo cual nos sugiere la baja inmunogenicidad del mismo y que el fenómeno descrito no se observa en forma generalizada para todos los epitopos con reactividad cruzada. Estos resultados sugieren la potencial relevancia biológica de epitopos capaces de generar respuestas cruzadas. La diferencia hallada entre pacientes con distinto nivel de compromiso clínico en la respuesta por anticuerpos frente a los epitopos reconocidos por los AcMo estudiados sugiere que podríamos hallarnos frente a excelentes candidato a marcadores de riesgo de evolución hacia la enfermedad crónica.

Figura 6.1. Inmunoinhibición del AcMo 5F2 por sueros (de izquierda a derecha) controles, PChCr, PChCr-0/1, PChCr-2/3, PChCr-0 con edad < 40 años y \geq 40 años. Detalles en el texto.

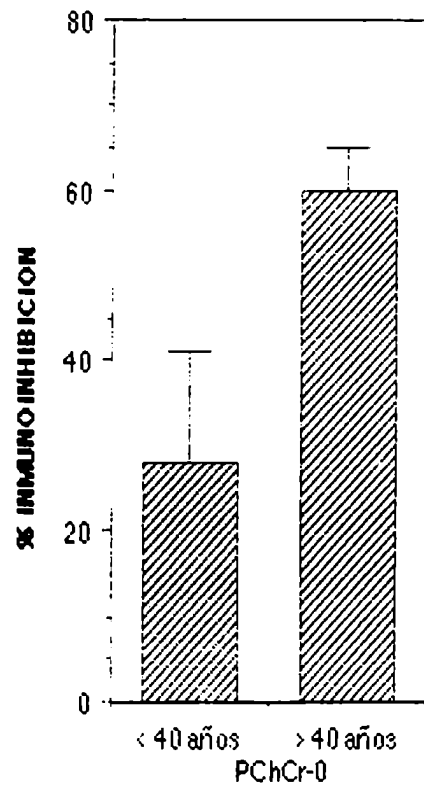
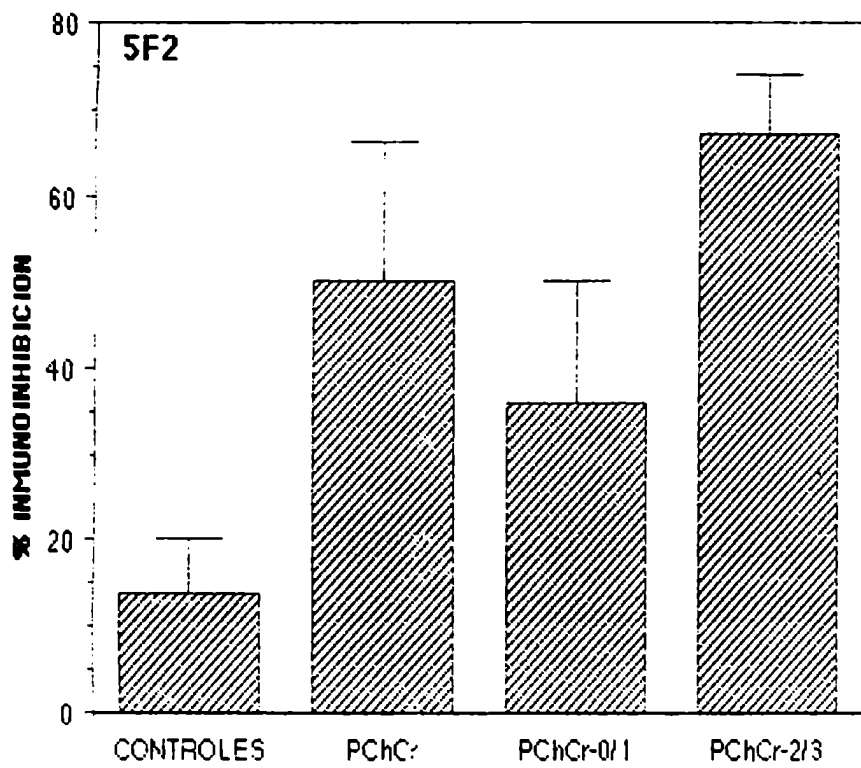


Figura 6.2. Inmunoinhibición del AcMo 5A9B11 por sueros (de izquierda a derecha) controles, PChCr, PChCr-0/1, PChCr-2/3, PChCr-0 con baja y alta capacidad de inmunoinhibir. Detalles en el texto.

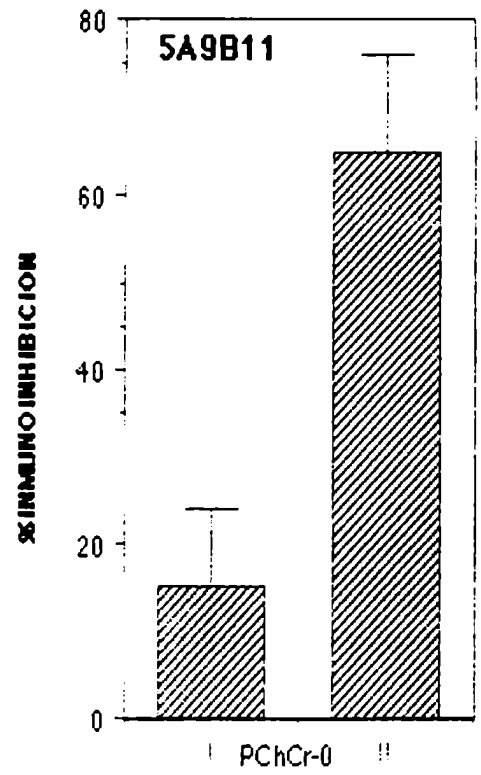
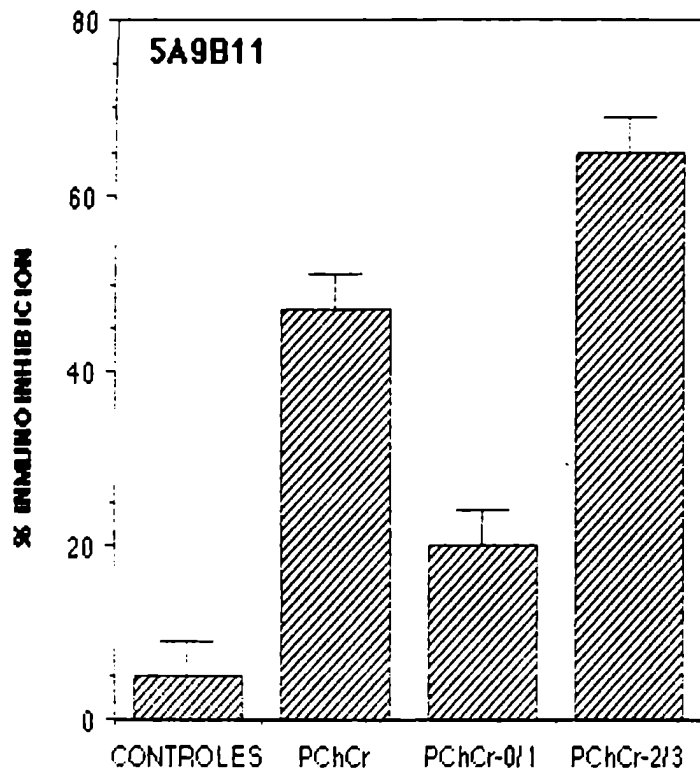


Tabla 6.1.

Características de la población estudiada

Grupo	Características Clínicas	n	Sexo M-F	Edad media \pm SD ^a (rango)	Serología para <u>T. cruzi</u>	Título anti-Mc media \pm SD ^b (rango)
CDP-0	Sin manifestaciones cardíacas	22	15-17	32,1 \pm 12,5 (16-53)	Positivo	4,8 \pm 0,8 (1:50-1:400)
CDP-1	Con manifestaciones cardíacas en grado menor o en el límite	9	5-4	44,2 \pm 12,9 (34-65)	Positivo	4,8 \pm 0,9 (1:50-1:800)
CDP-2/3	Con manifestaciones cardíacas moderadas o graves	22	10-12	46,8 \pm 13,5 (24-68)	Positivo	5,0 \pm 0,9 (1:50-1:800)
S.N	Controles sanos	14	12-5	35,6 \pm 13,5 (18-54)	Negativo	< 3,6 < 1:12
I.M.P.	Pacientes con miocardiopatía idiopática.	3	2-1	46,3 \pm 8,6 (37-54)	Negativo	< 3,6 < 1:12

a. Diferencias no significativas entre grupos.

b. Log 2 de los títulos. Diferencias no significativas entre grupos.

CAPITULO VII

ACULUMULACION DE ARNm PARA CITOQUINAS E ICAM-1
EN RATONES INFECTADOS CON DISTINTAS CEPAS DE TRYPANOSOMA CRUZI

INTRODUCCION

El control del sistema inmune sobre el T.cruzi es mediado por diferentes poblaciones celulares. Se ha demostrado que las células T, B, NK y los macrófagos participan en la resistencia contra el parásito (Schmuñis G. et al., 1971; Kierszenbaum F. et al., 1974, 1976; Kierszenbaum F. & Pienlowsky M., 1979; Trischmann T., 1983; Rottenberg M.R. et al., 1988). La habilidad de las células T de transferir protección parcial contra el desafío del parásito (Trischmann T.M. & Bloom B.R., 1980; Reed S.G., 1980; Nogueira N. et al., 1981) así también como la mayor susceptibilidad a la infección de ratones atímicos (Kierszenbaum F. & Pienlowsky M., 1979), tratados con ciclosporina (Mc Cabe R. et al., 1985; Araujo F.G., 1989) o timectomizados en la fase neonatal (Schmuñis G.S. et al., 1971) indican que las células T juegan un rol importante en la defensa contra el parásito. La mayor susceptibilidad a la infección de ratones inoculados in vivo con anticuerpos neutralizantes anti-CD4 o anti-CD8 (Rottenberg M.E. et al., 1988; Araujo F.G. 1989; Tarleton R., 1990) o que posean deleciones genómicas en las moléculas β -microglobulina, CD4 o CD8 pusieron en evidencia que tanto las poblaciones CD4⁺ como las CD8⁺ están involucradas en la resistencia contra el T. cruzi (Rottenberg M.R. et al., 1988; Tarleton R.L. et al., 1992; Rottenberg M.E. et al., 1993). Las células T podrían contribuir a la eliminación del parásito por varios mecanismos: pueden destruir directamente las células infectadas (Araujo F.G., 1985; Nickell S.P. et al., 1993), estimular la producción de anticuerpos antígeno específico (Rottenberg M.E. et al., 1988; Araujo F.G. 1989; Nikell S.P. et al., 1987; Rottenberg M.E. et al., 1992), o liberar linfoquinas capaces de modular diferentes mecanismos parasiticidas, en los que los fagocitos parecen estar especialmente involucrados (Nogueira N. et al., 1978, 1981).

El rol de las citoquinas en el curso de la infección con T. cruzi ha sido hasta el momento sólo superficialmente entendido. La activación de los macrófagos por TNF- α (de Titto E.H. et al., 1986; Tarleton R.L., 1988), IL-3 (Ho J.S. et al., 1992), IFN- γ (Wirth J.J. et al., 1985; Plata F.F. et al., 1987; Reed S.C. et al., 1987, 1988; Alcina A. & Fresno M., 1987) y GM-CSF (Reed S.C. et al., 1987) conlleva a la inhibición de la replicación o a la muerte de las formas intracelulares del T. cruzi, debido probablemente a la liberación de especies reactivas del oxígeno y/o del nitrógeno (Reed S. et al., 1987; Alcina A. & Fresno M., 1987; Muñoz-Fernández M.A. et al., 1992 a, 1992 b).

Entre estas citoquinas, el IFN- γ ha sido la más relacionada con la resistencia del huésped. El tratamiento de los ratones infectados con IFN- γ reduce la parasitemia y la mortalidad (Reed S., 1988) mientras que la administración de anticuerpos monoclonales anti-IFN- γ exacerba la infección (Torrice F. et al., 1991; Mc Cabe R. et al., 1991; Silva J.S. et al., 1992; Petray P. et al., 1993). Contrariamente, las linfoquinas IL-4, IL-10 y TGF- β pueden inhibir los efectos del IFN- γ durante la infección con T. cruzi, actuando como desactivadores de macrófagos (Silva J. et al.,

1991, 1992), inhibiendo la liberación de especies microbicidas (Sher A. et al., 1992; Gazzinelli R. et al., 1992) o interfiriendo en la expansión de clones TC1 (productores de IFN- γ y de IL-2) y la subsecuente secreción de citoquinas asociadas. Con respecto a este último punto la administración *in vivo* de TGF- β aumenta la susceptibilidad a la infección (Silva J. et al., 1991), mientras que la inoculación de anti-IL-4 modera la infección de ratones con cepas virulentas del T. cruzi (Petray P. et al., 1993).

Por otro lado, algunas de las actividades de la IL-1 pueden relacionarse con fenómenos patológicos; su capacidad para inducir un aumento de la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales vasculares en cultivo llevaría a un aumento en el tráfico de linfocitos y neutrófilos hacia los sitios de inflamación, lo que sería de particular importancia en la infección por T. cruzi dada la participación de mecanismos inmunológicos en la fisiopatogenia de la enfermedad crónica. Se ha visto que el cocultivo del T. cruzi con células mononucleares periféricas humanas induce la expresión de ARN mensajero para IL-1 β , detectándose además niveles considerables de IL-1 bioactiva en el sobrenadante de dicho cocultivo (Van Voorhis W. et al., 1992). Las células endoteliales humanas infectadas con el parásito a diferencia de las no infectadas, producen niveles significativos de IL-1 β (Tanowitz H.B. et al., 1992), capaz de inducir la expresión de ARN mensajero para IL-1 β , CSF-1 e IL-6 en células endoteliales (Mantovani A. et al., 1989). Por lo tanto, la expresión de IL-1 β proveniente de células endoteliales infectadas puede causar la producción adicional de citoquinas.

En diversas infecciones por protozoarios se han observado modificaciones en los niveles de IL-6 (Kern P. et al., 1989; Grau G.E. et al., 1990; Titus R. et al., 1992; Schlüter D. et al., 1993). En particular, la infección con T. cruzi *in vitro* de células endoteliales y monocitos adherentes infectadas con T. cruzi indujo la producción de IL-6 (Tanowitz H. et al., 1992; Van Voorhis, W., 1992). Por otro lado, los ratones infectados con T. cruzi gatillaron la producción endógena de IL-6 durante la fase ascendente de la parasitemia. Paradójicamente la inoculación de anticuerpos monoclonales anti IL-6 en ratones infectados aumentaron los niveles de IL-6 circulante, aumento transitorio que no modificó los niveles de anticuerpos anti-T. cruzi específicos como así tampoco el número de parásitos en sangre o tejidos ni el curso final de la infección, aunque retrasó la mortalidad de los ratones e indujo un aumento en los niveles del componente amiloide P del suero (SAP), proteína de fase aguda. Estos resultados sugieren que la IL-6, aunque no contribuiría en la eliminación del parásito, atenuaría el daño tisular subsecuente a la infección.

Por otro lado se ha presentado diversa evidencia que sostiene que la interacción célula-célula en la respuesta inmune es mediada por moléculas de adhesión expresadas tanto en las células del sistema inmune como en las células blanco. La adhesión depende de dos moléculas específicas y el control de la expresión y la reactividad de estas moléculas determina la adhesividad. El reclutamiento de leucocitos a los tejidos extravasculares, esencial para un

funcionamiento normal de los mecanismos de defensa, constituye un buen ejemplo del rol de las moléculas de adhesión.

La molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), ligando del antígeno asociado a linfocitos-1(LFA-1), es inducida por citoquinas en varias células blanco en los sitios de inflamación y tendría un rol importante en el reconocimiento, adhesión y citotoxicidad de los linfocitos asesinos (Krensky A.M. et al., 1984; Dustin M.L. et al., 1986,1988; Marlin S. & Springer T.A.,1987; Rothlein R. et al., 1988).

ICAM-1 es una glicoproteína perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa débilmente en células vasculares endoteliales, fibroblastos y células hematopoyéticas. Diversos estudios han mostrado que la expresión de ICAM-1 en diversos tipos celulares es fuertemente inducida, in vitro, por la acción de citoquinas (Dustin M.L. et al., 1986; Rothlein R. et al., 1988; Campbell I.L. et al., 1989; Griffiths C.E. et al., 1989) y en linfocitos activados y células no hematopoyéticas en el sitio de inflamación (Griffiths C.E. et al., 1989; Hale L.P. et al.,1989; Singer K. H. et al., 1989; Weetman A.P. et al.,1989; Griffiths C.E. & Nickoloff B.J. et al., 1989).

La molécula ICAM-1 ha sido identificada como ligando de la molécula LFA-1, una glicoproteína constituida por un heterodímero (CD11a / CD18) y que pertenece a la superfamilia de las integrinas. Se sabe que la molécula LFA-1 se encuentra ampliamente distribuida en leucocitos, incluyendo linfocitos B y T, células NK monocitos y granulocitos pero no en células no hematopoyéticas (Marlin S. & Springer T.A. et al., 1987). Los resultados de la inhibición del conjugado célula blanco-linfocito T citotóxico por anticuerpos monoclonales anti-ICAM-1 o anti-LFA-1 así como de la interacción y activación linfocito-linfocito sugieren fuertemente que la interacción ICAM-1/LFA-1 juega un rol central en el reclutamiento, activación y actividad citotóxica sobre células blanco (Krensky A.M. et al., 1983, 1984).

Creciente evidencia relaciona la expresión de ICAM-1 con procesos inflamatorios y fisiopatogénicos del miocardio. En particular se ha visto que en la miocarditis inducida en ratón por la infección con el virus Coxsackie B3 se encontraba aumentada la expresión de ICAM-1 en células de miocardio y su expresión podía ser inducida in vitro por efecto de IFN- γ y TNF- α mientras que el tratamiento in vivo con AcMo anti-ICAM-1 reducía significativamente la inflamación inducida por el virus (Seko Y. et al., 1993). Estos resultados sugieren que la expresión de ICAM-1 jugaría un rol en la inducción del daño del miocardio causado principalmente por fenómenos autoinmunes. Por otro lado Toyosaki (1993) ha demostrado que ICAM-1 se expresa en miocardiocitos de pacientes con miocardiopatía activa pero no en los que la resolvían por tratamiento inmunosupresor.

A fin de investigar el rol de ICAM-1 en la infección por T. cruzi, en este trabajo estudiamos la cinética de acumulación de ARNm para citoquinas e ICAM-1 en células de bazo (B) y corazón (C) de ratones infectados con parásitos de las cepas Tulahuén y CA-1 del T. cruzi.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó la técnica de amplificación en cadena (PCR) cualitativa para determinar la producción de un producto determinado, y competitivo para cuantificar los niveles producidos de los mismos.

7.1. Ratones y parásitos.

Grupos de ratones Balb/c hembras fueron inoculados intraperitonealmente con 50 tripomastigotes de la cepa Tulahuén del *T.cruzi* o con 10^4 tripomastigotes de la cepa CA-1. Los parásitos provenientes de la cepa Tulahuén infectan células reticuloendoteliales y son altamente virulentas para los ratones (Taliaferro W. & Pizzi T., 1955). La cepa CA-1, aislada de un paciente con miocardiopatía chagásica crónica, es miotrópica y menos virulenta (González Cappa S.M. et al., 1980; Leo O. et al., 1987).

7.2. Aislamiento y purificación de ARNm.

A las semanas 0, 1, 3, 5 y >9 post-infección los animales fueron sacrificados y se les extrajo el bazo y el corazón. Los tejidos fueron homogeneizados en solución D (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM, sarcosil 0.5% y 2ME 0.1%).

Del corazón, previamente lavado exhaustivamente con PBS 1x para eliminar células provenientes de sangre periférica, y del bazo se extrajo ARNm total con fenol-cloroformo según Chomczynski & Sacchi (1987). El ARN fue resuspendido en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato, SIGMA) y se midió en el espectrofotómetro a 260nm.

Para comprobar si la concentración había sido correctamente determinada y verificar que el ARN no se haya degradado durante el tratamiento, las muestras de ARN purificado fueron sometidas a electroforesis (1µg/línea) en gel de agarosa 1% conteniendo bromuro de etidio.

7.3. Reacción de transcripción reversa.

La transcripción reversa fue llevada a cabo en un volumen final de 20µl conteniendo; 1) 4µl de buffer de transcripción reversa 5x (laboratorio BRL); 2) 1.5 µl dietiltreitol (100mM); 3) 2 µl de una mezcla conteniendo los cuatro deoxinucleótidos trifosfato (5mM cada uno); 4) 0.5 µl ARNasin (40 U/µl); 5) 1 µl de "primers" hexámeros al azar (1mM); 6) 1µl transcriptasa reversa (200 U/µl) y 7) 10 µl de ARNm previamente desnaturalizado por calentamiento a 90°C durante 5 min.

7.4. Reacción de amplificación en cadena (PCR cualitativo)

Para estos ensayos se utilizaron muestras de ADNc provenientes de ratones individuales.

Los "primers" utilizados se detallan en la Tabla 7.1. A 10 µl de la dilución correspondiente de ADNc se le agregaron 11.1µl de una mezcla conteniendo:

1) 100 μ l de buffer para PCR (BRL); 2) 37 μ l de deoxinucleótidos trifosfato (1.25mM); 3) 212 μ l de agua bidestilada y doblemente autoclavada; 4) 5 μ l de Taq polimerasa (5 U/ μ l); 5) 100 μ l de "primer" complementario a la cadena en el sentido 5',3' (5 μ M) y 6) 100 μ l de "primer" complementario a la cadena antisentido 3',5'.

• La reacción se llevó a cabo como sigue: 1) desnaturalización: 95°C, 1 min ; 2) apareamiento de los "primers": 58-60.5 °C (dependiendo de la IL ensayada) durante 1 min; 3) extensión de los "primers": 72°C, 3 min. Para cada producto génico, se determinó experimentalmente el número óptimo de ciclos, y se definió como el número de ciclos que aseguraran una concentración detectable que estuviese por debajo de las condiciones saturantes. Por otro lado para verificar que se haya agregado ARNm en igual cantidad en cada reacción de PCR dentro de un experimento se usaron "primers" para amplificar ADNc de genes que se expresen constitutivamente, β -Actina ensayado en las mismas condiciones que para las citoquinas.

7.5. Reacción de amplificación en cadena (PCR cuantitativo)

Se utilizaron diluciones de una cantidad conocida de un "primer" competidor con el "primer" específico y una cantidad fija del ADNc a ser amplificado, de manera tal que a la dilución en que ambos productos se producen en iguales cantidades podemos determinar la cantidad del producto deseado.

En nuestros experimentos se partió de concentraciones de "primers" competidores en un rango de 1/3 y 1/5 10^{-4} atomoles/ μ l de solución, de acuerdo al producto ensayado, y realizando 5 diluciones seriadas al tercio. La concentración adecuada de cada "primer" competidor fue determinada experimentalmente ensayando diluciones seriadas en un amplio rango. El ADNc se utilizó en una dilución fija de 1/40. La reacción se llevó a cabo agregando a 11.1 μ l de la mezcla para reacción de PCR, 7.2 μ l de ADN y 2 μ l de la dilución correspondiente de competidor. Las condiciones del ensayo fueron las mismas que para PCR cualitativo. En estos experimentos se utilizaron pools de ADNc provenientes de órganos de ratones a distintos tiempos post-infección.

7.6. Detección de los productos amplificados.

Los productos provenientes de las reacciones por PCR fueron separados en geles de agarosa 2%, conteniendo bromuro de etidio, observados bajo luz U.V. y fotografiados. Se corrieron en paralelo marcadores de peso molecular conocido.

7.7. Cálculos para la cuantificación de productos provenientes de PCR competitivo

Se realizó el "scanning" de las bandas obtenidas con un densitómetro. Se calculó para cada producto ensayado a una dada dilución de competidor la razón entre la DO del producto específico y el producto competidor. Se graficó razón vs concentración de competidor. La interpolación donde la razón es igual a 1 nos da la cantidad del producto deseado. La expresión final es en moles del producto ensayado en cada caso por mol de β -Actina.

RESULTADOS y DISCUSION

Acumulación de ARNm para citoquinas e ICAM-1

Los resultados obtenidos con el PCR cualitativo mostraron que en los ratones infectados con la cepa Tulahuén la acumulación de ARNm para citoquinas aumenta a partir de la semana 3^o/5^o post-infección con un posterior descenso en etapas tardías de la infección tanto en B como en C. Mientras que en los ratones infectados con la cepa CA-1 se observó un aumento a partir de la semana 3^o post-infección que, en B se conservó en estadíos posteriores de infección mientras que en C disminuyó (Figura 7.1).

Los resultados obtenidos con el PCR cuantitativo no sólo confirmaron los resultados obtenidos con el PCR cualitativo sino que además nos permitieron determinar aproximadamente los niveles de producción de mensajero para las distintas citoquinas y por lo tanto determinar con mayor detalle la cinética de las mismas a lo largo de la infección.

Los ratones infectados con la cepa Tulahuén no mostraron diferencias de expresión entre ambos órganos, evidenciándose una cinética de fase aguda con un máximo nivel en las semanas 3^o y/o 5^o post-infección (desde >3-TNF α en B- a más de 70 -IL-6 en C- veces el nivel basal) y un posterior descenso a los niveles basales en la etapas posteriores de la infección. Los ratones infectados con la cepa CA-1 mostraron un aumento a partir de la semana 5^o post-infección, que en B continuaba aumentando a medida que se avanzaba hacia la etapa crónica mientras que en C disminuía progresivamente. La Figura 7.3 compara las cinéticas entre ambas cepas y la Figura 7.4 entre ambos órganos.

Cabe destacar que con la cepa CA-1 se detectaron niveles mayores de producción, excepto para la IL-1 α donde los mayores niveles se obtuvieron con la cepa Tulahuén.

Los niveles de ARNm para ICAM-1 aumentaron a partir de la 3^o semana pi y se mantuvieron elevados en estadíos posteriores de la infección tanto en B como en C y con ambas cepas (Figura 7.5).

CONCLUSIONES

El bazo y el corazón de los ratones infectados con la cepa Tulahuén no presentaron diferencias de acumulación de ARNm para citoquinas, observándose una cinética de fase aguda que alcanza su máximo nivel en las semanas 3^o y/o 5^o post-infección y disminuye significativamente en estadíos posteriores de la infección. En cambio, los ratones infectados con la cepa CA-1 presentan un nivel máximo de acumulación de ARNm para citoquinas en la semana 5^o, mientras que a medida que se avanza en la infección dichos niveles aumentan en B y disminuyen en C, aunque no al mismo nivel que en el C de ratones infectados con la cepa Tulahuén.

No existe relación directa entre las cinéticas obtenidas para cada cepa y el tropismo de las mismas (reticulotrópica para CA-1 y miotrópica para Tulahuén), ni entre los niveles de ARNm para citoquinas y el número de parásitos circulantes (la curva de parasitemia para la cepa Tulahuén presenta un pico en la semana 3^o post-infección significativamente mayor que el alcanzado con la cepa CA-1 y luego disminuye abruptamente no encontrándose parásitos, a niveles detectables, a los 3 meses post-infección mientras que con la cepa CA-1 todavía se encuentra bajo número de parásitos a los 4 meses post-infección; datos no mostrados).

Los cambios en los niveles de ARNm para citoquinas encontrados en el bazo y el corazón de ratones infectados con parásitos de dos cepas de T. cruzi con diferente conducta biológica permiten especular sobre la relevancia de estas citoquinas en la infección.

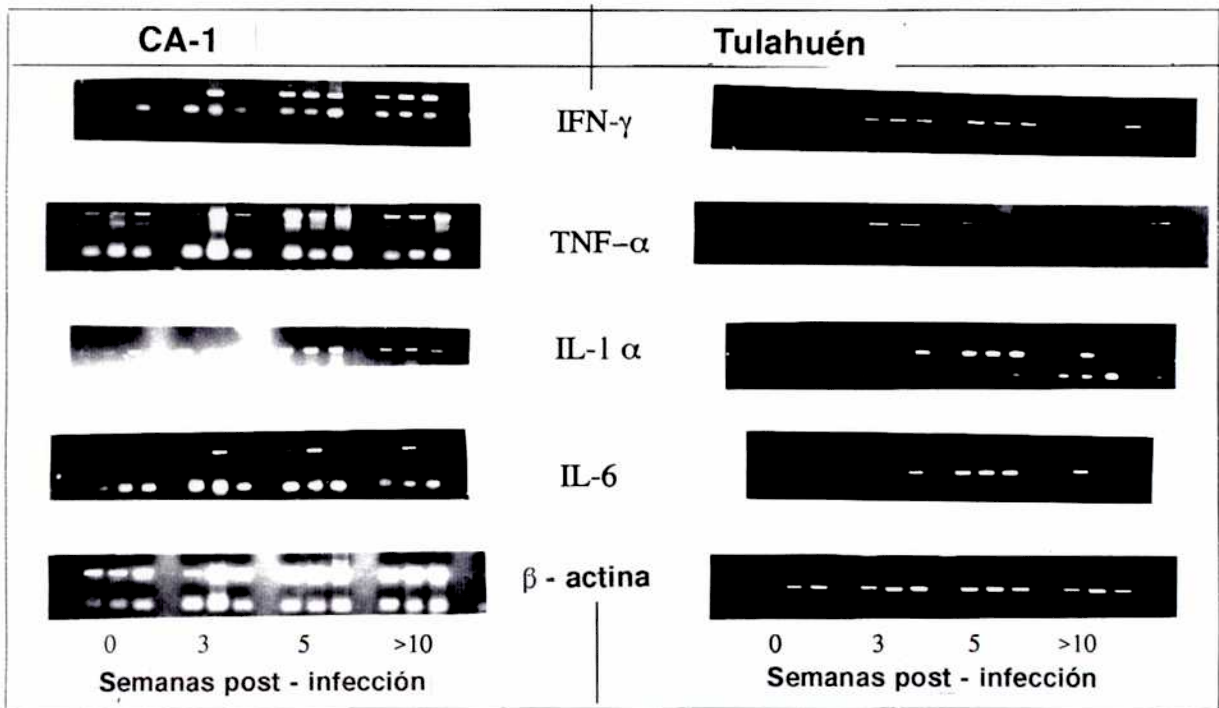
Está claro que la infección con T. cruzi induce en el huésped la producción de citoquinas, y que estas estarían involucradas tanto en la protección como en la patogénesis. Varios son los mecanismos posibles por los que las citoquinas podrían mediar la inducción de patología: actividad quimiotáctica, inducción de la expresión de antígenos de clase II, aumento de la concentración de calcio intracelular en miocardiocitos en cultivo o alteraciones en la contractilidad, generación de especies reactivas de oxígeno o lipoperoxidación de membranas, generación de especies reactivas de nitrógeno, inhibición de enzimas mitocondriales e inducción de apoptosis, alteración de la función de inervación autonómica, posibilidades todas ellas que deben ser investigadas.

Por otro lado, estos resultados sugieren la relevancia de continuar los estudios sobre la molécula ICAM-1 no sólo en lo relacionado en su inducción en fase aguda, (tal vez dada por citoquinas) sino también con su persistencia (quizás dada por la unión a su ligando, bajas concentraciones de citoquinas o factores desconocidos), y en la relación citoquinas/ patología.

En síntesis, se demostró que la infección experimental con T. cruzi induce en espleno- y cardiocitos la acumulación de ARNm para citoquinas, con una cinética dependiente de la naturaleza de los parásitos infectantes y/o del órgano investigado, mientras que la molécula de adhesión ICAM-1, mostró una cinética indiferente a estas variables lo cual permite considerarla un potencial marcador de daño histológico.

Figura 7.1. Acumulación de ARNm para IFN γ , TNF α , IL-1 α e IL-6 en bazo (A) y corazón (B) de ratones infectados con las cepas Tulahuén o CA-1 del T. cruzi. Como control de expresión constitutiva se amplificó en paralelo el ADNc del gen que codifica para β -Actina.

A



B

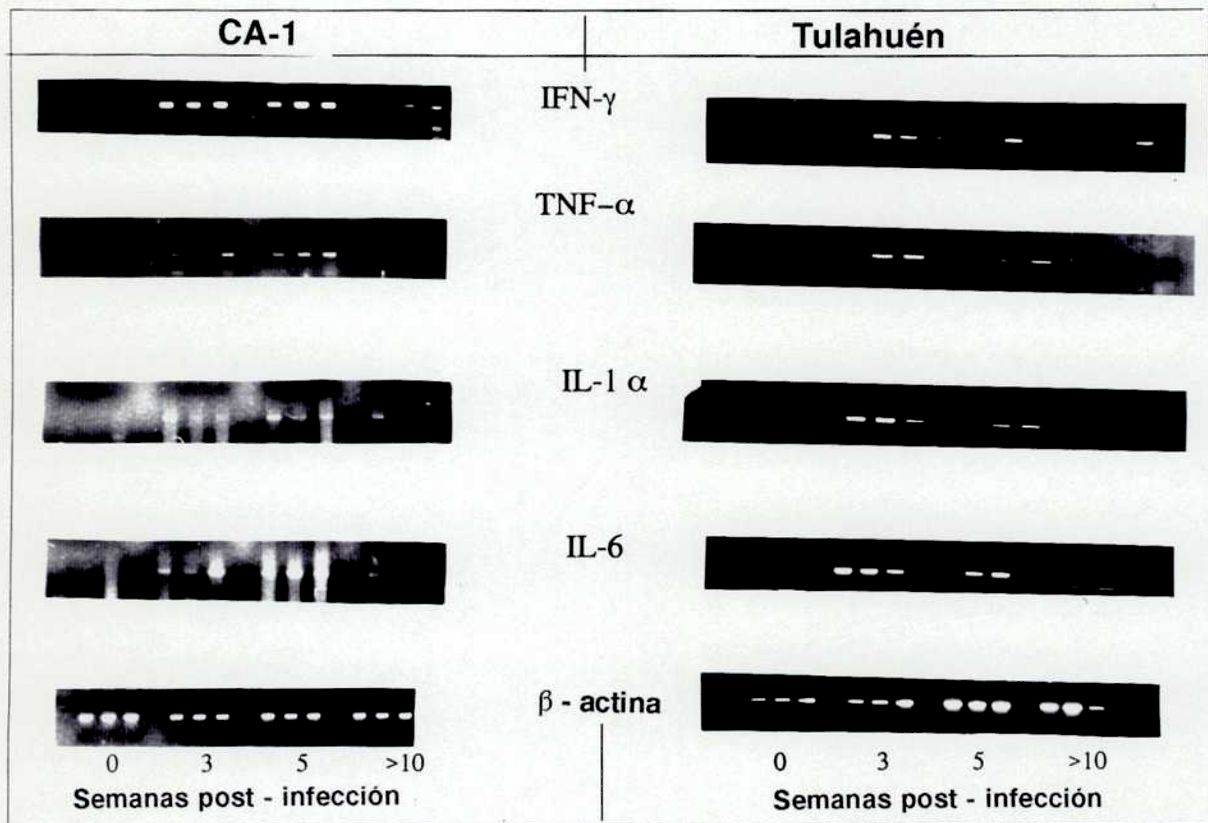


Figura 7.2. Acumulación de ARNm para ICAM-1 en el bazo y corazón de ratones infectados con las cepas Tulahuén y CA-1 de T. cruzi.

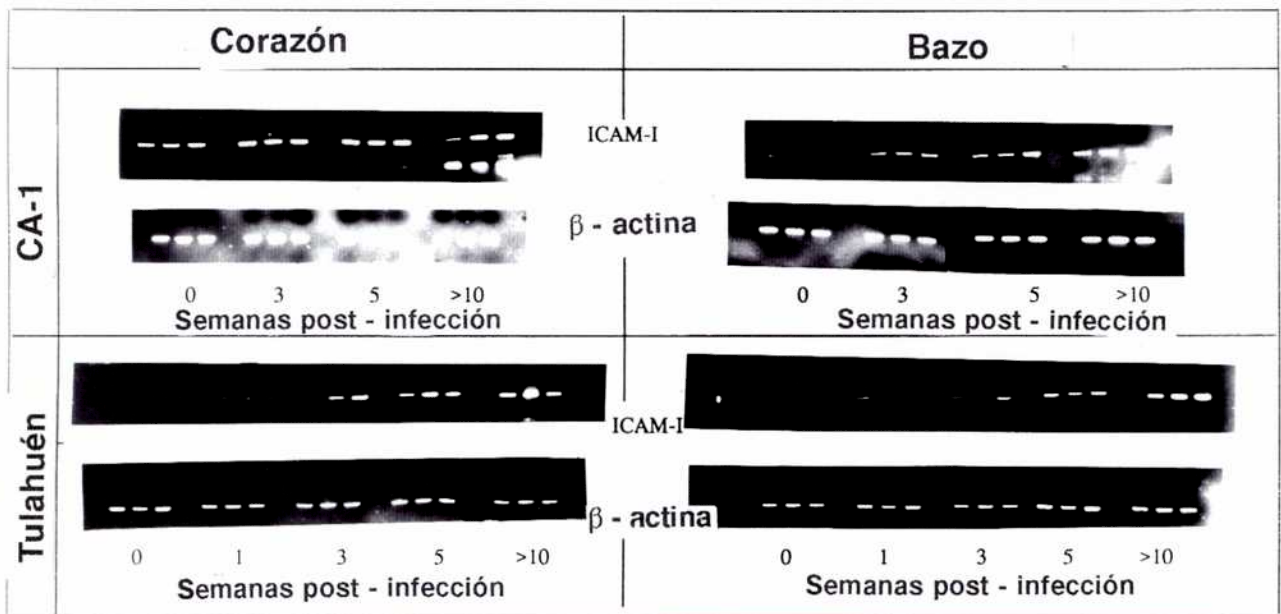
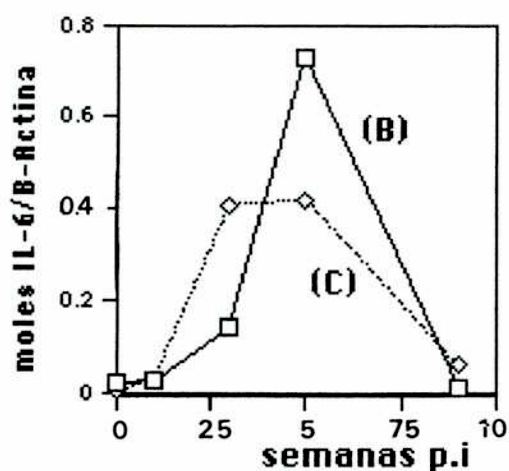
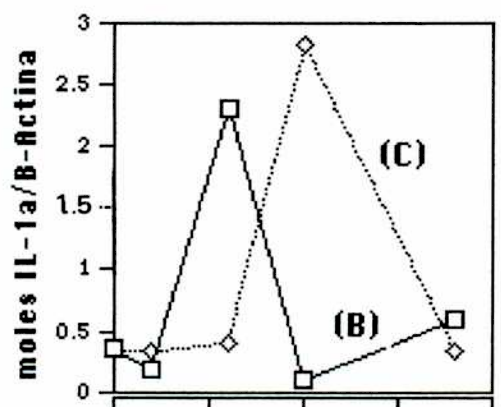
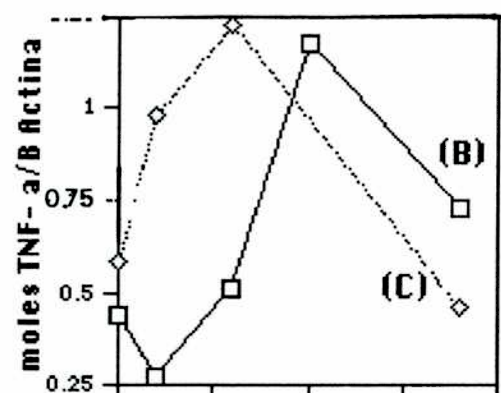
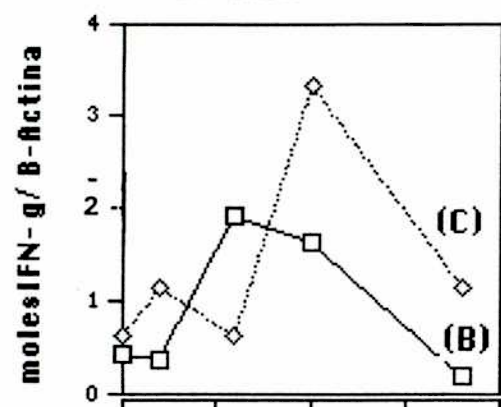


Figura 7.3. Cinética de la acumulación de ARNm para IFN γ , TNF α , IL-1 α e IL-6 en bazo y corazón de ratones infectados con las cepas Tulahuén o CA-1 del T. cruzi. Los productos amplificados se expresan como moles de IL/mol de β -Actina.

TULAHUEN



CA-1

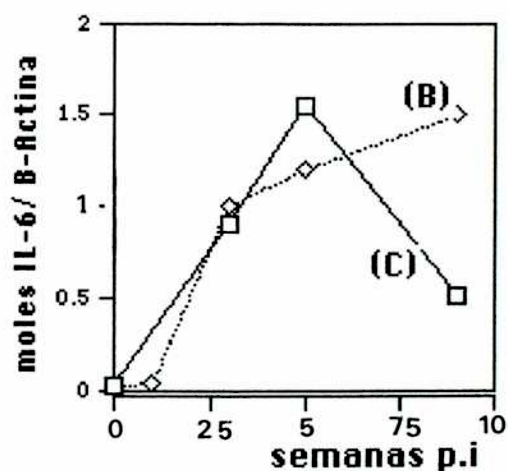
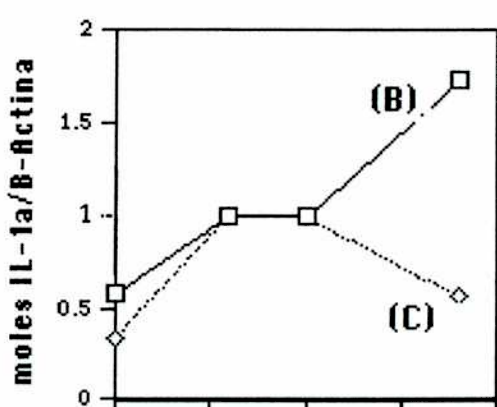
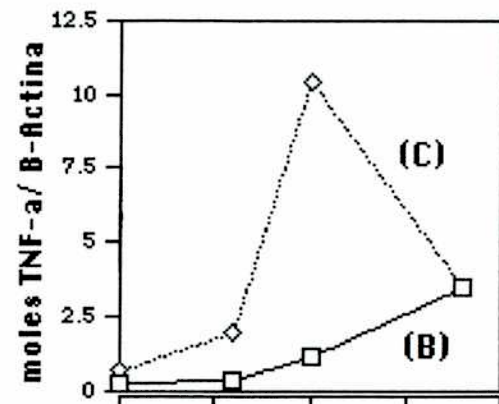
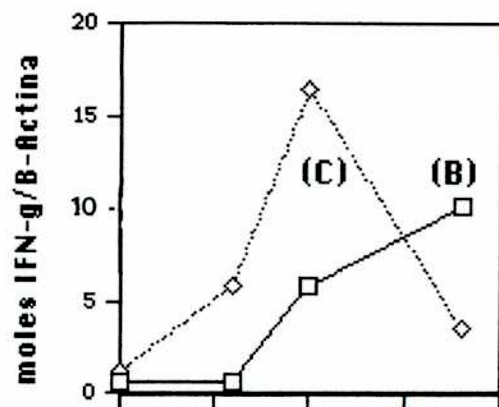
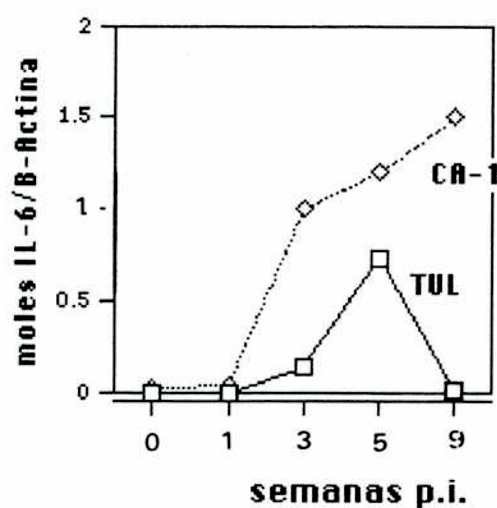
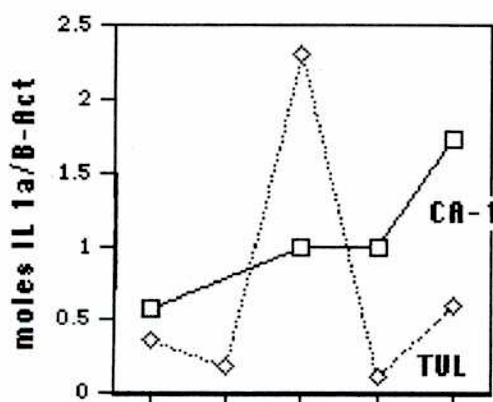
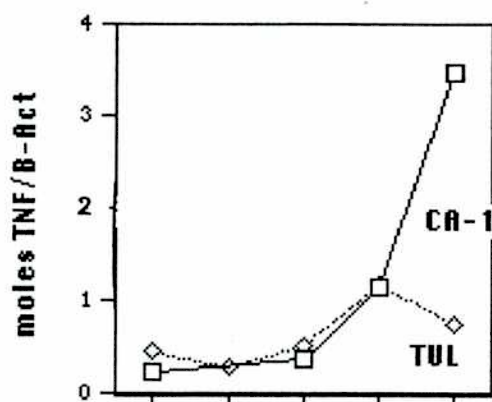
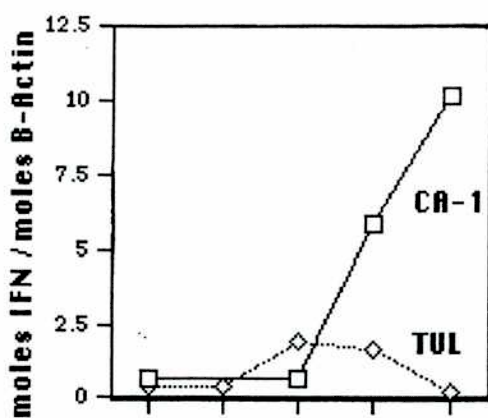


Figura7.4. Cinética de la acumulación de ARNm para IFN γ , TNF α , IL-1 α e IL-6 en bazo y corazón de ratones infectados con las cepas Tulahuén o CA-1 del I. cruzi. Los productos amplificados se expresan como moles de IL/mol de β -Actina.

BAZO



CORAZON

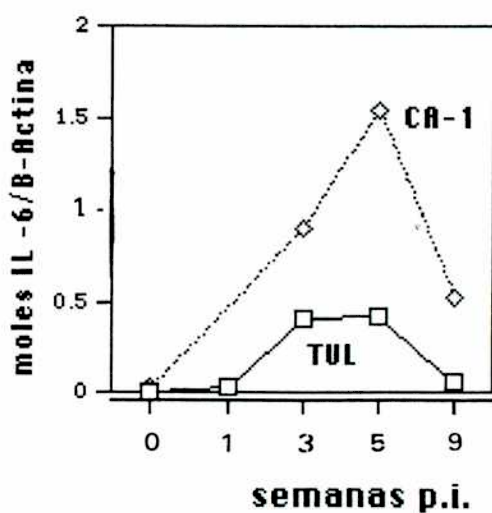
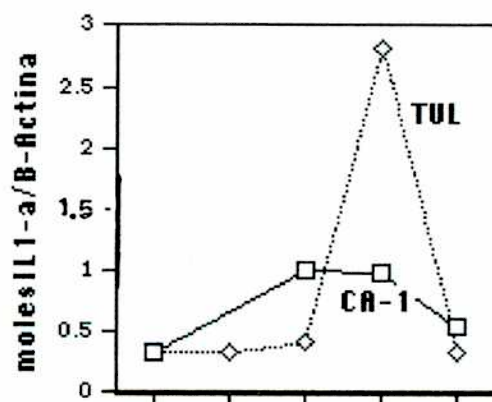
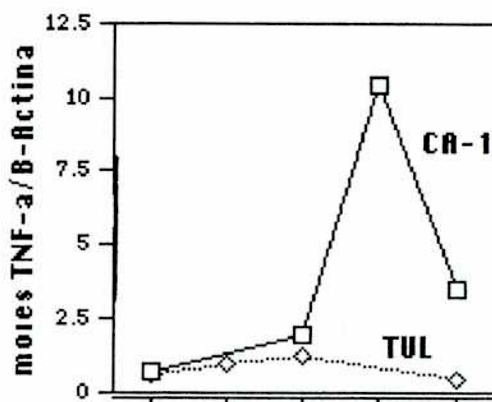
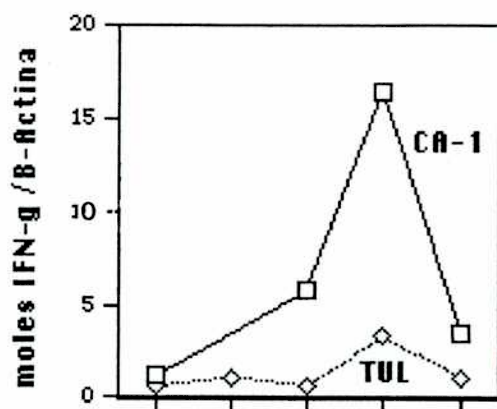


Tabla 7.1
Secuencias de los "primers" utilizados en la amplificación de
ADNc para citoquinas e ICAM-1

Citoquina	Primer sentido y antisentido	Tamaño del producto amplificado
IFN- γ	5' AAC GCT ACA CAC TGC ATC TTG G 3' 5' GAC TTC AAA GAG TCT GAG G 3'	248 pb
β - actina	5' GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA 3' 5' CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC 3'	540 pb
TNF- α	5' ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC CGC 3' 5' CC AAA GTA GAC CTG CCC GGA CTC 3'	692 pb
IL-1- α	5' ATG GCC AAA GTT CCT GAC TTG TTT 3' 5' C CTT CAG CAA CAC GGG CTG GTC 3'	625 pb
IL-6	5' ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA GAC T 3' 5' CA CTA GGT TTG CCG AGT AGA TCT C 3'	638 pb
ICAM-1	5' GAT GCT CAG GTA TCC ATC CAT C 3' 5' CAC CGGT GAA TGT GAT CTC CTT G 3'	22 pb

CAPITULO VIII

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ANTÍGENOS
DEI TRYPANOSOMA CRUZI.

Desde su descubrimiento el Trypanosoma cruzi, un protozoo ubicuo en la naturaleza ha emergido como agente causal de enfermedad en una fracción importante de la población rural del continente americano. Más recientemente, la migración de poblaciones rurales a las ciudades, la generalización de las transfusiones sanguíneas y los progresos en la cirugía de transplante de órganos han llevado el riesgo de infección al medio urbano generalizando la Enfermedad de Chagas como problema sanitario.

La infección aguda con el T. cruzi, que puede resultar de la transmisión vectorial, sanguínea o connatal, la activación de infecciones crónicas por depresión del sistema inmune, conlleva un importante riesgo de muerte. Sin embargo, y aunque las características geográficas, sanitarias y socioeconómicas del medio rural latinoamericano hacen difícil la elaboración de estadísticas certeras, la parte más importante del problema, no es la ahora controlable infección aguda sino la forma crónica de la Enfermedad de Chagas, no sólo porque afecta negativamente la calidad de vida sino también porque la incapacidad parcial de los pacientes crónicos tiene un alto costo económico para el conjunto de la sociedad, tanto en atención sanitaria como en discapacidad laboral.

En los últimos años se han realizado significativos avances hacia la identificación de estructuras del T. cruzi capaces de inducir inmunoprotección específica. Sin embargo, todavía estamos lejos de contar con un agente inmunizante seguro. Más aún, resta por demostrarse acabadamente que la protección contra la infección aguda prevenga el desarrollo de los mecanismos fisiopatológicos de lesión tisular que resultan en la forma crónica de la enfermedad.

Aunque la patogénesis de la cardiopatía chagásica no está clara, se acepta que resultaría de mecanismos inmunológicos gatillados, aunque no necesariamente mantenidos, por la infección parasitaria. Este concepto está apoyado por diversa evidencia confluyente, tal como: el largo lapso que va desde la infección a la aparición de síntomas, la presencia de células mononucleares en los infiltrados inflamatorios de las lesiones crónicas con la aparente independencia de la presencia de parásitos, y la demostración microscópica de que los linfocitos infiltrantes pueden adherir, penetrar y aún lisar células del músculo cardíaco.

Distintos autores han presentado evidencia que asocia la actividad de antígenos del T. cruzi con la inducción de daño tisular en modelos experimentales de la enfermedad. Los trabajos realizados en el INDIECH durante los últimos años han permitido demostrar que el desarrollo de la patología tisular característica de la forma crónica de la enfermedad puede ser asociado con la actividad de algunas fracciones subcelulares del parásito. El empleo de estas fracciones para estudiar la respuesta inmune celular y humoral de los pacientes chagásicos permitió correlacionar la inmunorreactividad a ciertos componentes del parásito con la presencia de manifestaciones clínicas características de la forma crónica de la Enfermedad de Chagas. En particular, la fracción microsomal (Mc) estimuló la proliferación de linfocitos periféricos de enfermos chagásicos con mayor especificidad que cualquier otra fracción ensayada; aunque sin relación con el grado de compromiso cardíaco, mientras una mayor proporción de cardiopatas

chagásicos que de pacientes asintomáticos reaccionó con componentes citoplasmáticos (CS) del parásito. Posteriormente se mostró que el contenido de anticuerpos séricos contra Mc, pero no contra otras fracciones del parásito, es significativamente mayor en los cardiopatas chagásicos que en los pacientes asintomáticos. Más recientemente, se demostró que el diferente reconocimiento de los antígenos de Mc por los PChCr con cardiopatía y sin evidencia de compromiso cardíaco se apoyaba en una reactividad preferencial con polipéptidos con PM \geq 50 kDa contenidos en Mc. Estos resultados, tomados en conjunto, sugirieron una diferente regulación de la respuesta inmune en pacientes asintomáticos y sintomáticos.

Estudios preliminares para identificar los componentes de Mc responsables de efectos patológicos fueron llevados adelante en el INDIECH a través del subfraccionamiento de Mc empleando gradientes de densidad. Estas subfracciones fueron estudiadas por microscopía electrónica, se determinó su contenido de ADN y ARN, y su composición polipeptídica por electroforesis en geles de poliacrilamida. Cuando fueron inoculadas en ratones endocriados CFW de 3 semanas de edad el 55% de los ratones inoculados con la subfracción enriquecida en ARN, ribosomas y polirribosomas, presentaron ECG anormal en ausencia de parásitos, mientras que en los ratones inoculados con la subfracción enriquecida en ADN y vesículas y libre de membranas, presentaron mayor prevalencia de miocarditis pero no alteraciones en la transmisión del impulso nervioso (Esteve M. et al. resultados no publicados).

Estos resultados confirmaron que la inoculación de Mc induce miocarditis y ofrecieron un camino para identificar aquellos componentes del parásito involucrados en el daño tisular.

SINTESIS DE LA LABOR DESARROLLADA

De acuerdo a los objetivos planteados en este trabajo, hemos investigado la asociación entre componentes subcelulares del parásito con el gatillado y/o desarrollo del daño tisular en la forma crónica de la Enfermedad de Chagas.

Nuestro primer paso fue investigar los componentes de la fracción CS responsables de la respuesta inmune humoral en los PChCr y en particular, identificar aquellos que pudieren ser reconocidos exclusivamente por los PChCr con cardiopatía severa. Para ello CS fue separada empleando geles de poliacrilamida, transferencia a hojas de nitrocelulosa y enfrentada con sueros de PChCr en distintos estadios clínicos. Estos estudios revelaron 32 componentes proteicos con PM entre 88 y 15 kDa, 30 de los cuales junto a 1 no visible por tinción para proteínas fueron reconocidos por al menos 1 de los 36 sueros ensayados, cada uno de los cuales reconoció entre 4 y 20 (media=12.6) bandas en CS. Si bien no pudo determinarse un perfil de reconocimiento particular para los PChCr con distinto compromiso clínico, se observó que el 75 % de los sueros reconocía 2 polipéptidos con PM aparente de 52 y 42/42 kDa.

En un segundo momento intentamos una caracterización química inicial de las estructuras peptídicas antigénicas de CS y Mc. El tratamiento con ácido periódico disminuyó significativamente la reactividad de los sueros contra ambas fracciones, indicando el rol central de los carbohidratos en su antigenicidad. El tratamiento de CS con tripsina eliminó prácticamente toda la reactividad con los sueros de PChCr. El calentamiento y la reducción con 2 ME aunque también redujeron la capacidad total de unión de los anticuerpos hacia CS y Mc, el efecto fue más pronunciado para Mc. Sin embargo estos estudios revelaron que el antígeno calentado y reducido se resuelve en un mayor número de polipéptidos que el antígeno nativo, o solamente calentado o reducido.

Con el objetivo de purificar antígenos relevantes se produjeron AcMo contra Mc. La reactividad anti-Mc y anti-CS de dichos AcMo fue evaluada empleando técnicas de ELISA, dot blotting (DB) e inmunoblotting (WB). Se seleccionaron así 45 hibridomas reactivos con Mc (28), Mc y CS (14) y CS (3). Entre los hibridomas productores de anticuerpos capaces de reconocer en Mc al menos un polipéptido con PM aparente mayor o igual a 50 kDa se seleccionaron 4 para su clonado. De estos 4 AcMo, todos del tipo IgM, fue posible aislar un total de 24 clones: 3 a partir del hibridoma 1A10, 12 a partir de 1D10, 2 a partir de 3C4 y 7 a partir de 2E9, la mayoría de los cuales se mostró reactivo con varios polipéptidos (3 a 9) en el mismo gel. Si bien el rendimiento de los procesos de clonado fue diverso, de 2 a 23 clones productores de AcMo reactivos con Mc según el hibridoma de partida, la eficacia del clonado fue buena: en 3 de los 4 casos fue posible identificar y aislar clones productores de Ac reactivos con polipéptidos del tamaño buscado, y en todos estos casos con reactividad más restringida que la del hibridoma original.

A fin de investigar la presencia de determinantes antigénicos comunes al I. cruzi y a tejidos humanos se estudió la reactividad de los AcMo con muestras de tejidos humanos, obtenidas a partir de dadores cadavéricos no chagásicos, libres

de enfermedades autoinmunes, coronarias y tumorales. Empleando ensayos de DB se estudió la reactividad anti-miocardio (MIO) y anti-músculo esquelético (MES) de 52 sobrenadantes de hibridomas reactivos con Mc y/o CS y 11 sobrenadantes negativos con ambas fracciones. En este primer estudio 27 de los 52 sobrenadantes de hibridomas reactivos con Mc y/o CS resultaron reactivos con MIO y/o MES. Con el propósito de establecer el perfil polipeptídico de MIO y MES humano ambos homogenatos fueron separados utilizando geles desnaturalizantes de poliacrilamida y transferidos a nitrocelulosa. Una porción de la misma se coloreó con Negro de Amido para evidenciar proteínas y la otra porción se aplicó a la determinación de glicoproteínas con Concanavalina A, para identificar residuos hidrocarbonados ricos en manosa y glucosa. MIO presentó 25 polipéptidos en el rango 79-15 kDa, 6 de los cuales contenían residuos azucarados, mientras MES reveló 24 bandas polipeptídicas, 7 de las cuales contenían hidratos de carbono. Una vez definido el perfil de MIO y MES se realizaron ensayos de WB para identificar los polipéptidos reconocidos por los AcMo en ellos.

La fracción Mc es obtenida a partir de parásitos cultivados en un medio no definido que contiene homogeneizado de corazón bovino (TCM). Es entonces posible que componentes del medio de cultivo acompañen la purificación y hayan "ensuciado" la producción y selección de los AcMo, que así podrían incluir anticuerpos específicos para corazón bovino capaces de dar reacción cruzada con miocardio humano. A fin de investigar esta posibilidad se determinó en primer lugar la reactividad de dichos AcMo contra TCM y en aquellos casos donde esta fue encontrada se realizaron experimentos de absorción cuyos resultados demostraron que sí bien para algunos AcMo existe reactividad cruzada entre Mc y TCM, la reactividad de los mismos hacia TCM es despreciable frente a la reactividad hacia Mc.

Con el propósito de determinar no sólo la presencia sino también la localización subcelular de los antígenos de MIO y MES humano reconocidos por los AcMo anti-Mc se realizaron experimentos de inmunohistoquímica. Además se evaluó la especificidad de huésped y tejido empleando tejidos humanos y de hamster. En particular los AcMo ensayados (1A10C11, 1F3G2, 5A9B11 y 5F2) reconocieron estructuras en el MES humano y en MIO humano y de hamster. En todos los casos los AcMo se unen a antígenos intracitoplasmáticos, y en algunos casos (5A9B11 y 5F2) también a antígenos de la capa muscular de los vasos.

El hecho de haber demostrado reactividad contra MIO de hamster dejó abierta la posibilidad de estudiar la actividad biológica de los mismos en modelos experimentales y por lo tanto consideramos importante estudiar el grado de homología entre los componentes del miocardio de distintos mamíferos. El perfil polipeptídico obtenido por la separación electroforética de homogenatos de MIO mostró un importante grado de homología entre especies.

Por otro lado la realización de ensayos de Inmunofluorescencia sobre parásitos fijados mostró que los epitopos reconocidos por los AcMo, a pesar de pertenecer originalmente a una fracción interna del parásito, están también representados en la superficie y/o el flagelo del mismo. Otros estudios de

caracterización de los AcMo anti-Mc revelaron que gran parte de los epitopos reconocidos por los mismos son al menos parcialmente de naturaleza glucídica. En particular entre los AcMo con reactividad cruzada dos (1A10C11 y 1F3G2) reconocen parcialmente epitopos de naturaleza glucídica mientras en los dos restantes (5A9B11 y 5F2) los residuos hidrocarbonados no forman parte del sitio reconocido.

Para determinar si los epitopos con reactividad cruzada eran reconocidos por los PChCr y evaluar se ello tiene alguna importancia desde el punto de vista biológico, se realizaron ensayos de inhibición. La capacidad para inmunoinhibir la reacción del AcMo 5F2 con Mc fue significativamente mayor entre los sueros de PChCr que en los controles. Más aún, 5F2 fue capaz de diferenciar a la población de PChCr sin compromiso cardíaco, o con grado mínimo, de la de PChCr con compromiso cardíaco. Es también interesante destacar que la capacidad para inmunoinhibir la reacción de 5F2 resultó entre sueros de PChCr sin compromiso cardíaco directamente proporcional a la edad de los pacientes. El AcMo 5A9B11 también fue capaz de separar la población de PChCr de la de los controles. Más aún, los epitopos del 5A9B11 fueron reconocidos en distinta medida por los PChCr sin compromiso cardíaco, definiéndose dos poblaciones con baja y alta capacidad de inmunoinhibición respectivamente.

Por último, y atendiendo al rol central que las citoquinas y las moléculas de adhesión celular tienen en la modulación de la respuesta inmune, tanto en su faz protectora como en su potencial faz autoagresiva, en este trabajo estudiamos la cinética de expresión endógena de genes para citoquinas e ICAM-1 en células de bazo (B) y corazón (C) de ratones infectados con las cepas Tulahuén y CA-1 del parásito. Luego de obtener el ARN y ADNc a partir de homogenatos de B y C se realizaron ensayos de PCR cuali y cuantitativo usando "primers" y/o competidores específicos para IFN γ , TNF α , IL α , IL-6 e ICAM-1, encontrándose que la infección por el parásito va acompañada por un claro aumento en los niveles intracelulares de precursores para citoquinas e ICAM-1, aunque la cinética depende del órgano estudiado y de la naturaleza de los parásitos infectantes.

CONCLUSIONES DEL TRABAJO

Hemos estudiado desde el punto de vista inmunoquímico las fracciones Mc y CS del T. cruzi. Ambas fracciones, capaces de inducir daño tisular en huéspedes no infectados, mostraron una importante capacidad inmunogénica. El estudio inmunoquímico de ambas fracciones permitió no sólo identificar los componentes hacia los cuales se produce la respuesta humoral en los PChCr sino identificar además parcialmente la naturaleza química de dichos epitopos. Se han identificado algunos componentes preferentemente reconocidos por los PChCr con compromiso cardíaco severo, abriendo así la posibilidad de identificar marcadores de patología.

Sin embargo los resultados más alentadores para la identificación de marcadores de daño tisular provienen del estudio con AcMo anti-Mc. La inmunización de ratones con la fracción Mc de epimastigotes de T. cruzi, permitió producir AcMo capaces de reconocer estructuras contenidas no sólo en Mc sino también en la fracción soluble del parásito, en el músculo esquelético humano y en miocardio humano, de hamster y de ratón. Estos resultados constituyen clara evidencia para justificar la existencia de fenómenos de mimetismo molecular en la Enfermedad de Chagas. Sin embargo uno de los puntos más controvertidos al respecto ha sido la falta de demostración de que el mimetismo molecular sea causa de la patogénesis chagásica, no conociéndose evidencia mostrando que moléculas con reactividad cruzada y reconocidas por anticuerpos séricos sean blanco de respuestas autoinmunes.

Los resultados de nuestro estudio acercan una respuesta a esta objeción: los antígenos con reactividad cruzada provienen de una fracción celular capaz de producir patología. Los AcMo 5F2 y 5A9B11 reconocen epitopos también reconocidos por los sueros de los pacientes chagásicos crónicos. Además ambos AcMo permitieron poner en evidencia la heterogeneidad de la respuesta inmunológica hacia los epitopos del parásito y la existencia de diferencias significativas según el grado de evolución de la enfermedad. Aunque es prematuro aventurar una explicación última para estos resultados, debe destacarse que el AcMo 5F2 reconoce algún epitopo presente en Mc hacia el cual los PChCr asintomáticos tienen anticuerpos cuya concentración crece con la edad, mientras el AcMo 5A9B11 parece capaz de distinguir entre dos subpoblaciones de pacientes asintomáticos no relacionados con la edad: parte de los pacientes se comportan, en este aspecto, como aquellos con manifiesto compromiso cardíaco. Estos resultados sugieren más fuertemente que estemos en presencia de marcadores pronósticos de la enfermedad que de marcadores de morbilidad.

También demostramos que la infección experimental con el T. cruzi induce en espleno- y cardiocitos la acumulación de ARNm para citoquinas, con una cinética dependiente de la naturaleza de los parásitos infectantes y/o del órgano investigado. Por otro lado la inducción de ARNm para ICAM-1, muestra una cinética indiferente a estas variables, y aparece por lo tanto como potencial marcador de daño histológico.

Todo lo señalado permite sostener la hipótesis del trabajo, concluyendo que estamos en presencia de excelentes candidatos como marcadores de evolución de la enfermedad.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Lauella', written over several horizontal lines.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Lauella', enclosed within an oval shape.

ABREVIATURAS

AcMo	anticuerpo monoclonal
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
Ags	antígenos
ARNm	ácido desoxirribonucleico mensajero
BSA	seroalbúmina bovina
C	complemento
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CN	controles sanos
CS	fracción citosólica de <u>T. cruzi</u>
DB	Dot blotting
DAB	diaminobencidina
ECG	electrocardiograma
ELISA	enzimo inmunoensayo
IFN	interferón
Igp	glicoproteína de membrana lisosomal
Igs	inmunoglobulinas
IL	interleuquina
IMP	pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática
LAK	linfocitos citotóxicos activados por IL-2
Mc	fracción microsomal de <u>T. cruzi</u>
MIO	miocardio
MES	músculo esquelético
NK	células agresoras naturales
OPD	orto-fenildiamina
PBS-T	PBS conteniendo 0.05% Tween 20
PCR	técnica de amplificación en cadena
PChCr	pacientes chagásicos crónicos
PM	peso molecular
PMSF	fenil metil sulfonil fluoruro
SDS	sodiododecil sulfato
sPBS	PBS suplementado con 1mM Cl ₂ Mn
TC1	célula T colaboradora tipo 1
TC2	célula T colaboradora tipo 2
T-DAF	factor acelerador de la caída de C3 convertasas
Tc-Tox	proteína formadora de poro del <u>T. cruzi</u>
TLCK	lisina cloro metil cetona
WB	Western blotting= inmunoblotting

REFERENCIAS

- Abramo-Orrego L., J.C. Lansetti, P.J. Bozzini & G.J.W. de Martini. Hemocultivo como método de diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Medicina (Bs. As.). 40 (supl 1): 56. 1980.
- Acosta A.M., M. Sadigursky & C.A. Santos-Buch. Anti-striated muscle antibody activity produced by Trypanosoma cruzi. Soc. Exp. Biol. Med. 172: 364. 1983.
- Acosta A.M. & C.A. Santos-Busch. Autoimmune myocarditis induced by Trypanosoma cruzi. Circulation 71(6): 1255. 1985.
- Acquatella H., N.B. Shiller, J.J. Puigbó, H. Giordano, J.A. Suárez, H. Casal, N. Arreaza & R.I. Valecillos. Mode and two-dimensional echocardiography in chronic Chagas' heart disease. A clinical and pathology study. Circulation 62: 787. 1980.
- Affranchino J.L., C.F. Ibañez, A.O. Luquetti, A. Rassi, M.B. Reyes, R.A. Macina, L. Aslund, U. Pettersson & A.C.C. Frash. Identification of a Trypanosoma cruzi antigen that is shed during the acute phase of Chagas disease. Molecular and Biochemical Parasitology. 34: 221. 1989.
- Albert B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & J.D. Watson. The Immune System. En: Molecular Biology of The Cell. Garland Publishing, Inc. New York & London. 1983.
- Alcántara A. & Z. Brener. The in vivo interaction of Trypanosoma cruzi bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. Acta Tropica (Basel), 35: 209. 1978.
- Alcina A. & M. Fresno. Activation by synergism between endotoxin and lymphokines of the mouse macrophage cell line J774 against infection by Trypanosoma cruzi. Parasite Immunol. 9: 175. 1987.
- Alves M.J.M., G. Abuin, V.Y. Kuwajima & W. Colli. Partial inhibition of trypomastigote entry into culture mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 21: 75. 1986.
- Andrade Z.A. & S.G. Andrade. Anatomía Patológica: cardiopatía chagásica. En Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. Soc. Argentina de Parasitología, Bs. As. , 1972.
- Andrade Z.A., S.G. Andrade, G.B. Oliveira, D.R. Alonso. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. Am. Heart J. 93: 316, 1978.

- Andrade Z.A. & S.G. Andrade. Patología en Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Brener Z. e Andrade Z.A Ed. Guanabara Koogan S.A. Río de Janeiro, Brasil. 1979.
- Andrade Z.A., S.G. de Andrade & M. Sadigursky. Enhancement of chronic Trypanosoma cruzi myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. Am. J. Pathol. 127: 467. 1981.
- Andrews N.W., C.K. Abrams, S.L. Slatin & G. Griffith. A T. cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. Cell. 61: 1277. 1990.
- Araguth M.F., M.M. Rodrigues & N. Yoshida. Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes: neutralization by the stage-specific monoclonal antibody 1G7 and immunogenicity of 90 kD surface antigen. Parasite Immunol. 10: 707. 1988.
- Araujo F.G. Trypanosoma cruzi: Expression of antigens on the membrane surface of parasitized cells. J. Immunol. 135: 4149. 1985.
- Araujo F.G. Development of resistance to Trypanosoma cruzi in mice depends on a viable population of L3T4⁺ (CD4⁺)T lymphocytes. Infect. Immunol. 57: 2246. 1989
- Arnold B., G. Schönrich & G.J. Hämmerling. Multiple levels of peripheral tolerance. Immunol. Today 14(1): 12. 1993.
- Arreaza N., J.J. Puigbo, H. Casal, H. Giordano, R. Valecillos, I. Mendoza, J.F. Pérez, E. Hirschhaut & I. Combellas. Radionuclide evaluation of left ventricular function in chronic Chagas cardiomyopathy. J. Nucl. Med. 24: 563. 1983.
- Avila H., O. Thiemann, W. Degraeve, J. Borges, C. Morel & L. Simpson. Use of PCR amplification of Trypanosoma cruzi minicircle DNA for diagnostic of chronic Chagas' disease. J. Cell Biochem. 516: 134. 1992.
- Barousse A.P., S. Coppola, J.A. Costa, H. Espósito & H. Laplume. Enfermedad de Chagas e inmunosupresión. Medicina (Bs. As.) 40(supl 1): 17. 1980.
- Barretto M.P. Epidemiología. En Z. Brener & Z. Andrade. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas, Río de Janeiro, 1979.
- Basso G., R. Basso & A. Bibiloni. Investigaciones sobre la Enfermedad de Chagas-Mazza. EUDEBA, Buenos Aires, 1978.

- Beher M.G., C.A. Schnaitman & A.P. Pugsley. Major heat-modifiable outer membrane protein in Gram-negative bacteria: comparison with the Omp A protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 143: 906. 1980.
- Beltz L.A. & F. Kierszenbaum. Suppression of human lymphocytes responses by *Trypanosoma cruzi*. *Immunology.* 60: 309. 1987.
- Ben Younes-Chennoufi A., G. Said, H. Eisen, A. Durand. & M. Hontebeyrie-Joskowicz. Cellular *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells (CD4⁺). *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.* 82: 84. (1988a).
- Bevilacqua M.P., J.S. Pober, G.R. Majeau, R.S. Cotran & M.A. Gimbrone Jr. Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J. Exp. Med.* 160: 618.1984.
- Bice D.E. & R. Zeledón. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909). *J. Parasitol.*, 56: 663. 1970.
- Biondi A., S.F. Schlossman & R.F. Todd. Phenotypic characterization of human T lymphocyte populations producing macrophage-activating factor (MAF) lymphokines. *J. Immunol.* 133: 281. 1984.
- Bocca Tourrés C. Enfermedad de Chagas. Clínica de fase aguda. En Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. Soc. Argentina de Parasitología, Buenos Aires, 1972.
- Bonet A.H., J.A. Cichero, E. Kushnir, J.C. Grand & E.L. Segura. Estudio epidemiológico sobre la Enfermedad de Chagas Mazza en comunidades rurales de la provincia de Córdoba. *La Semana Médica* 133: 58. 1968.
- Bonfa E., V.S.T. Viana, A.C.P. Barreto, N.H. Yoshinari & W. Cossermelli. Autoantibodies in Chagas' disease. *J. Immunol.* 150: 3917. 1993.
- Boschetti M.A., M.M. Piras, D. Henriquez & R. Piras. The interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24: 175. 1987.
- Brener Z. General review of *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18: 1. 1985.
- Bretaña A. & J.A. O'Daly. Uptake of fetal proteins by *Trypanosoma cruzi* immunofluorescence and ultrastructural studies. *Int. J. Parasitol.* 6: 376. 1976.

- Brostoff J., G. Scadding, D. Male & I.M. Roitt. *Inmunología Clínica*. Mosby, Doyma Libros. Edición Española Haroforma. 1994.
- Búa J., E. Bontempi, A.M. Ruiz & E.L. Segura. Antígenos del Trypanosoma cruzi. *Rev. Arg. Microbiol.* 22: 47. 1990.
- Burgess D.E., R.E. Kuhn & K.S. Carlson. Induction of parasite-specific helper T lymphocyte during Trypanosoma cruzi infections in mice. *J. Immunol.* 127: 2092. 1981.
- Burkholder, J. E., T.C. Allison & V. P. Kelly. Trypanosoma cruzi (Chagas) (Protozoa: Kinetoplástida) in invertebrate, reservoir and human hosts of the lower Rio Grande Valley of Texas. *J.Parasitol.*, 66: 305. 1980.
- Cabeza Meckert P., Cardoni R.L., M.E. Rottenberg & E.L. Segura. Increased production of reactive oxygen species by cells from mice acutely infected with Trypanosoma cruzi. *Cell. Immunol.* 128: 11. 1990.
- Cabeza Meckert P., J.G. Chambó & R.P. Laguens. Presence of cells producing anti-heart autoantibodies in the inflammatory infiltrate of chronic chagasic myocarditis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 60: 137: 1991.
- Campbell I.L., A. Cutri, D. Wilkinson, A.W. Boyd & L.C. Harrison. Intercellular adhesion molecule 1 is induced on isolated endocrine islet cells by cytokines but not by reovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4282. 1989.
- Cançado J.R. & Z. Brener. *Terapeutica en: Trypanosoma cruzi Doença de Chagas*. Brener Z. e Z.A. Andrade Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro , Brasil.1979.
- Cardoni R., M.E. Rottemberg & E.L. Segura. Increased production of reactive oxygen species by cells from mice acutely infected wit trypanosoma cruzi. *Cell. Immunol.* 128: 11.1990.
- Cardoni R. Respuesta inmune efectora. En: *Enfermedad de Chagas*. R. Storino y J. Milei. Doyma Argentina S.A. .Buenos Aires. 1994.
- Carrasco H.A., J.S. Barbosa, G. Inglessis, A. Fuenmayor & C. Molina. Left ventricular cineangiography in Chagas' disease. Detection of early myocardial damage. *Am. Heart J.* 104: 595. 1982.
- Carvalho R.M.G., M.N.L. Meirelles, W. de Souza & W. Leon. Isolation of intracellular stage of Trypanosoma cruzi and its interaction with mouse macrophages in vitro. *Infect. Immun.* 33: 546. 1981.

- Carvalho T.M.U. & W. de Souza. Early events related with the behaviour of Trypanosoma cruzi within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell. Struct. Func.* 14: 383. 1989.
- Celentano A.M., G. Gorelik, L. Sterin-Borda, E. Borda & S.M. Gonzalez Cappa. Participación de la PGE2 en la evolución de la infección murina por T. cruzi. Res. H-5. 'Actas de la XII Reunión Anual de la Soc. Argentina de Protozoología. Córdoba 1992.
- *Cerbán F.M., S. Gea, E. Menso & E. Vottero-Cima.* Chagas' disease: IgG isotypes against Trypanosoma cruzi cytosol acidic antigens in patients with different degrees of heart damage. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67: 25.1993
- Cerisola J.A., M. Alvarez & A.M. de Rissio. Inmunodiagnóstico da doença de Chagas. Evolução serológica de pacientes con doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 12: 403. 1970.
- Cerisola J.A., R. Rohweder, E.L. Segura, C.E. del Prado, M. Alvarez & G.J.W. de Martini. El xenodiagnóstico. Normatización, utilidad. Publ. Ministerio de Bienestar Social. Secret. de Estado de Salud Pública. Bs. As. Argentina. 1974.
- Chess Q., A.M. Acosta, J.K. Sethi & C.A. Santos-Busch. Reversible acquisition of a host cell surface membrane antigen by Trypanosoma cruzi. *Infect. Immunol.* 40: 299. 1983.
- Choromanski L. & R.E. Khun. Interleukin 2 enhances specific and nonspecific responses in experimental Chagas' disease. *Infection and Immunity* 50: 354. 1985.
- Choromanski L. & R.E. Khun. Use of parasite antigens and interleukin-2 to enhance suppressed immune responses during Trypanosoma cruzi infection in mice. *Infect. & Immun.* 55: 403. 1987.
- Chomczynsky P. & Sacchi N. Single-step method of RNA Isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem.* 162: 156. 1987.
- Colley D.G. Occurrence, roles, and uses of idiotypes and anti-idiotypes in parasitic diseases. The nature of parasitic diseases, in J. Cerny & J. Hiernaux, "Idiotype network and diseases". American Society for Microbiology, Washington. 1990.
- Cossio P.M., O. Bustreoabad, E. Paterno, R. Iotti, M.B. Casanova, M.R. Podestá, N. Boloma, R.M. Arana, C.D. Pasqualini. Experimental myocarditis induced in swiss mice by homologous heart immunization resembles chronic experimental Chagas's heart disease. *Clin. Immunol. Immunopath.* 33: 165. 1984.

- Cossio P.M., M.B. Casanova, C. Bellido, L. Arce, R. Storino, M.T De La Vega, C. Diez, R.M. Arana. Autoimmune response against myocardial tissue in Chagas' disease. *Medicina (BS AS)* 45: 643. 1985.
- Cox F.E.G. Trypanosoma cruzi: signals for transformation. *Nature*, 300: 685. 1982.
- Cunningham M.W., N.K. Hall, N.K. Kusher & A.M. Spanier. A study of anti-group A Streptococcal monoclonal antibodies cross-reactive with myosin. *J. Immunol.* 136. 1986.
- Cura E.N., E.H. de Titto & E.L. Segura. Control de calidad del Inmunodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Manual de procedimientos. Buenos Aires. 1992.
- Curtis B.M. et al. T-cell interleukin 1 receptor cDNA expressed in chinese hamster ovary cells regulates functional responses to interleukin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 3045. 1989.
- Dasso M.S. & E.H. de Titto. Análisis electroforético de proteínas de Trypanosoma cruzi. *Anal. Asoc. Quím. Arg.* Vol. 80 (1): 293. 1992.
- Davies C.D. & R. Kuhn. Detection of antigen with affinity for host cell membrane polypeptides in culture supernatants of Trypanosoma cruzi. *Infect. Immun.* 58: 1. 1990.
- De Bracco M.M.E., L. Stein-Borda, M. Finiasz, S. Cangiani, R. Storino, R. Diez & E. Borda. Modification of the contractile activity of isolated atria by T4 lymphocytes from patients with Chagas' disease: effect of soluble factors. *Int. J. Immunopharmac.* 8: 645. 1986.
- Dejana E., F. Breviario & G. Balconi. Stimulation of prostacyclin synthesis in vascular cells by mononuclear cells products. *Blood* 64: 1280. 1984.
- Del Castillo M., G. Mendoza, J. Oviedo, R.P. Perez Bianco, A.E. Anselmo & M. Silva. AIDS and Chagas' disease with central nervous system tumor-like lesion. *Am. J. Med.* 88: 693. 1990.
- de Rezende J.M. Formas digestivas da Enfermedad de Chagas. En Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas, Soc. Arg. de Parasitología, Bs. As., 1972.
- de Titto E.H., E.L. Segura & M. Braun. Cellular immunity in Chagas' disease. In vitro response to subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. *Immunol. Lett.* 6: 161. 1983.

- de Titto E.H., M. Braun, J.O. Lázari & E.L. Segura. Cell mediated reactivity against human and Trypanosoma cruzi antigens according to clinical status in Chagas' disease patients. *Immunol. Lett.* 9: 249. 1985.
- de Titto E.H. , J.R. Catterall & J.S. Remington. Activity of recombinant Tumour necrosis factor on Toxoplasma gondii and Trypanosoma cruzi. *J. Immunol.* 137: 1342. 1986.
- de Titto E.H., H. Moreno, M. Braun & E.L. Segura. Chagas' disease: humoral response to subcellular fractions of Trypanosoma cruzi in symptomatic and asymptomatic patients. *Trop. Med. Parasitol.* 38: 163. 1987.
- de Titto E.H. & S.A. Laucella. Mimetismo molecular y patología en la Enfermedad de Chagas crónica. En: actualizaciones en la Enfermedad de Chagas. Ed. Dr. Madorey R.J., Dr. C. Madorey & Dr. M.I. Cámara. Buenos Aires. 1993.
- de Titto E.H. Bases genéticas. En: Enfermedad de Chagas. Storino R. & J. Milei. Doyma S.A. Buenos Aires. 1994.
- Díaz J.C.P. Epidemiology of Chagas' disease. En S. Wendel, Z. Brener, M. E. Camargo, Rassi A. Chagas' disease (American Trypanosomiasis): Its impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISTB. San Pablo, 1992.
- Dragón E.A., S.R. Sias, E.A. Kato & J.A. Gabe. The genome of Trypanosoma cruzi contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. *Mol. Cell. Biol.* 7: 1271. 1987.
- Dusanic D.G. In vitro production of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. *J. Parasitol.*, 66: 1046. 1980.
- Dustin M.L., R. Rothlein, A.K. Bahn, C.A. Dinarello & T.A. Springer. Induction by IL-1 and interferon, tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* 137: 245. 1986.
- Dustin M.L., K.H. Singer, D.T. Tuck & T.A. Springer. Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon γ and is mediated by intracellular adhesion molecule 1 (ICAM 1). *J. Exp. Med.* 167: 1323. 1988.
- Dutra W.O., O.A. Martins-Filho, J.R. Cançado, J.C. Pinto-Dias, Z. Brener, G.L. Freeman Jr., D.G. Colley, G. Gazzinelli & J.C. Parra. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int. Immunol.* 6(4): 499. 1994.

- Dvorak J.A. & T.P. Hyde. Trypanosoma cruzi: interactions with vertebrate cells in vitro. I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Exp. parasitol.* 34: 268. 1973.
- Dvorak J.A. & C.L. Howe. The attraction of Trypanosoma cruzi to vertebrate cells in vitro. *J. Protozool.* 23: 534. 1976.
- Dvorak J.A., T.E. Hall, M.S.J. Crane, J.C. Engel, J.P. Mc Daniel & R. Uriegas. Trypanosoma cruzi: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of Mitramycin-induced fluorescence. *J. Protozool.* 29: 430. 1983.
- Dvorak J.A., T.E. Hall, M.S.J. Crane, J.C. Engel, J.P. Mc Daniel & R. Uriegas. Trypanosoma cruzi: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of Mitramycin-induced fluorescence. *J. Protozool.* 29: 430. 1983.
- Eisen H. & S. Kahn. Mimicry in Trypanosoma cruzi: fantasy and reality. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 507. 1991.
- Engel J.C., J. Dvorak, E.L. Segura & M. Crane. Trypanosoma cruzi: biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I. Growth kinetic in liquid medium. *J. Protozool.* 29(4): 555. 1982.
- Evans T.G., E.C. Krug, M.E. Wilson, A. Wilson Vasconcelos, J.E. De Alencar & R.D. Pearson. Evaluation of antibody responses in American Visceral Leishmaniasis by ELISA and immunoblot. *Mem. Inst. O. Cruz.* 84: 157. 1989.
- Fainboim L. & M.L. Satz. *Introducción a la inmunología humana*. 2ª edición. Buenos Aires. 1992.
- Farrar J.W.Z., I.G. Kagan, F.O. Everton & T.F. Sellers. Serological evidence of human infection with Trypanosoma cruzi in Georgia. *A.J. Hyg.* 78: 166. 1963.
- Farrar W.L., H.M. Johnson & J.J. Farrar. Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocyte by interleukin-2. *J. immunol.* 126: 1120. 1981.
- Fenton Hall B. & K.A. Joiner. Developmentally-regulated virulence factors of Trypanosoma cruzi and their relationship to evasion of host defences. *J. Euk. Microbiol.* 40: 207. 1993.
- Fisher E., M.A. Quaiassi, P. Velve, J. Cornette & M.D. Kazatchkine. Gp. 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of T. cruzi from damage by the human alternative complement pathway. *Immunology.* 65: 299. 1988.

- Fleming B. & G.A.W. Rook. T-cell dependent polyclonal activation by soluble mycobacterial extracts of B cells in peripheral blood cell populations from leprosy patients and normal donors. *Immunol.* 47: 589. 1982.
- Frash A.C.C., J.J. Cazzulo, L. Aslund & U. Peterson. Comparison of genes encoding Trypanosoma cruzi antigens. *Parasitology Today* 7(6): 148. 1991.
- Fujinami R. S., M.B.A. Oldstone, Z. Wroblleska, M.E. Frankel & H. Kaprowski. Molecular mimicry in virus infection: cross - reaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2346. 1983.
- Gazzinelli G. & Z. Brener. Immunological aspect of the morbidity of human Chagas' disease. 36 th Forum in immunology: 167. 1991.
- Gazzinelli R.T., I.P. Oswald, S. Hieny, S.L. James & A. Sher. The microbicidal activity of interferon- γ treated macrophages against Trypanosoma cruzi involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur. J. Immunol.* 22: 2501. 1992
- Giordano H., J.J. Puigbó, H. Acquatella, I. Combellas, R. Valecillos, H. Casal, N. Arreaz, E. Hirschhaut, I. Mendoza, F. Tortoledo & I. Ferrer. Miocarditis chagásica. Diagnóstico precoz. En: Acquatella H. , P.A. Pullido (eds.): *Miocardopatías*. Salvat Editores. Barcelona. 1982.
- Gluckstein D., F. Ciferri & J. Ruskin. Chagas' disease: another cause of cerebral mass in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Med.* 92: 429. 1992.
- Golden J.M. & R.L. Tarleton. Trypanosoma cruzi: Cytokine effect on macrophage trypanocidal activity. *Exp. Parasitol.* 72: 391. 1991.
- Goding J.W. & E. Handman. In: *Genes and antigens of parasites: a laboratory manual* (CM Morel Ed). 2nd edition. Rio de Janeiro: Fundação O. Cruz. 1984.
- Goble F.C. South American trypanosomiasis. En *Immunity in parasitic animals* (G.J. Jackson, R. Herman & I. Singer Eds.), 2: 597. Academic Press, New York, 1970.
- Gonzalez Cappa S.M. & I. Kagan. Agar gel and immunoelectrophoresis analysis of several strains of Trypanosoma cruzi. *Exp. Parasitol.* 25: 50. 1969.
- González Cappa S.M., A. Bronzina, A.M. Katzin, H. Golferá, G.W. de Martini & E.L. Segura. Antigens of subcellular fractions of Trypanosoma cruzi: III humoral immune response and histopathology of immunized mice. *J. Protozool.* 27(4): 467. 1980.

- González Cappa S. M., P. Chiale & G.E.D. Prado. Aislamiento de una cepa de Trypanosoma cruzi de un paciente con cardiopatía chagásica crónica y su caracterización biológica. *Medicina (Buenos Aires)*. 40: 63. 1980.
- González Cappa S. M., A. M. Katzin, N. Añasco & S. Lajmanovich. Trypanosoma cruzi: comparative studies on infectivity and surface carbohydrates of several strains. *Medicina (Buenos Aires)*, 41:278. 1981.
- Goodnow C.C. Cellular mechanisms of self-tolerance. *Curr. Op. Immunol.* 2: 226. 1989.
- Grau G.E., K. Frei, P.F. Piguet, A. Fontana, H. Heremans, A. Billiau, P. Vassali & P.H. Lambert. Interleukin-6 production in experimental cerebral malaria: modulation by anti-cytokine antibodies and possible role in hypergammaglobulinaemia. *J. Exp. Med.* 172: 1505. 1990.
- Graves D., S. Mc Nabb, M. Worley, T.D. Downs & M.H. Ivey. Analysis of rat *Pneumocystis carinii* antigens recognized by human and rat antibodies by using Western immunoblotting. *Infect. Immun.* 54: 96.1986.
- Griffiths C.E.M., J.J. Voorhess & B.J. Nickoloff. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. *J. Acad. Dermatol.* 20: 617. 1989.
- Griffiths C.E.M. & B.J. Nickoloff. Keratinocyte intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression precedes dermal T lymphocytic infiltration in allergic contact dermatitis (*Rhus dermatitis*). *Am. J. Pathol.* 135: 1045. 1989.
- Hale L.P., M.E. Martin, D.E. Mc Collum, J.A. Nunley, T.A. Springer, K.H. Singer & B.F. Haynes. Immunohistologic analysis of the distribution of cell adhesion molecules within the inflammatory synovial microenvironment. *Arthritis Rheum.* 32: 22. 1989.
- Hall B. F. & K.A. Joiner . Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. *Immunol. Today.* 12: A22. 1991.
- Hall B.F., G.C.Furtado & K.A. Joiner. Characterization of host cell vacuolar membrane proteins surrounding different intracellular forms of Trypanosoma cruzi in J774 cells: evidences for receptor sorting during the early stages of parasites entry. *J. Immunol.* 147: 4313. 1991.
- Hall B. F. & K.A. Joiner. Developmentally-regulated virulence factors of Trypanosoma cruzi and their relationship to evasion of host defences. *J. Euk. Microbiol.* 40(2): 207. 1993.

- Hamblin A.S. Lymphokines. IRL Press. Washigton, D.C. 1988.
- Handa K., R. Suzuki, H. Matsui, Y. Shimzu & K. Kumagai. Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin-2 (IL-2). II. IL-2 induced by interferon- γ production. J. Immunol. 130: 988. 1983.
- Harel-Bellan A., M. Joskowicz, D. Fradelizi & H. Eisen. Modification of T cell proliferation and IL-2 production in mice infected with Trypanosoma cruzi. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80: 3466. 1983.
- Harel-Bellan A., M. Joskowicz, D. Fradelizi & H. Eisen. T lymphocyte function during experimental Chagas' disease: production of and response to IL-2. Eur. J. Immunol. 15: 438. 1985.
- Harlow E. & D. Lane. Antibodies a Laboratory Manual. Chapteter VI. Monoclonal Antibodies. 1988.
- Harth B.F., C.G. Haidairs & M. So. Neuraminidase from Trypanosoma cruzi: analysis of enhances expression of the enzyme in infectious forms. Proc. Natl. Acad. USA. 84: 8320. 1987.
- Hatakeyama M. et. al. Interleukin-2 receptor β chain gene: generation of three receptor forms by clones human α and β chain cDNA's. Science. 244: 551. 1990.
- Hernández-Munain C., J.L. De Diego, A. Alcina & M. Fresno. A Trypanosoma cruzi membrane protein shares an epitope with activation antigen and induces crossreactive antibodies. J. Exp.Med. 175: 1473. 1992.
- Ho J., S. Reed, J. Sobel, S. Arruda, S. He, E. Wick & K. Grabstein. Interleukin 3 induces antimicrobial activity against Leishmania amazonensis and Trypanosoma cruzi and tumoricidal activity in human peripheral blood derived macrophages. Infect. Immunol. 60: 1984. 1992.
- Hoare C.A. The trypanosomes of mammals. A Zoological monograph. Blackwell Scientific Publ. , Oxford, Great Britain, 1972.
- Hontebeyrie-Joskowicz M., G. Said, G. Milon, G. Marchall & H. Eisen. L3T4⁺ T cells able to mediated parasite-specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. Europ. J. Immunol. 17: 1027. 1987.
- Hontebeyrie-Joskowicz M. Murine Trypanosoma cruzi infection: a role for TH2 cells in the immunopathology of chronic infection. Res. Immunol. 142: 141. 1991.

- Hudson L. The immunological consequence of infection. *J. Cell Biochem.* 21: 299. 1983.
- Hyde T.P. & J.A. Dvorak. Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. II. Quantitative analysis of the penetration phase. *Exp. Parasitol.* 34: 289. 1973.
- Ibañez C., J.L. Affranchino & C. Frash. Antigenic determinants of Trypanosoma cruzi defined by cloning of parasite DNA. 25: 175. 1981.
- Ibañez C.F., Affranchino J.L., R.A. Macina, M.B. Reyes, S. Leguizamon, M.E. Camargo, L. Aslund, U. Pettersson & A.C.C. Frash. Multiple Trypanosoma cruzi antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motif. *Molecular and Biochemical Parasitology* 30: 27. 1988.
- Instituto Dr. Mario Fatala Chabén. Manual de actualización de Chagas, Leishmania y Paludismo. Ministerio de Salud y Acción Social. Secretaria de Salud, Bs. As., Argentina. 1987.
- Iosa D., V. De-Quatro, D. De-Ping Lee, U. Eikayam, F. Castro & H.A. Palmero. Pathogenesis of cardiac neuromyopathy in Chagas' disease and the role of the autonomic nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 30: 83. 1990.
- Iosa D., D.C. Casadei & F.C. Dorsey. Chagas' cardioneuropathy: effect of ganglioside treatment in chronic dysautonomic patients. A randomized, double-blind, parallel, placebo-controlled study. *Am. Heart J.* 122: 775. 1991.
- Joiner K.A., S. Hieny, L.V. Kirchhoff & A. Sher. Gp. 72, the 72 kilodalton glycoprotein, is the membrane acceptor site for C3 on Trypanosoma cruzi epimastigotes. *J. Exp. Med.* 161: 1196. 1985.
- Joiner K.A., A. Sher, T. Gaither & C. Hammer. Evasion of alternative complement pathway by Trypanosoma cruzi results from inefficient binding of factor B. *Proc. Acad. Sci. USA.* 83: 6593. 1986.
- Jones E.M., D.G. Colley, S. Tostes, E. Reis Lopez, C.L. Vnencak-Jones & T.L. McCurley. Amplification of a Trypanosoma cruzi DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* 48(3): 348. 1993.
- Kagan I.G. & H. Norman. Immunological studies on Trypanosoma cruzi IV serial transfer of organisms in mice. *J. Parasitol.* 48: 584. 1962.
- Kelso A. Cytokines: structure, function and synthesis. *Curr. Opinions in Immunol.* 2: 215. 1989.

- Kern P., C.J. Hemmer, J. Van Damme, H.J. Gruss & M. Dietrich. Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for Plasmodium falciparum malaria. Am. J. Med. 87: 139. 1989.
- Kierszenbaum F., E. Knetch, D.B. Budzko & M.C. Pizziment . Phagocytosis: a defense mechanism against infection with Trypanosoma cruzi. J. Immunol. 112: 1839. 1974.
- Kierszenbaum F. Mechanisms of resistance against Trypanosoma cruzi infection: the importance of antibodies and antibody forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. J. Immunol. 116: 1208. 1976.
- Kierszenbaum F. & M. Pienlowsky. Thymus dependent control of host defences against Trypanosoma cruzi. Infect. Immun. 24: 117. 1979.
- Kindler V., A.P. Sapino, G.E. Grau, P.F. Piquet & P. Vassali. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. Cell 56: 731. 1989.
- Kipnis T.L. , V.L.G. Calich & W. Dias da Silva. Active entry of bloodstream forms of Trypanosoma cruzi into macrophages. Parasitology. 78: 89. 1979.
- Kipnis T.L., J.R. David, C.A. Alper, A. Sher & W. Dias de Silva. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of Trypanosoma cruzi into activators of the alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 78: 602. 1981.
- Koberle F. Patologia e anatomia de la enfermedad de Chagas. Bol. Ofic. Sanit. Panam. 51: 404. 1961.
- Koberle F. Enteropatías y Enteromegalias. En Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. Soc. Argentina de Parasitología, Buenos Aires. 1972.
- Koberle F. Pathogenesis of Chagas disease in Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease. Ciba Foundation 20: 137. 1974.
- Konrfeld S. & I. Mellman. The biogenesis of lysosomes. Annu. Rev. Cell Biol. 5: 483. 1989.
- Krensky A.M., F.S. Madrid, E. Robbins, J.A. Nagy, T.A. Springer & J. Burakoff. The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2 and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions. 131: 611. 1983.
- Krensky A.M., E. Robbins, T.A. Springer & J. Burakoff. LFA-1, LFA-2 and LFA-3 antigens are involved in CTL-target conjunction. J. Immunol. 132: 2180. 1984.

- Kress Y., B.R. Bloom, M. Wittner, A. Rowen & H. Tanowitz. Resistance of Trypanosoma cruzi to killing by macrophages. *Nature* 257: 394. 1975.
- Kress Y., H. Tanowitz, B. Bloom & M. Wittner. Trypanosoma cruzi: infection of normal and activated mouse macrophages. *Exp. Parasitol.* 41: 385. 1977.
- Krettli A.U. & Z. Brener. Resistance against Trypanosoma cruzi associated to antiliving trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* 128: 2009. 1982.
- Lafaille J.J., J. Linss, M.A. Krieger, T. Souto-Padron, W. De Souza & S. Goldenberg. Structure and expression of two Trypanosoma cruzi genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 35: 127. 1989.
- Laguens R.P., P.M. Cabeza Meckert & J.G. Chambo. Estudios inmunológicos en un modelo murino de enfermedad de Chagas. *Med. Bs. As.* 49: 197. 1989.
- Larralde C., R.M. Montoya, E. Sciutto, M.L. Diaz, T. Govezensky & E. Coltorti. Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 282. 1989.
- Leguizamón M.S., O.E. Campetella, M.B. Reyes, C.F. Ibañez, M.A. Basombrío, J. Rincón, A. Orn & C.C. Frash. Bloodstream Trypanosoma cruzi parasites from mice simultaneously express antigens that are markers of acute and chronic human Chagas' disease. *Parasitology* 102: 379. 1991.
- Leiguarda R., A. Roncoroni, A.L. Taratuto, L. Host, M. Berthier, M. Noguez & H. Freilij. Acute CNS infection by Trypanosoma cruzi (Chagas' disease) in immunosuppressed patients. *Neurology.* 40: 850. 1990.
- Leo O., M. Foo, D. Sachs, L. Samelson & J. Bluestone. Identification of monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 1374. 1987.
- Leon L.L., W. Leon, L. Chaves, S.C.G. Costa, M. Queroz Cruz, H.M. Brascher & A. Oliveira Lima. Immunization of mice with Trypanosoma cruzi polyribosomes. *Inf. Immun.* 27: 38. 1980.
- Levin M.J., E. Mesri, R. Benarous, G. Levitus, A. Schijman, P. Levy-Yeyati, P.A. Chiale, A.M. Ruiz, A. Kahn, M.B. Rosebaum, H.N. Torres & E.L. Segura. Identification of major Trypanosoma cruzi antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41: 530. 1989.

- Levitus G., M.H. Joskowicz, M.H.V. Van Regenmortel & M.M.J. Levin. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas' heart disease. Clin. Exp. Immunol. 85: 413. 1991.
- Ley V., N.W. Andrews, E.S. Robbins & V. Nussenzweig. Amastigotes of Trypanosoma cruzi sustain an infective cycle in mammalian cells. J. Exp. Med. 168: 649. 1989.
- Ley V., E.S. Robbins, V. Nussenzweig & N.W. Andrews. The exit of Trypanosoma cruzi from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. J. Exp. Med. 171: 401. 1990.
- Libonatti E. & F. Magglio. Manifestaciones neurológicas agudas en la enfermedad de Chagas - Mazza. Rev. Neurol. Arg. 3: 420 . 1977.
- Loetscher H. et al.. Molecular cloning and expression of the human 55 kD tumor necrosis factor receptor. Cell. 61: 351. 1990.
- Lopetegui R. & C. Sosa Miatello. Ribosomas citoplasmáticos de Trypanosoma cruzi. Características químicas y antígeno-reactivas. Medicina (Bs. As.) 37: 371. 1977.
- Lopetegui R. & C. Sosa Miatello. Antígenos ribosomales de Trypanosoma cruzi. Reactividad antigénica del componente proteico. Medicina (Bs. As.) 41: 167. 1981.
- Lozykowski M.G., T.S. McCormick & E.C. Rowland. Coincidence of tissue antibody and cardiac pathology in mice infected with Trypanosoma cruzi. Transact. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 85: 225. 1991.
- Lugones H.S., O.S. Ledesma, F.A. Peralta, A.E.A. de Marteleur, P. Voza, Z. Falendys & G. Barbieri. Enfermedad de Chagas. Anales Nestlé, 132: 124. 1979.
- Madri J.A., & K.W. Barwick. Use of avidin-biotin complex in an ELISA system: a quantitative comparison with two other immunoperoxidase detection system using keratin antisera. Lab. Invest. 48: 98. 1983.
- Mantovani A. & E. Dejana. Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. Immunol. Today. 10: 370. 1989.
- Marlin S.D. & T.A. Springer. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). Cell. 51: 813. 1987.
- Marteleur L., A. Acevedo & G. P. Barbieri. Microhematocrito para el diagnóstico del Chagas agudo. Congreso de Parasitología, Actas. Huerta Grande, Córdoba. 1986.

- Mazza, S. La enfermedad de Chagas en la República Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 47: 273. 1949.
- Mc Cabe R. , J. Remington & F. Araujo. In vivo and in vitro effects of cyclosporin A on Trypanosoma cruzi. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 34: 861. 1985.
- Mc Cabe R.E., S.G. Meagher & B.T. Mullins. Endogenous interferon γ , macrophage activation, and murine host defense against acute infection with Trypanosoma cruzi. J. Infect. Dis. 163: 912. 1991.
- Mc Cormik T.S. & E.C. Rowland. Trypanosoma cruzi: cross-reactive anti-heart autoantibodies produced during infection in mice. Exp. Parasitol. 69: 393. 1989.
- Meckert P.M.C., J.G.Chanbo & R.P. Laguens. Presence of cells producing anti-heart autoantibodies in the inflammatory infiltrate of chronic chagasic myocarditis. Clin.Immunol. Immunopathol. 60: 137. 1991.
- Melo R.C. & Z. Brener. Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains. J. Parasitol. 64: 475. 1978.
- Meirelles M.N.L. & W. de Souza. Interaction of lysosomes with endocytic vacuoles in macrophages simultaneously infected with Trypanosoma cruzi and Toxoplasma gondii. J. Submicroscop. Cytol. 15: 889. 1983.
- Meirelles M.N.L. & W. de Souza. Killing of Trypanosoma cruzi and Leishmania mexicana, and survival of Toxoplasma gondii in chicken macrophages in vitro. J. Submicroscop. Cytol. 17: 327. 1985.
- Meirelles M.N.L., T.C. de Araujo, W. de Souza, A.L. Moreira & H.S. Barbosa. Trypanosoma cruzi: phagolysosomal fusion after invasion into non-professional phagocytic cells. Cell Struct. Func. 12: 387. 1987.
- Mignone C. Alguns aspectos da anatomia patológica da cardite chagastica crónica. Tese Catedrático, a Faculdade de Medicina da USP, São Paulo. 1958.
- Milder R. & J. Kloetzer. The development of Trypanosoma cruzi in macrophages in vitro. Interaction with lysosomes and host cells fate. Parasitology. 80: 139. 1980.
- Miles M.A. Isoenzyme characterization. Rev. Soc. Med. Trop. 18: 53. 1985.
- Minoprio P., S. Itohara, C. Heusser, S. Tonegawa & A. Coutinho. Immunobiology of murine T. cruzi infection: the predominance of parasite-non specific responses and the activation of TCRI T cells. Immunol. Rev. 112: 183. 1989.

- Mirkin G.A., A.M. Celentano & S.M. Gonzalez Cappa. Subpoblaciones de linfocitos T (LT) específicas de tejido de ratones infectados con dos cepas de Trypanosoma cruzi. *Medicina* 53(1): 86. 1993.
- Moleiro F., I. Mendoza. Miocardiopatía crónica chagásica. *Acta Cien. Venez.* 31: 66. 1980.
- Montufar O.M.B., C.L. Musatti, E. Mendes & E.F. Mendes. Cellular immunity in chronic Chagas' disease . *J. Clin. Microbiol.* 5: 401. 1977.
- Morato M.J.F., Z. Brener, J.R. Cançado, R.M.B. Nunes, E. Chiari & G. Gazzinelli. Cellular immune response of chagasic patients to antigens derived from different Trypanosoma cruzi strains and clones. *Amer. J. trop. Med.Hyg.* 35: 505. 1986.
- Morel C., E. Chiari, E.P. Camargo, D.M. Mattei, A.J. Romanha & L. Simpson. Strains and clones of Trypanosoma cruzi can be characterized by patterns of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 6810. 1980.
- Moreno S., D.J. Palmero, K. Eiguchi de Palmero, R. Docampo & A. Stoppani. Estimulación de la peroxidación lipídica y alteraciones ultraestructurales inducidas por nifurtimox en tejidos de mamíferos. *Medicina (Bs. As.)* 40: 553. 1980.
- Mosca W. & J. Plaja. Immune response in human Chagas' disease. - II. Lymphocyte blastogenesis in patients with chagasis cardiomyopathy. *Acta Cient. Venez.* 31: 464. 1980.
- Mosmann T., H. Cherwinski, M. Bond, M. Giedlin & R.L. Coffman. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348. 1986.
- Mudge G.H., W. Grossman, R.M. Willis, M. Lesch & E. Braunwald. Reflex increase in coronary vascular resistance in patients with ischemic heart disease. *N. Eng. J. Med.* 295: 1333. 1976.
- Muñoz-Fernandez M.A., M.A. Fernandez & M. Fresno. Synergism between tumor necrosis factor and interferon- γ on macrophage activation for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* 22: 301. 1992.
- Muñoz-Fernandez M.A., M.A. Fernandez & M. Fresno. Activation of human macrophages for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi by TNF- α and through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol. letters* 33: 35. 1992.

- Nabors G.S. & R.L. Tarleton. Differential control of IFN- γ and IL-2 production during Trypanosoma cruzi infection. J. Immunol. 146: 3591. 1991.
- Nachman R.L., K.A. Hajjar, R.L. Silverstein & C.A. Dinarello. Interleukin 1 induces endothelial cell synthesis of plasminogen activator inhibitor. J. Exp. Med. 163: 1595. 1986.
- Nacy C., A.H. Fortier, M.S. Meltzer, N.A. Buchmeier & R.D. Schreiber. Macrophage activation to kill Leishmania major: activation of macrophages for intracellular destruction of amastigotes can be induced by both recombinant interferon-gamma and non-interferon lymphokines. J. Immunol. 135: 3505. 1985.
- Neiss W.F. A coat of glycoconjugates on the inner surface of the lysosomal membrane in the rat kidney. Histochemistry. 80: 603. 1984.
- Nickel S., A. Gebremichael, R. Hoff & M. Boyer. Isolation functional characterization of murine T cell lines and clones specific for the protozoan parasite Trypanosoma cruzi. J. Immunol. 138: 914. 1987.
- Nickell S.P., G.A. Stryker & Arevalo. Isolation from Trypanosoma cruzi infected mice of CD8⁺, MHC restricted cytotoxic T-cells that lyse parasite infected target cells. J. Immunol. 150: 1446. 1993.
- Nicola N.A. & M. Vadas. Hemopoietic colony-stimulating factors. Immunol. Today 5: 76. 1984.
- Nogueira N., C. Bianco & Z. Cohn. Studies on the selective lysis and purification of Trypanosoma cruzi. J. Exp. Med. 142: 224. 1975.
- Nogueira N. & Z. Cohn. Trypanosoma cruzi: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. J. Exp. Med. 143: 1402. 1976.
- Nogueira N., S. Gordon & Z. Chon. Trypanosoma cruzi: modification of macrophage function during infection. J. exp. Med. 146: 157. 1977.
- Nogueira N. & Z. Cohn. Trypanosoma cruzi: in vitro induction of macrophage microbicidal activity. J. Exp. Med. 288.1978.
- Nogueira N., S. Chaplan & Z. Cohn. Trypanosoma cruzi: factors modifying ingestion and fate of blood form trypomastigotes. J. Exp. Med. 152: 447. 1980.

- Nogueira N., C. J. Ellis, S. Chaplan & Z. Cohn . Trypanosoma cruzi: in vivo and in vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* 51: 325. 1981.
- Noisin E.L. & F. Villalta. Fibronectin increases Trypanosoma cruzi amastigote binding to and uptake by murine macrophages and human monocytes. *Infect. Immun.* 57: 1030. 1989.
- Norris K.A., B. Bradt, N.R. Cooper & M. So. Characterization of a Trypanosoma cruzi C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J. Immunol.* 147: 2240. 1991.
- Nussenzweig V. , L.M. Deane & J. Kloetzel. Differences in antigenic constitution of strains of Trypanosoma cruzi. *Exp. Parasitol.* 14: 233. 1963.
- Ortega Barrias E. & M.E.A. Pereira. A novel T. cruzi heparin binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell* 67: 411. 1991.
- Otsuka T., S. Miyatake, T. Yokota, J. Conway, N. Arai, F. Lei & K. Arai. Organization of chromosomal genes for interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor and their expression in activated T cells. *Lymphokines.* 13: 261. 1987.
- Osuna A., F. Gammaro, S. Castanys & L.M. Ruiz-Perez. Inhibition of lysosomal fusion by Trypanosoma cruzi in peritoneal macrophages. *Int. J. Parasitol.* 16: 629. 1986.
- Ouaisi M.A., D. Afchain, A. Capron & J.A. Grimaud. Fibronectin receptor on Trypanosoma cruzi trypomastigotes and their biological function. *Nature.* 308: 380. 1984.
- Ouaisi M.A. & A. Capron . Some aspects of protozoan parasite-host cells interactions with special reference to RGD-mediated recognition process. *Microb. Pathogen.* 6: 1. 1989.
- Palacios-Pru E., G.H. Carrasco, C. Scorza & R. Espinoza. Ultraestructura miocárdica en la enfermedad miocárdica de Chagas. Diagnóstico diferencial con la miocardiopatía dilatada o congestiva y con las miocardiopatías arritmicas. *Rev. Lat. de Cardiol.* 3: 115. 1982.
- Pan S.C. Establishment of clones of Trypanosoma cruzi and their characterization in vitro and in vivo. *Bull. WHO* 60: 101. 1982.

- Parodi A.J., G.D. Pollevick, M. Mautner, A. Buschiazzi, D.O. Sanchez & A.A. Frash. Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of Trypanosoma cruzi. EMBO J. 11(5): 1705. 1992.
- .Paulone I. R. Chuit, A.C. Pérez & E.L. Segura. Field research on an epidemiological surveillance alternative of Chagas' disease transmission: The Primary Health Care (PHC) strategic in rural areas. Rev. Soc. Arg. Microbiol. 40(Suppl.): 83. 1987.
- Pereira M.E.A. A developmentally regulated neuraminidase activity in Trypanosoma cruzi. Science. 219: 1444. 1983.
- Pereira M.E.A. Cell biology of Trypanosoma cruzi . In D. Wyler (ed.) , Modern parasite biology. W.H. Freeman & Co. New York. 64. 1990.
- Pereira M.E.A. Cell biology of Trypanosoma cruzi. In D.J. Wyler (ed.) , Modern parasite biology: cellular, immunological , and molecular aspects. W.H. Freeman & Co. New York. 1990.
- Peterson D., R. Wrightsman & J.E. Mannig. Cloning of a major surface antigen gene of Trypanosoma cruzi and identification of nonapeptide repeat. Nature 322: 566. 1986.
- Petray P., M.E. Rottemberg, R. Corral, A. Diaz, A. Orn & S. Grinstein. Effect of anti-interferon- γ and anti-Interleukin-4 administration on the resistance of mice against the infection with reticulotropic and myotropic strains of Trypanosoma cruzi. Immunology letters. 35: 77. 1993.
- Petray P., M.E. Rottemberg, S. Grinstein & A. Orn. Release of nitric oxide during the experimental infection with Trypanosoma cruzi. Parasite Immunol. 16: 193. 1994.
- Petry K., P. Voison, T. Blatz & J. Labouesse. Epitopes common to trypanosomes (T. cruzi, T. dionisii and T. vespertilionis [Schizotrypanum]): astrocytes and neurons. J. Neuroimmunol. 16: 237. 1987b.
- Petry K., E. Nudelman, H. Eisen & S. Hakimori. Sulfated lipids represent common antigens on the surface of Trypanosoma cruzi and mammalian tissues. Mol. Biochem. Parasitol. 30: 113. 1988.
- Petry K. & W.C. Van Voorthis. Antigen of Trypanosoma cruzi that mimic mammalian nervous tissue: investigation of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas' disease. 36th Forum in Immunology Institute Pasteur. Elsevier. Res. Immunol. 142: 151. 1991.

- Peyrol S., M.A. Ouaiissi, A. Capron & J.A. Grimaud. Trypanosoma cruzi: ultrastructural visualization of fibronectin bound to culture forms. *Exp. Parasitol.* 63: 112. 1987.
- Pinto Díaz J.C. Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudio clínico-epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982. Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 1982.
- Plata F., F. Garcia-Pons & J. Wietzerbin. Immune resistance to Trypanosoma cruzi: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. *Ann. Inst. Past. Immunol.* 138: 397. 1987.
- Prioli R.P., J.S. Mejía & M.E. Pereira. Monoclonal antibodies against Trypanosoma cruzi neuraminidase reveal enzyme polymorphism, recognize a subset of trypomastigotes, and enhance infection in vitro. *J. Immunol.* 144: 4384-. 1990.
- Prioli R.P., I. Rosenberg & M.E. Pereira. High and low-density lipoproteins enhance infection of Trypanosoma cruzi in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* 38: 191. 1990.
- Puigbó J.J., J.R. García Barrios, J.A. Suárez & C. Gil Yépez. Clinical and Epidemiological Study of chronic heart involvement in Chagas' disease. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 34: 665. 1966.
- Puigbó J.J., J.R. Nava Rhode, H. García Barrios & C. Yépez. A 4-Year Follow -up Study of a rural community with endemic Chagas' disease. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 39: 341. 1968.
- Puigbó J.J., F. Pisani, I. Boccalandro, P. Blanco, I. Machado & J.A. Valero. Estudio de la cardiopatía chagásica crónica. Empleo de la cineangiografía. *Acta Med. Ven.* 15: 339. 1968.
- Puigbó J.J., H. Giordano & D. Iosa. Hallazgos de disautonomía en Venezuela, en la Enfermedad de Chagas. Symposium Satélite del XXIV Congreso de Cardiología. II Congreso de Neuropatía Chagásica. 1991.
- Puigbó J.J., H. Giordano, R. Fiorentino & D. Iosa. Chagas' cardioneuropathy: effect of ganglioside treatment in chronic dysautonomic patients. XIV Interamerican Congress of Cardiology. Orlando, Florida. Abst. N° 75. 1992.
- Ramirez M.I., R. de Cassia Ruiz, J.E. Araya, J.F. da Silveira & N. Yoshida. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes in host cells invasion. *Infect. Immunol.* 81: 3636. 1993.

- Raoult D., D. Arnoux, M. Drancourt & J.P. Ardisson. Enzyme secretion by human endothelial cells infected with Rickettsia conorii. Acta Virol. 31: 352. 1987.
- Rassi A. Clínica: Fase aguda. En Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas (Z. Brener & Z. Andrade, Eds). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro., Brasil, 1979.
- .
- Reed S.G. Adoptive transfer of resistance to acute Trypanosoma cruzi infection with T-lymphocytes enriched spleen cells. Infect. Immunol. 28: 404. 1980.
- Reed S.G., C.F. Nathan, D.L. Pihl, P. Rodricks, K. Shanebeck, P. Conlon & K. Grabstein. Recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor activates macrophages to inhibit Trypanosoma cruzi and release hydrogen peroxide. J. Exp. Med. 166: 1734. 1987.
- Reed S. In vivo administration of recombinant interferon gamma induces macrophage activation , and prevent acute disease , immune suppression , and death in experimental Trypanosoma cruzi infections. J. Immunol. 140: 4342. 1988.
- Reis D.A., E.M. Jones, S. Tostes, E.R. Lopes, E. Chapadeiro, G. Gazzinelli, D.G. Colley & T. McCurley. Expansion of MHC antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. Am. J. Med. Trop. Hyg. in press. 1993.
- Remington J.S., F.G. Araujo & G. Desmots. Recognition of different Toxoplasma antigens by IgM and IgG antibodies in mothers and their congenital infected newborns. J. Infect. Dis. 152: 1020. 1985.
- Reyes M.B., M. Lorca, P. Muñoz & A.C.C. Frash. Fetal IgG specificities against Trypanosoma cruzi antigens in infected newborns. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 87: 2846. 1990.
- Ribeiro do Santos R. & L. Hudson. Trypanosoma cruzi: Binding of parasite antigens to mammalian cells membranes. Parasite Immunol. 2: 1 1980.
- Ribeiro do Santos R. & L. Hudson. Immunological consequences of parasite modifications of host cells. Clin. Exp. Immunol. 40: 36. 1980.
- Rimoldi M.T., A. Sher, S. Heiny, A. Lituchy, C. Hammer & K. Joiner. Developmentally regulated expression by Trypanosoma cruzi of molecules that accelerate the decay of complemente C3 convertases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 193. 1988.
- Rimoldi M.T., A.J. Tenner, D.A. Bodak & K.A. Joiner. Complement component C1q enhances invasion of human mononuclear phogocytes and fibroblasts by Trypanosoma cruzi trypomastigotes. J. Clin. Invest. 84: 1982. 1989.

- Risen H. & S. Kahn. Mimicry in Trypanosoma cruzi: fantasy and reality. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 507. 1991.
- Rivas C., A.M. Ruiz & E.L. Segura. Intraespecific variability in Trypanosoma cruzi shown by anti-flagellar fraction monoclonal antibodies. Enviado para su publicación a *Immunol letters*.
- Roitt J.M., J. Brostoff & D. Male. *Immunology*. Gower Medical Publishing. London. New York. 1992.
- Romaña C. *Enfermedad de Chagas*. López Libreros, Ed., Buenos Aires, 1963.
- Rosembaum M.B. & J.A. Cerisola. *Epidemiología de la enfermedad de Chagas en la República Argentina*. *Hospital*, 60: 75. 1961.
- Rosembaum M.B. *Chagasic myocardiopathy*. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 7: 199. 1961.
- Rosen A., P. Gergel, M. Jondal, G. Dein & S. Britton. Polyclonal IgG production after Epstein Barr virus infection of human lymphocytes in vitro. *Nature* 267: 52. 1977.
- Rossi V., F. Breviario, P. Ghezzi, E. Dejana & A. Montavani. Prostacyclin synthesis induced in vascular cells by interleukin-1. *Science* . 229: 174. 1985.
- Rothlein R., M. Czajkowski, M.M. O'Neill, S.D. Marlin, E. Mainolfi & V.J. Merluzzi. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cells lines by pro-inflammatory cytokines: regulation by pharmacologic agents neutralizing antibodies. *J. Immunol.* 141: 1665. 1988.
- Rottemberg M., R. Cardoni, R. Andersson, E. Segura & A. Orn. Resistance to Trypanosoma cruzi requires T helper/inducer cells as well as natural killer cells. *Scand. J. Immunol.* 28: 573. 1988.
- Rottemberg M.E., E.H. de Titto, A.L. Cardoni & E.L. Segura. Respuesta inmune en la infección con Trypanosoma cruzi. *Rev. Arg. Microbiol.* 23: 101. 1991.
- Rottemberg M.E., D.A. Rodriguez & A. Orn. Control of Trypanosoma cruzi infection in mice deprived of T-cells help. *Scand. J. Immunol.* 36. 1992.
- Rottemberg M.E., M. Bakhiet, T. Olsson, K. Kristensson, T. Mak, H. Wigzell & A. Orn. Differential susceptibility of mice genomically deleted of CD4 and CD8, to infections with Trypanosoma cruzi or Trypanosoma brucei. *Infect. Immun.* 6(12): 5129. 1993.

- Ruiz A.M., M. Esteva, P. Cabeza Meckert, R.P. Laguens & E.L. Segura. Protective immunity and pathology induced by inoculation in mice with different subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. Acta Trópica 42: 299. 1985.
- Ruiz A.M., J. Búa, E. Bontempi, M. Esteva, M. Levin & E.L. Segura. Purificación de antígenos protectores contra el Trypanosoma cruzi e identificación de clones en una genoteca de expresión construída en lambda gt11 mediante anticuerpos monoclonales. Medicina (Bs. As.) 47: 575. 1987.
- Ruiz A.M., J. Búa & E.L. Segura. Antígenos del Trypanosma cruzi: perspectivas futuras. En : Storino R. & J. Milei. Enfermedad de Chagas. Doyma Argentina S.A. 1994.
- Russo M., N. Starobinas, P. Minopri, A. Coutinho & J.M. Hontebeyre. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in Trypanosoma cruzi-infected mice after inactivation of helper cells. Ann. Inst. Pasteur/Immunol. 139: 225. 1988.
- Sadigursky M., A.M. Acosta & C.A. Santos-Buch. Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a Trypanosoma cruzi clone. Am. Soc. Trop. Med. Hyg. 31(5): 934. 1982.
- Saegusa J., B. S. Prabhakar, K. Essani, P.R. Mc Clintock, Y. Fukuda, V.J. Ferrans & A.L. Notkins. Monoclonal Antibody to coxsackievirus B4 reacts with myocardium. J. Infect. Dis., 153: 372.1986.
- Said G., M. Joskowicz, A.A. Barreira & H. Eisen. Neuropathy associated with experimental Chagas' disease. Ann. Neurol. 18: 676. 1985.
- Sandvig S., T. Laskay, J. Andersson, M. De Lay & U. Andersson. Gamma-interferon is produced by CD3+ and CD3-lymphocytes. Immunolog. Rev. 97: 51. 1990.
- Santos-Buch C.A. & A.R.L. Teixeira. The immunology of experimental Chagas' disease. III Rejection of allogeneic heart cells in vitro. J. Exp. Med. 140: 38. 1974.
- Santos-Buch C.A. American Trypanosomiasis: Chagas' disease, in Immunopathology. VII Int. Symp. 1977.
- Santos-Busch C.A., A.M. Acosta, H.J. Zweerink, M. Sadigursky, O.F. Andersen, B.F. Von Kreuter, C.I. Brodskyn, C. Sadigursky & R.J. Cody Primary. Muscle disease: definition of a 25 kDa polypeptide myopathic specific Chagas' antigen. Clin. Immunol. Immunopathol. 37: 334. 1985.
- Sato Y., F. Inoue, R. Matsuyama & Y. Shiroma. Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 84: 403. 1990.

- Scott M.T. Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi in mice: specific suppressor cells in chronic infection. *Immunology* 44: 409. 1981.
- Scott M.T. & D. Snary. American Trypanosomiasis (Chagas' Disease) In *Immunology of Parasitic Infections*. Ed. by Cohen S., & Warren K. 2nd. Blackwell Sci. Publ. Oxford and Edinburgh. 1982.
- Scott M.T., G. Bahr, F. Moddaber, D. Afchain & L. Chedid. Adjuvant requirements for protective immunization of using a Trypanosoma cruzi 90 K cell surface glycoprotein. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 74: 373. 1984.
- Schechter M. & N. Nogueira. Variations induced by different methodologies in Trypanosoma cruzi surface antigen profiles. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29: 37. 1988.
- Schenkman S., J. Man-Shiow, G.W. Hart & V. Nussenzweig. A novel cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell.* 65: 1117. 1991.
- Schenkman S., C. Diaz & V. Nussenzweig. Attachment of Trypanosoma cruzi trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. *Exp. Parasitol.* 72: 76. 1991.
- Schenkman S., L.P. de Carvalho & V. Nussenzweig. Trypanosoma cruzi trans-sialidase and neurominidase activities can be mediated by the same enzymes. *J. Exp. Med.* 175: 567. 1992.
- Schenkman R.P.F., F. Vanderkerckhove & S. Schenkman. Mammalian cells sialic acid enhanced invasion by Trypanosoma cruzi. *Infect. Imm.* 61(3): 898. 1993.
- Schmunis G., S. Gonzalez Cappa, O. Traversa & J. Yanofsky. The effect of immunodepression due to neonatal thymectomy in infection with Trypanosoma cruzi. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 89. 1971.
- Schmunis G. Trypanosoma cruzi the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and non-endemic countries. *Transfusion* 31: 547. 1991.
- Schülter D., M. Deckert-Schülter, G. Schwendemann, H. Brunner & H. Hof. Expression of major histocompatibility complex class II antigens and levels of interferon gamma, tumor necrosis factor and interleukin-6 in cerebrospinal fluid and serum in Toxoplasma gondii infected SCID and immunocompetent C.B-17 mice. *Immunol.* 78: 430. 1993.

- Schulz T.F., H. Kollaritsch, H. Hengste, et al . Molecular weight analysis of *Entamoeba histolytica* antigens recognized by IgG and IgM antibodies in the sera of patients with amoebiasis. *Trop. Med. Parasitol.* 38: 144. 1987.
- Segura E.L., N. Cura, I. Paulone, C. Vasquez & J.A. Cerisola. Antigenic make-up of subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* 21: 571. 1974.
- Segura E.L., J.M. Campos, A. Bronzina & J.A. Cerisola. Antígenos de las fracciones subcelulares de *Trypanosoma cruzi*. I. Localización de antígenos y proteínas en las fracciones subcelulares. *Medicina (Buenos Aires).* 35: 451. 1975.
- Segura E.L., J. Búa, A. Rosenstein de Campanini, E. Subías, M. Esteva, M. Moreno & A.M. Ruiz. Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*: complement-mediated lytic activity against trypomastigotes and passive immunoprotection in mice. *Immunol. Letters.* 13: 165. 1986.
- Segura E.L. & A.M. Ruiz. Enfermedad de Chagas o Trypanosomiasis Americana. En *Enfermedad de Chagas y otras parasitosis. Manual de Laboratorio Instituto Nacional de Chagas Dr. Mario Fatała Chabén.* 1993.
- Seko Y., H. Matsuda, K. Kato, Y. Hashimoto, H. Yagita, K. Okumura & Y. Yazaki. Expression of intracellular adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by Coxsackievirus B3. *J. Clin. Invest.* 91: 1327. 1993.
- Sher A., R.T. Gazzinelli, I. Oswald, M. Clerici, M. Kullberg, E.J. Pearce, J. Berzofsky, T. Mossmann, S.L. James, H.B. Morse & G.M. Scearer. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infections. *Immunological Reviews* 127: 183. 1992.
- Silva J., D. Twardik & S.G. Reed. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in vitro and in vivo by transforming growth factor (TGF- β). *J. Exp. Med.* 174: 539. 1991.
- Silva J.S., P.J. Morrissey, K.H. Grabstein, K.M. Mohler, D. Andersson & S.G. Reed. Interleukin 10 and interferon- γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* 175: 169. 1992.
- Singer K.H., D.T. Tuck, H.A. Sampson & P. Hall. Epidermal keratinocytes express the adhesion molecule intercellular adhesion molecule-1 in inflammatory dermatoses. *J. Invest. Dermatol.* 92: 746. 1989.
- Skeiky Y.A.W., D.R. Benson, M. Parson, K.B. Elkon & S.G. Reed. Cloning and expression of *Trypanosoma cruzi* ribosomal protein P0 and epitope analysis of antibody-P0 autoantibodies in Chagas' disease patients. *J. Exp. Med.* 176: 201. 1992.

- Skeiky Y.A.W., D.R. Benson, J.A. Gunderian, P.R. Sleath, M. Parson & S.G. Reed. Trypanosoma cruzi acidic ribosomal P protein gene family. J. Immunol.151: 5504. 1993.
- Smith M.R. Direct evidence for an intracellular role for IFN γ . J. Immunol. 144: 1777. 1990.
- Smith M.R. Direct evidence for an intracellular role for tumor necrosis factor- α . J. Immunol. 144: 162. 1990.
- Snary D. Trypanosoma cruzi: antigenic invariance of the cell surface glycoprotein. Exp. Parasitol. 49: 68. 1980.
- Snary D., J.E. Flint, J.N. Wood, M.T. Scott, M.D. Chapman, J. Dodd, T.M. Jessell & M.A. Miles. A monoclonal antibody with specificity for Trypanosoma cruzi, central and peripheral neurones and glia cells. Clin. Exp. Immunol. 54: 617. 1983.
- Solari R. Identification and distribution of two forms of the interleukin 1 receptor. Cytokine 2: 21. 1990.
- Sosa Miatello C. & E.R. Fiorito. Ribosomal antibody response in rabbits and mice infected with Trypanosoma cruzi. Rev. Arg. Microbiol. 21: 141. 1989.
- Srinivasappa J., J. Saegusa, B.S. Prabhakar, M.K. Gentry M.J. Buchmeier, T.J. Wiktor, H. Koprowski, M.B. Oldstone & A.L. Notkins. Molecular mimicry: frequency of reactivity of monoclonal antiviral antibodies with normal tissues. J. Virol. 57: 397. 1986.
- Sterin-Borda L., G. Gorelik, A. Genaro, J.C. Goin & E.S. Borda. Human chagasic IgG interacting with lymphocyte neurotransmitter receptors triggers intracellular signal transduction. FASEB J. 4: 1661. 1990.
- Stewart, G.L. & S. Holmes Gianini. Sarcocystis, Trypanosoma, Toxoplasma, Brugia, Ancylostoma and Trichinella spp: a review of the intracellular parasites of striated muscle. Exp. Parasitol. 53: 406 . 1982.
- Strout R.G. A method for concentrating hemoflagellates. J. Parasitol. 48: 100. 1962.
- Suárez C., J.J. Puigbó, J.R. Nava Rhode, J.A. Valero & C. Gil Yépez. Estudio anatomopatológico de 210 casos de miocardiopatías en Venezuela. Act. Méd. Venez. 15: 320. 1968.

- Suárez C. Contribución al estudio de la enfermedad del Chagas. Parasitismo de la fibra miocárdica en la miocarditis crónica chagásica. Tesis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. 1976.
- Suárez C. La cardiomegalia en la miocarditis chagásica. Simposium Satélite Miocardiopatías. XXIV Congreso Venezolano de Cardiología. (en prensa).
- Suárez C., J.J. Puigbó, H. Giordano & L. Rumanoff. Alteraciones de la microvasculatura en la enfermedad de Chagas (en prensa).
- Sun J. & R.L. Tarleton. Predominance of CD8⁺ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute Trypanosoma cruzi infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 48(2): 161. 1993.
- Symons J.A., N.C. Wood., F.S. Di Giovine & G. Duff. Soluble IL-2 receptor in rheumatoid arthritis. J. Immunol. 141: 2612. 1988.
- Tafuri W.L. & M.T. de Almeida. Sobre o comportamento do componente vesicular neurosecretor no megaesofago da tripanosomiase cruzi humana. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 12: 298. 1970.
- Taliaferro W.H. & T. Pizzi. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi. J. Infect. Dis. 96: 199. 1955.
- Tamura A., N. Ohashi, H. Urakami, K. Takahashi & M. Oyanagi. Analysis of polypeptide composition and antigenic components of Rickettsia tsutsugamushi by polyacrilamide gel electrophoresis and immunoblotting. Infect. Immun. 48: 671. 1985.
- Tanowitz H.B., C. Brosnan, D. Guastamacchio, G. Baron, C. Raventos Suárez, M. Bornstein & M. Wittner. Infection of organotypic cultures of spinal cord and dorsal root ganglia with Trypanosoma cruzi. Am. J. Trop. Med. Hyg. 31: 1090. 1982.
- Tanowitz H.B., E.R. Burns & A.K. Sinha. Enhanced platelet adherent and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. Am. J. Med. Med. Hyg. 43: 274 . 1990.
- Tanowitz H.B., J.P. Gumprecht, D. Spurr, T.M. Calderon, M.C. Ventkura, C. Raventos-Suarez, S. Kellie, S.M. Factor, V.B. Hatcher, M. Wittner & W. Berman. Cytokine gene expression of endothelial cells infected with Trypanosoma cruzi. J. Infect. Dis. 166: 598. 1992.

- Tarleton R.L. & R.E. Kuhn. Restoration of in vitro immune responses of spleen cells from mice infected with Trypanosoma cruzi by supernatants containing interleukin-2. J. Immunol. 133: 1570. 1984.
- Tarleton R.L. Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. Clin. Exp. Immunol. 73: 186. 1988.
- Tarleton R.L. Trypanosoma cruzi-induced suppression of IL-2 production II. Evidence for the role of suppressor cells. J. Immunol. 140: 2769. 1988a.
- Tarleton R.L. Trypanosoma cruzi-induced suppression of IL-2 production I. Evidence for the presence of IL-2 producing cells. J. Immunol. 140: 2763. 1988b.
- Tarleton R. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with Trypanosoma cruzi. J. Immunol. 144: 717. 1990.
- Tarleton R.L. Regulation of immunity in Trypanosoma cruzi infection. Exp. Parasitol. 73: 106. 1991.
- Tarleton R.L. The role of T-cell subpopulations in experimental Chagas' disease. 36th Forum in Immunology. 130. 1991.
- Tarleton R.L., B.H. Koller, A. Latour & M. Postan. Susceptibility of β_2 -microglobulin deficient mice to Trypanosoma cruzi infection. Nature 356: 338. 1992.
- Tarleton R.L., J. Sun, L. Zhang & M. Postan. Depletion of T-cells subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. Infect. Immun. 62 (5): 1820. 1994.
- Teixeira A.R.L. & C.A. Santos - Buch. The immunology of Experimental Chagas' Disease II. Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi antigens. Immunology 28: 401. 1975.
- Teixeira A.R.L., G. Teixeira, V. Macedo & A. Prata. Acquired cell mediated immunodepression in acute Chagas' disease. J. Clin. Invest. 62: 1132. 1978.
- Teixeira M.M.G. & N. Toshida. Stage specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi identified by monoclonal antibodies. Mol. Biochem. Parasitol. 18: 271. 1986.

- Tekiel V.S., G.A. Mirkin & S.M. Gonzalez Cappa. Reactividad contra sistema nervioso (SN) en sueros de ratones crónicamente infectados con Trypanosoma cruzi. *Medicina* 53 (1): 88. 1993.
- Titus R.G., B. Sherry & A. Cerami. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 170: 2097. 1989.
- Titus R.G., B. Sherry & A. Cerami. The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. *Immunol. Today* 12: A13. 1992.
- Torrico F., H. Heremans, M.T. Rivera, E. V. Mark, A. Billiau & Y. Carrier. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute T. cruzi. *J. Immunol.* 146: 3626. 1991.
- Toyozaki T., T. Saito, H. Takano, K. Yorimitsu, S. Kobayashi, H. Ichikawa, K. Takeda & Y. Inagaki. Expression of intracellular adhesion molecule-1 on cardiac myocytes for myocarditis before and during immunosuppressive therapy. *Am. J. Cardiol.* 72: 441. 1993.
- Trichmann T.M. & B.R. Bloom. Trypanosoma cruzi: Ability of T cell enriched and depleted lymphocyte populations to passively protect mice. *Experimental Parasitology* 49: 225. 1980.
- Trischmann T. Non antibody mediated control of parasitaemia in acute experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* 130: 1953. 1983.
- Trinchieri G., M. Matsumoto-Kobayashi, S.C. Clark, J. Seehra, L. London & B. Perussia. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to IL-2. *J. Exp. Med.* 160: 1147. 1984.
- Truyens C., A. Agrelo-Barrios, F. Torrico, J. Van Damme, H. Hremans & Y. Carrier. Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with Trypanosoma cruzi: effect of paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. *Infect. Immun.* 62(2):692. 1994.
- Umera H., S. Schenkman, V. Nussenzweig & D. Einching. Only some members of gene family in Trypanosoma cruzi encode proteins wich express both trans-sialidase and neuraminidase activities. *EMBO J.* 11: 3837. 1992.
- Urakami H., N. Ohashi, T. Tsuruhara, A. Tamura. Characterization of polypeptides in *Rickettsia tsutsugamushi*: effect of preparative conditions on migration of polypeptides in polyacrilamide gel electrophoresis. *Infect. and Immun.* 51: 948. 1986.
- Van Snick J. Interleukin-6 an overview. *Ann. Rev. Immunol.* 8: 253. 1990.

- Van Voorhis W.C., L. Schlekewy & H. Le Trong. Molecular mimicry by Trypanosoma cruzi: the F1-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 5993. 1991.
- Van Voorhis W.C. Coculture of human peripheral blood mononuclear cells with Trypanosoma cruzi leads to proliferation of lymphocytes and cytokine production. Am. Assoc. Immunol. 148: 239. 1992.
- Vercelli D., H.H. Jabara, R.P. Lavener & R.S. Geha. IL-4 inhibits the synthesis of IFN- γ and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. J. Immunol. 144: 450. 1990.
- Vieira C.B., R.V. Godoy & C.F. Carril. Hypersensitivity of the large intestine to cholinergic agents in patients with Chagas' disease and megacolon. Rev. Bras. Gastroent. 16: 41. 1964.
- Vieira C.B. & R.V. Godoy . Hiperreatividade da musculatura Gástrica `a metacolina na moléstia de Chagas crónica. Hospital, 65: 359. 1964.
- Villalta F., L.M. Oda, J. Angluster, C.S. Alviano & W, Leon. Phagocytosis of the three developmental forms of Trypanosoma cruzi: effect of specific sera. Acta Tropica (Basel) 38: 375. 1981.
- Viotti A., G. Miguel & G. Mouzo. Abstract 3rd Argentinian Protozoology Congress, Buenos Aires, November. 1990.
- Weller A.H., K. Simpson, M. Herzum, N. Van Houten & S.A. Huber. Coxsackievirus-B3-induced myocarditis: virus receptor antibodies modulate myocarditis. J. Immunol. 143(6): 1843. 1989.
- Wendel S., J.C.P. Díaz. Transfusion transmitted Chagas disease. En Wendel S., Z. Brener, M.E. Camargo, A. Rassi, Chagas' disease (American Trypanosomiasis): its impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISTB. San Pablo 1992.
- Wheelock E.F. Interferon-like virus inhibitor induced by human leukocytes by phytohemagglutinin. Science. 149: 310. 1965.
- Weetman A.P., S. Cohen, M.W. Makgoba & L.K. Borysiewicz. Expression of an intercellular adhesion molecule, ICAM-1, by human thyroid cell. J. Endocrinol. 122: 185. 1989.

- WHO: Control of Chagas' disease. Technical Report Series Nº 811, Ginebra, 1991.
- Williams G.T. Control of differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Curr. Topic. Microbiol. Immunol. 117: 1. 1985.
- Winne de Martini, G.J., L. Abramo Orrego, A.M. de Rissio, M. Alvarez & L.P. Mujica. Cultivo de Trypanosoma cruzi en un medio monofásico. Su aplicación en cultivos en gran escala en procesos de fermentación. Medicina (Buenos Aires), 40 (Sup. 1): 109. 1980.
- Wirth J.J., F. Kierzenbaum, G. Sonnenfeld & A. Zlotnik. Enhancing effects of interferon-gamma on phagocytic cell association with and killing of Trypanosoma cruzi. Infect. Immun. 49: 61. 1985.
- Wirth J.J., F. Kierzenbaum & A. Zlotnik. Effect of Interleukin-4 on macrophage interactions with Trypanosoma cruzi: comparison with interferon- γ . FASEB J. 2: 916. 1988.
- Wood J.N., L. Hudson, T.M. Jessell & M. Yamamoto. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and Trypanosoma cruzi parasites. Nature (Lond.)296: 34. 1982.
- Xu B. & M.R. Powel. Carbohydrate epitopes are responsible for antibody cross-reactivity in Trypanosoma cruzi - infected mice, J. Parasitol. 77:808 . 1991.
- Yokota T., F. Lee, D. Rennick, C. Hall, N. Arai, T. Mosmann, G. Nabel, H. Cantor & K. Arai. Isolation and characterization of a mouse cDNA that expresses mast-cell growth factor activity in monkey cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 81: 1070. 1984.
- Yoshida N. Trypanosoma cruzi: recognition of surface antigens by lytic antisera from mice resistant to acute infection. Exp. parasitol. 61: 184. 1986.
- Yoshida N., R.A. Mortara, M.F. Araguth, J.C. Gonzalez & M. Russo. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50- kilodalton surface glycoconjugates of Trypanosoma cruzi. Infect. Immunol. 57: 1663. 1989.
- Younes B., A. Chennoufi, G. Said, H. Eisen, A. Durand & M. Hontebeyrie-Joskowicz. Cellular immunity to Trypanosoma cruzi is mediated by helper T cells (CD4⁺).Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82: 84. 1988.
- Zavala F., A.H. Cocrane, E.H. Nardin, R.S. Nussenzweig & V. Nussenzweig. Circumsporozoite proteins of malaria parasites contain a single immunodominant region with two or more identical epitopes.J. Exp. Med. 157: 1947. 1983.

- Zeledon R. Host-Parasite relationships in the vector. En WHO/PAHO: New approaches in Trypanosomiasis Research, PAHO Scientific Publication, Washington, 318: 9. 1975.
- Zeledon R., N.J. Alvarenga & K. Schosinsky. Ecology of Trypanosoma cruzi. En The insect vector. PAHO Scientific Publ., 1977.
- Zenian A. & F. Kierszenbaum. Inhibition of macrophage-Trypanosoma cruzi interaction by Concanavalin A and differential binding of bloodstream and culture form to the macrophage surface. J. parasitol. 68: 408. 1982.
- Zingales B. & W. Colli. Trypanosoma cruzi: interaction with host cells. Curr. Top. microbiol. Immunol. 117: 129. 1985.
- (Sin Autor). Tolerancia inmunitaria. Investigación y Ciencia. 1994.