

Tesis de Posgrado

Antígenos de la fracción flagelar de trypanosoma cruzi e inmunoprotección contra la enfermedad de Chagas experimental

Ruiz, Andrés Mariano

1983

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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:

Ruiz, Andrés Mariano. (1983). Antígenos de la fracción flagelar de trypanosoma cruzi e inmunoprotección contra la enfermedad de Chagas experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1805_Ruiz.pdf

Cita tipo Chicago:

Ruiz, Andrés Mariano. "Antígenos de la fracción flagelar de trypanosoma cruzi e inmunoprotección contra la enfermedad de Chagas experimental". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1805_Ruiz.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Antígenos de la Fracción Flagelar de
Trypanosoma cruzi e Inmunoprotección
contra la Enfermedad de Chagas
Experimental

Andrés Mariano Ruiz
Director de Tesis : Dra. Elsa Leonor Segura

Tesis presentada para Optar al Título de
Doctor en Ciencias Químicas

1805
Ej. 2

1983

INDICE

Dedicatoria	1
Antecedentes	2
Indice	5

INTRODUCCION

1. Antecedentes históricos, epidemiológicos y transmisión.	6
2. El parásito: <u>Trypanosoma cruzi</u>	11
2.1. Generalidades	11
2.2. Ubicación sistemática	12
2.3. Ciclo evolutivo	13
2.4. Estructura	15
2.5. Aislados de <u>T. cruzi</u>	17
2.6. Composición química y metabolismo	17
3. Relación huésped-parásito	23
3.1. Generalidades	23
3.2. Respuesta inmune	25
3.3. Mecanismos de defensa del parásito	31
4. Curso de la infección, patología y patogenicidad	32
5. Modelos experimentales	36
6. Quimioterapia y diagnóstico	39

7. Antígenos del <u>T. cruzi</u>	43
7.1. Generalidades y antecedentes	43
7.2. Inmunoprotección experimental	51
8. Objetivos del presente trabajo	59

MATERIAL Y METODOS

1. Obtención de materiales	60
1.1. Cultivo de <u>T. cruzi</u>	60
1.2. Ruptura de los parásitos	62
1.3. Obtención de la fracción flagelar	62
1.4. Obtención de la fracción Microsomal y Citoplasmática soluble	63
1.5. Conservación de la fracción flagelar por liofilización	65
1.6. Adyuvantes utilizados en los trabajos de inmunoprotección experimental	66
1.7. Preparación de los hiperinmunosueros	66
1.7.1. Adsorción de los antisueros	67
2. Caracterización de la fracción flagelar	67
2.1. Análisis electroforético de la fracción	67
2.1.1. Análisis del gel de poliacrilamida	69
2.1.1.1. Coloración para proteí <u>nas</u>	69

2.1.1.2.	Coloración para glico- conjugados	69
2.1.1.3.	Análisis por densitogra- fia.	70
2.2.	Análisis químico y enzimático	70
3.	Reactividad antigénica frente a hiperinmuno- sueros	70
4.	Experiencias de inmunoprotección	72
4.1.	Animales	72
4.2.	Estudios anatomopatológicos	72
4.3.	Estudios parasitológicos	73
4.4.	Estudios serológicos	73
4.5.	Esquema experimental	74
4.5.1.	Modelo de inmunización e infec- ción agudo	74
4.5.1.1.	Evaluación de la frac- ción flagelar liofilizi- zada	75
4.5.1.2.	Estudio de inmunopoten- ciadores de la activi- dad inmunogénica de la fracción flagelar	76
4.5.2.	Modelo de inmunización e infec- ción crónica	77

RESULTADOS

1.	Caracterización bioquímica de la fracción flagelar	80
----	---	----

1.1. Análisis electroforético	80
1.2. Determinaciones enzimáticas y rendimiento proteico	84
2. Análisis inmunoquímico	84
3. Modificación de la enfermedad de Chagas crónica mediante la inmunización con la fracción flagelar. Comparación con los efectos producidos por las fracciones microsomal, citosol y sedimento de 5000xg	86
3.1. Efecto de la fracción flagelar y antígenos de <u>T. cruzi</u> sobre ratones inmunizados en ausencia de infección	88
3.2. Efecto de la inmunización con la fracción flagelar para evocar resistencia contra la enfermedad de Chagas crónica.	90
4. Resistencia contra la infección aguda por <u>T. cruzi</u> , inducida por la inmunización de ratones con la fracción flagelar	92
5. Conservación de las propiedades inmunoprotectoras de la fracción flagelar al ser liofilizada	96
5.1. Mortalidad, parasitemia y anatomía patológica de los animales inmunizados con la fracción flagelar liofilizada	96
5.2. Anulación de la capacidad infectante de una suspensión de epimastigotes, al ser liofilizada	97
6. Ensayo de inmunopotenciadores para aumentar la resistencia contra la infección por <u>T. cruzi</u> de la fracción flagelar.	

RESUMEN Y CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFIA	121
APENDICE: Abreviaturas empleadas	136

A MIS PADRES

A MI ESPOSA

A MI HIJA

Agradezco especialmente a la Doctora
ELSA LEONOR SEGURA, directora de es-
ta tesis por haberme iniciado en la
investigación científica, por sus en-
señanzas y por guiarme en la realiza-
ción de este trabajo.

Agradezco también:

Al Doctor JUAN JOSE CAZZULO por la colaboración en la elaboración del presente trabajo, por su ayuda en la discusión de los resultados y por su constante apoyo en el trabajo diario.

A las Doctoras ALCIRA BATTLE DE ALBERTONI e INGE THIEL por su apoyo, ayuda y asesoramiento en la presentación de este trabajo.

A las Doctoras MONICA INES ESTEVA y ELISABET SUBIAS por su colaboración en todas las experiencias de inmunoprotección realizadas en este trabajo.

A los Doctores RUBEN LAGUENS y ADELINA RIARTE por su colaboración con los estudios histopatológicos a los resultados de este trabajo.

A la Señora ELENA R. DE LOZANO por su trabajo dactilográfico.

Al Doctor CARLOS E. DEL PRADO por la elaboración de las fotos presentadas en este trabajo.

Al Señor NELSON JAUREGUI por la confección de las figuras.

A todos los miembros del Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr.

Mario Fatala Chaben" que de distintas formas fueron colaboradores en la realización del presente trabajo.

A mis padres que con todo su esfuerzo y trabajo posibilitaron mis estudios y alcanzar esta meta.

Por último quiero agradecer muy especialmente a mi esposa y compañera, Silvia, por su comprensión y el apoyo moral y anímico brindado durante la realización de mi trabajo.

El presente trabajo experimental de esta tesis se efectuó con fondos provenientes del Ministerio de Salud Pública y Medio Ambiente, del Programa Nacional de Investigaciones de Enfermedades Endémicas de la Subsecretaría de Ciencia y Tecnología de la República Argentina y del Programa de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud.

Introducción

1. ANTECEDENTES HISTORICOS, EPIDEMIOLOGIA Y TRANSMISION DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

El agente causal de la enfermedad de Chagas es un protozooario (Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi) descubierto en el año 1909 por Carlos Chagas (60). Chagas denominó al parásito de este modo en homenaje Oswaldo Cruz, con quien trabajaba en ese momento efectuando un relevamiento de paludismo en trabajadores del ferrocarril en el estado de Minas Geraes, Brasil. En las heces del insecto hematófago Pastrongylus megistus, (Reduvidae), Carlos Chagas encontró las formas epimastigotes del parásito. Observó que las viviendas humildes estaban infestadas con triatomíneos hematófagos que se alimentaban de la sangre de los pobladores y de los principales animales domésticos. Además observó síntomas característicos de una enfermedad hasta entonces desconocida (61, 62) a la que llamó Trypanosomiasis Americana para diferenciarla de la Trypanosomiasis Africana producida por un parásito de la misma familia Trypanosomatidae.

Durante muchos años pocos investigadores prestaron atención al tema y pocos centros de salud mostraron interés en el estudio de esta nueva parasitosis. En 1926 algunos médicos argentinos encabezados por Salvador Mazza (136),

con la colaboración de Flavio Niño (148') comenzaron a trabajar en el tema introduciendo de este modo líneas de investigación para el conocimiento de la enfermedad.

Mediante la creación de la Misión de Estudios de Patología Regional (MEPRA) el estudio de la Trypanosomiasis americana llegó a la Universidad. Fue la Universidad de Buenos Aires la primera que en este sentido contribuyó a la extensión de los conocimientos sobre la existencia de esta enfermedad. El trabajo de estos jóvenes investigadores posibilitó que en otros países de América se comenzara a dimensionar una epidemia de singular importancia para el continente.

Lejos estaba Carlos Chagas en aquel entonces de imaginar que su hallazgo representaba una epidemia cuya prevalencia de infección es del 10% en Centro y Sudamérica (215).

El área de transmisión de la enfermedad de Chagas coincide con la de distribución del insecto vector. Su extensión es del sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el paralelo 42 en Argentina y Chile (215).

Probablemente por las condiciones de las zonas endémicas la infección por T.cruzi estuvo limitada al ciclo selvático hasta que el hombre penetró en este ambiente

con su vivienda asimilando de este modo la enfermedad y participando en el ciclo de vida del parásito (158).

Hoy conocemos que el ciclo domiciliario es el más importante y en él no sólo participa el hombre sino también los animales domésticos (perro, gato, etc) con los cuales convive (216). Hay también una íntima relación entre las zonas de menores recursos económicos, laborales y culturales y la prevalencia de la infección (21).

Se observa que el porcentaje de alteraciones electrocardiográficas en pacientes con infección crónica de la misma edad es diferente en las distintas áreas. Al mismo tiempo no todas las patologías en estos pacientes son iguales en las zonas estudiadas (21). Son actualmente objeto de estudio estas diferencias que probablemente se deberían a la participación de distintas cepas del parásito, las condiciones nutricionales y genéticas de la población humana, etc.

Se conoce que la dinámica de la infección por T.cruzi en distintas zonas endémicas muestra que el 50% de los casos seropositivos se alcanza a una temprana edad (12 o 13 años) (216).

Se ha observado una disminución de la prevalencia de la infección por T.cruzi en aquellas zonas donde se han

desarrollado campañas de desinsectación y atención sanitaria (188), mostrando de algún modo que el control integrado constituye un método de elección para la erradicación de la enfermedad.

Formas de transmisión de la infección

La forma natural de la transmisión de la infección por T.cruzi es mediante el vector, un insecto hematófago correspondiente a la familia Reduviidae que se alimenta de sangre de vertebrados. Distintas especies participan en esta forma de transmisión, hay sustanciales diferencias entre ellas y en los distintos dominios geográficos donde se las encuentra.

En Argentina el insecto vector de la enfermedad de Chagas es el Triatoma infestans, conocido vulgarmente con la voz quechua de vinchuca, debido al hábito de dejarse caer sobre el mamífero para alimentarse.

Muchos otros insectos hematófagos son potencialmente capaces de infectarse con el T.cruzi pero es importante recordar que para que una especie tenga importancia epidemiológica en la transmisión de la enfermedad de Chagas debe reunir ciertas condiciones: tener hábitos domiciliarios, alcanzar niveles de población suficientemente altos en relación con la cantidad de gente sobre la que se alimenta,

ser antropofila, ser buena receptora a la infección por T.cruzi y deyectar inmediatamente después de alimentarse (transmisión por estación posterior) (1).

Además de la transmisión con la participación de tria^utominos el hombre puede contraer la infección en ausencia de los mismos. La transfusión de sangre y la transmisión transplacentaria son los mecanismos que le siguen en importancia a la natural. (155). Todo infectado por T.cruzi presenta parásitos circulantes; aunque puede tener parási^utemias bajas y no detectables, son suficientes para trans^umitir la infección a un receptor. Existen dos formas posi^ubles de evitar el riesgo en un banco de sangre, el control serológico de la sangre a transfundir o bien el tratamien^uto de la misma con violeta genciana, droga con actividad tripanocida in vitro (151) pero que tendría algunos efec^utos colaterales (52).

La transmisión congénita sigue en importancia. ha si^udo comunicada por varios investigadores (17,61,67,97,174) y alcanzaría al 2 o 3% de los hijos de madres chagá^usicas (181). En Argentina hay comunicaciones relaciona^udas con esta forma de transmisión y las mismas varían con^usiderablemente entre la zona endémica e una zona suburba^una no endémica, en cuanto a la incidencia. (18).

Otra forma de contaminación aunque no frecuente es la infección accidental en los laboratorios, existen numerosos casos generalmente controlables, en el manipuleo de material que contiene parásitos y en el trabajo con animales infectados.

2. EL PARASITO: TRYPANOSOMA CRUZI

2.1 Generalidades

El T.cruzi se halla en tres formas diferentes morfológicamente relacionadas con los distintos medios donde se encuentra en su ciclo de vida.

Los amastigotes, organismos de forma esférica u ovalada de unos 2 μ m de diámetro representan una forma de multiplicación intracelular. A pesar de que su nombre indica ausencia de flagelo, se ha observado recientemente que lo poseen aunque es muy pequeño y no se encuentra libre.

Los tripomastigotes tienen el cinetoplasto situado detrás del núcleo y un flagelo que acompaña a toda la membrana ondulante a lo largo del organismo. Su longitud es de 20 μ m. Esta forma es no multiplicativa y constituye la forma infectante. La forma que se encuentra en la luz del recto de los insectos hematófagos recibe el nombre de tripomastigote metacíclico, y presenta diferencias con las for-

mas sanguineas circulantes.

2.2 Ubicación sistemática

El T.cruzi pertenece a la familia Trypanosomatidae que se caracteriza por tener un flagelo y cinetoplasto únicos. El género Trypanosoma comprende a parásitos digenéticos que tienen por lo menos en uno de sus estadios de desarrollo la forma tripomastigote. Hoare (96) divide a este género en dos secciones: Salivaria y Estercoraria. La primera comprende a organismos patógenos a la que pertenecen los trypanosomas que se multiplican en el mamífero en el estadio tripomastigote y completan su desarrollo en la estación anterior del insecto vector y son transmitidos por inoculación. El Trypanosoma equipardum constituye una excepción ya que se transmite de mamífero a mamífero directamente. La segunda sección de especies no patógenas a excepción de T.cruzi se multiplican en el huesped como amastigotes o epimastigotes y completan su desarrollo en el intestino posterior del vector y son transmitidos por contaminación. Trypanosoma rangeli pertenece a esta sección pese a que se transmite por estación anterior, por inoculación.

La ubicación sistemática de T.cruzi es según Hoare:
TIPO: Protozoa (Goldfuss, 1818)

SUBTIPO: Saccomastigophora (Honigberg y Balamuth, 1963)
SUPERCLASE: Mastigophora (Dresing, 1866)
CLASE: Zoomastigophora (Calkins, 1909)
ORDEN: Kinetoplastida (Honigberg, 1963)
SUBORDEN: Trypanosomatina (Kent, 1880)
FAMILIA: Trypanosomatidae (Doflein, 1901)
GENERO: Trypanosoma (Gruby, 1843)
SUBGENERO: Schizotrypanum (Chagas, 1909)
ESPECIE: cruzi (Chagas, 1909)

2.3 Ciclo evolutivo

En la naturaleza el ciclo de vida de T.cruzi se desarrolla con la participación de un insecto vector y del huésped vertebrado. Los parásitos del vector (tripomastigotes metacíclicos) son depositados sobre la piel del huésped conjuntamente con la deyección del insecto. El T.cruzi no tiene capacidad de atravesar la epidermis pero penetra por el orificio de picadura del triatomino o por la mucosa cercana a la picadura cuando la deyección es extendida casualmente por el efecto del rascado. El parásito puede penetrar en los tejidos del hospedador, penetrar las células y una vez dentro de ellas se diferencia a amastigote, forma bajo la cual se multiplica por división binaria simple.

Los amastigotes se diferencian a tripomastigotes abandonando la célula invadida por ruptura de la misma. Estas formas son diseminadas por circulación y son capaces de infectar e invadir otras células, repitiendo de esta forma el ciclo en el mamífero. Por otro lado los parásitos en circulación constituirán la oferta necesaria para la infección de otro insecto por la ingestión de sangre infectada.

Los tripomastigotes a medida que se acercan a la luz del intestino se ensanchan y se acorta el flagelo diferenciándose a epimastigote (27) el que se multiplica activamente en la región media del intestino. Estos epimastigotes se diferencian a formas metacíclicas en la ampolla rectal del insecto (222). El insecto al alimentarse defeca mientras come y en las deyecciones habrá parásitos que pueden penetrar a los tejidos de la forma descripta, cerrando el ciclo en la naturaleza.

El estadio epimastigote se obtiene fácilmente in vitro, tanto en cultivo monofásico como bifásico (30); las formas amastigotes (153) y tripomastigotes (100, 217, 218) se han obtenido con mayor dificultad en medios monofásicos. Los tripomastigotes pueden obtenerse in vitro por infección de cultivo de células (179).

2.4 Estructura del parásito

El T.cruzi mide según su forma de desarrollo entre 5 y 25 μm de largo por 3 a 5 μm de diámetro. Este parásito tiene una mitocondria única que presenta una parte especializada, llamada cinetoplasto donde se encuentra el ácido desoxiribonucleico (ADN) mitocondrial. El ADN está rodeado por una doble membrana cuya naturaleza mitocondrial se demuestra por la presencia de crestas mitocondriales en la membrana interna (27). Tanto en epimastigotes como en tripomastigotes se demostró la naturaleza única del complejo mitocondria-cinetoplasto (27). El ADN del cinetoplasto se presenta en forma de círculos dispuestos en forma de ocho, y constituye aproximadamente el 20% del ADN total de la célula (68).

Las diferentes formas del parásito presentan el nacimiento del flagelo adyacente al cinetoplasto hacia la parte anterior o posterior del parásito (96). El aparato de movimiento (mastigón) está constituido por el flagelo y el cuerpo basal (citosoma). Esta estructura cilíndrica está formada por nueve tripletes de microtubulos y se proyecta sobre el bolsillo flagelar. Tiene una parte netamente citoplasmática y otra zona de transición hacia el flagelo, ambas separadas por un septum.

El flagelo esta compuesto por nueve pares de microtúbulos periféricos y uno central, los que continúan con el axonema. El par central desaparece en la parte distal del flagelo. La vaina flagelar es una extensión tubular de la membrana celular. Además de los microtúbulos longitudinales, el flagelo presenta una banda estriada que mide alrededor ^{de} 0.15 μm de diámetro compuesta de varios filamentos paralelos a los microtúbulos del axonema y por filamentos oblicuos que unen a los longitudinales. Esta banda se extiende a lo largo del flagelo, hasta el bolsillo flagelar. En el tripomastigote el flagelo se adhiere a la membrana ondulante en esta región.

En los epimastigotes el flagelo emerge desde la región lateral anterior y en los tripomastigotes nace desde el extremo apical posterior del parásito con respecto a la dirección del movimiento del mismo. En el amastigote la posición del cuerpo basal es variada.

El núcleo de T.cruzi es de naturaleza fibrilar con acúmulos de material genético contiguos a la membrana cuando el parásito comienza la división celular.

La membrana plasmática tiene fundamental importancia en la interacción huesped-parásito. Existen evidencias que la membrana es diferente en las distintas formas del

parásito. La membrana plasmática propiamente dicha tiene un espesor de 8 a 10 nm, se encuentra recubierta por una cubierta superficial, con un espesor de 5 nm en el epimastigote. Por debajo de la membrana del lado citoplasmático, se encuentra el armazón de microtúbulos.

Se ha observado que los epimastigotes se lisan por acción directa del complemento y que las formas circulantes son resistentes salvo que hayan sido previamente tratadas con enzimas (116) o con anticuerpos (118).

2.5 Aislados de T.cruzi

Numerosos estudios han sido realizados sobre distintos aislados de T.cruzi, se han efectuado caracterizaciones desde el punto de vista antigénico y bioquímico. Actualmente se conoce que dichos aislados provenientes de pacientes, vectores o animales infectados, hasta ahora llamados cepas, constituyen una mezcla de poblaciones diferentes (71) y los clones de un mismo aislado presentan características distintas (23,71).

2.6 Composición química y metabolismo

La mayoría de los autores que trabajan en este tema están de acuerdo en subrayar que T.cruzi no almacena polisacáridos (30). Es posible que los oligo y polisacáridos, encontrados en el parásito (89) no sean sustan-

cias de reserva sino la parte glucídica de las glicoproteínas de membrana (7,90).

Con respecto al metabolismo de carbohidratos T.cruzi metaboliza activamente la glucosa (11) y también otros azúcares^{que} son incorporados mediante transporte activo a través de la membrana.

T.cruzi degrada glucosa en aerobiosis y anaerobiosis. En el primer caso el producto final no es únicamente anhídrido carbónico sino que se produce una verdadera fermentación aeróbica, liberándose al medio cantidades importantes de acetato, succinato y en algunos casos L-malato (43). En anaerobiosis se liberan al medio los mismos compuestos en mayor proporción y además pequeñas cantidades de lactato, pese a la presencia de una alfa-hidroxiácido dehidrogenasa (80) con actividad de lactato dehidrogenasa (80). Esta enzima de la cual se han detectado isoenzimas (54), estaría involucrada en un efecto de lanzadera para el transporte de equivalentes de reducción entre la mitocondria y el citosol.

La vía glucolítica es la vía fundamental por la cual se produce la degradación de la glucosa. Otra vía degradativa de la glucosa presente aunque cuantitativamente menos importante es la vía de las pentosas (43). T.cruzi

y Trypanosoma brucei presentan la mayoría de las enzimas glucolíticas compartimentalizadas en un organoide especializado, llamado glicosoma (92).

El catabolismo de la glucosa tiene por característica principal a la fermentación aeróbica que lleva a la excreción de ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos como el succínico y L-málico. Para este proceso es esencial la fijación de anhídrido carbónico (26), que se lleva a cabo con la participación de una carboxiquinasa fosfoenol pirúvica (42) presente en el glicosoma (40). La enzima málica, de la cual se encuentran presentes dos isoenzimas con diferentes propiedades cinéticas y regulatorias (41), presentes una en el citosol y la otra en la mitocondria (48,40,49) esta involucrada en la decarboxilación de ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos para su catabolismo, con la producción de NADPH con fines biosintéticos. Sus propiedades regulatorias y distribución intracelular, permitirían su funcionamiento sin interferencia con la producción y excreción de succinato.

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos opera en T.cruzi (212) y han sido detectadas la mayoría de las enzimas involucradas en el mismo (106,105)

Se encuentra también presente en las tres formas del

parásito una cadena respiratoria integrada por citocromos aa₃, b, c₅₅₈ y probablemente citocromo o. Las partículas submitocondriales son capaces de oxidar succinato, alfa glicero fosfato y NADH (200).

La oxidación de sustratos por T.cruzi está acoplada a la fosforilación para lo cual hay evidencias indirectas (199); T.cruzi presenta una actividad de ATPasa mitocondrial sensible a oligomicina (77,178), la cual sería responsable de la fosforilación oxidativa, actuando como ATP sintetasa al igual que en las mitocondrias de otras células.

Los lípidos constituyen hasta un 20.1% del peso seco de los epimastigotes de cultivo de T.cruzi (28). Entre los esteroides el principal sería colesterol seguido por ergosterol (35). Los epimastigotes de los aislados Tulahuén, ES y Brasil mostraron la presencia de glicéridos, esteroides, glucolípidos y fosfolípidos y dentro de los ácidos grasos los predominantes fueron los no saturados encontrándose una proporción de ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono (34). Los epimastigotes del aislado Tulahuén son capaces de sintetizar ácidos grasos y lípidos complejos a partir de ¹⁴C acetato.

Los epimastigotes de cultivo contienen aproximadamente entre un 43 y 53% de proteínas referidas al peso seco (29). Las proteínas y algunos aminoácidos pueden ser utilizados por los epimastigotes como fuente de energía cuando se los desarrolla en medio libre de azúcares (221). En este caso se produce una alcalinización del medio de cultivo debido a la liberación de NH_3 , no excretándose urea (220). Las enzimas del metabolismo de ornitina y arginina no están presentes en T.cruzi (159).

Se ha observado la presencia de transaminasas (221) y de enzimas que intervienen en el metabolismo del L-glutamato, aspartato aminotransferasa, glutamato dehidrogenasa NADP dependiente (47,108) y glutamato dehidrogenasa NAD dependiente (44,21). Ambas glutamato dehidrogenasas son inhibidas por reactivos de tioles (46,107) y por suramina (76). La enzima NADP dependiente muestra variaciones considerables en diferentes aislados de T.cruzi (214) mientras que la glutamato dehidrogenasa NAD dependiente no presenta variaciones importantes (211).

Existen en los epimastigotes diferentes enzimas proteolíticas, las cuales han sido demostradas usando sustratos estandar, proteínas o sintéticos (13,22,100,163,21,101) o bien utilizando sustratos endógenos en extractos de epimastigotes libres de células (24,45).

El ADN de T.cruzi ha sido objeto de profundos estudios y la utilización de enzimas de restricción para la degradación de los minicírculos del ADN cinetoplástico ha sido propuesta para la identificación de cepas y aislados de T.cruzi (78,135,145).

La biosíntesis de ácidos nucleicos ha sido poco estudiada, aunque se ha encontrado una ADN polimerasa y tres ARN polimerasas separables entre sí por cromatografía con DEAE-celulosa (191).

De los ácidos ribonucleicos presentes en T.cruzi sólo los ARN ribosomales han sido estudiados en cierto detalle. Se han encontrado diferencias importantes entre los coeficientes de sedimentación de los ARN ribosomales y subunidades ribosomales del epimastigote y los de células de mamífero (células HeLa). Los ARN ribosomales de T.cruzi (26S y 21S) se formarían a partir de un precursor único con un coeficiente de sedimentación de 31S. La antigenicidad de los ribosomas ha sido puesta de manifiesto mediante su capacidad para estimular y detectar anticuerpos fijadores de complemento (130).

3. RELACION HUESPED PARASITO

3.1 Generalidades

La gran variedad de efectos patológicos que pueden estar relacionados a la infección por T.cruzi en el huésped vertebrado, muestra que la comprensión de la interacción del parásito con el hospedador es de suma importancia para su explicación. Las condiciones generadas por la infección varían desde la ausencia de manifestaciones clínicas hasta cuadros agudos que pueden llevar a la muerte. Del mismo modo la prevalencia de sintomatologías netamente diferentes en diversas zonas del continente demuestra la importancia de la interacción de poblaciones del parásito y del huésped.

El T.cruzi una vez en el interior del huésped, puede penetrar en las células y comenzar su multiplicación y diferenciación. Tiene una fuerte tendencia a invadir fibras musculares en especial músculo esquelético (87) aunque es también frecuente encontrarlo en otros tejidos. Dentro de la célula los parásitos se reproducen y diferencian y luego de abandonar la célula provocan en los primeros días de infección un gran número de parásitos en circulación. Esto es modificado posteriormente por la respues

ta inmune del huésped que en cierta forma es capaz de controlar la propagación de la infección aunque no logra eliminarla. De esta forma existiría un equilibrio entre la respuesta inmunológica del hospedador y el parásito que permite en muchos casos el transcurso de la infección hacia una etapa crónica asintomática solo detectable por la presencia de anticuerpos específicos y muy bajas parasitemias.

Interacción parásito-macrófago

Parece evidente que todos estos efectos son causa del comportamiento del parásito en relación con los primeros componentes del huésped en el momento de la infección. En 1955 Talliaferro y Pizzi observaron parásitos dentro de macrófagos (205). Muchos autores discuten como ocurre este proceso. Se sostiene una fagocitosis por las células especializadas (142, 150) o bien una invasión a estas por los tripomastigotes, lo cual fue comprobado inhibiendo la actividad fagocitaria de los macrófagos y observando la penetración a los mismos de T. cruzi. De todos modos el parásito penetra en ellos y luego actúa como en cualquier otra célula (142, 150). Se ha observado que los epimastigotes y los tripomastigotes metacíclicos de cultivo son captados por el macrófago más fácilmente que los tripomastigotes circulantes (4, 149). Los epimastigotes son destruídos

por el macrófago mientras que los metacíclicos y tripomastigotes no sólo sobreviven sino que son capaces de infectarlo (32).

Actualmente se conoce la existencia de por los menos dos tipos de tropismo para diferentes aislados de parásitos: macrófago-trópicos y miotrópicos (32). Además ciertos aislados interactúan con los macrófagos a través de sitios de reconocimiento entre el parásito y la célula, que son destruidos por el tratamiento con pronasa (32). Los macrófagos activados específica o inespecíficamente con BCG, u otros tripanosomatidos han sido capaces de destruir al tripomastigote circulante. Esto ocurre al utilizar células macrofágicas normales y podría deberse a una cooperación con linfocitos T (32).

El hecho que existan aislados con diferente comportamiento frente a los macrófagos podría indicar que el equilibrio huesped-parásito presente en cada individuo respondería a estas diferencias y por lo tanto que la participación de uno u otro aislado parasitario lo modificaría sustancialmente.

3.2 Respuesta inmune

Respuesta humoral

En pacientes o en animales infectados se ha observado

la presencia de anticuerpos contra T.cruzi. Estos anticuerpos han sido dosados por distintas técnicas serológicas y son actualmente el fundamento utilizado en el diagnóstico de la infección (91,50).

El primer anticuerpo que se detecta después de la infección es la inmunoglobulina de tipo M (IgM) que aparece al comienzo de la misma, le sigue la inmunoglobulina G (IgG) que persiste mientras dura la infección (88,212). La posibilidad de detectar inmunoglobulinas específicas M o G facilita el reconocimiento de infecciones recientes o crónicas (88).

Actualmente se comcen algunos aspectos del papel de estos anticuerpos en la resistencia contra la infección, in vitro los anticuerpos lisan tripomastigotes sanguíneos de algunas cepas de T.cruzi en presencia de complemento (118,120), más aún, la depleción de complemento agrava la infección a ratones (32). Sin embargo no se conoce el valor de este mecanismo in vivo, ya que se han detectado inmunoglobulinas específicas en el suero de animales conjuntamente con el aumento de parasitemia. Esta lisis es mediada por complemento activado por la vía alternativa según lo demostró Krettli utilizando inhibidores específicos de la misma (118,120).

Varios autores han demostrado que el tratamiento con suero inmune al comienzo de la infección inducía una resistencia específica en animales de experimentación (204), sin embargo hay otros autores que afirmarían lo contrario (119, 139). El hecho que algunas cepas no induzcan actividad neutralizante (modificaciones en la virulencia de las mismas) aunque sean capaces de inducir anticuerpos, detectados por técnicas serológicas, podría explicar la discordancia entre estos resultados (82).

Hay también notables diferencias entre las distintas cepas en relación con la susceptibilidad a los inmunosue-ros (118,139).

La participación de los anticuerpos en los mecanismos de protección en la infección aguda es evidente, ya que se ha demostrado el aumento de la gravedad de la enfermedad en animales deficientes de linfocitos B, por lo tanto bajos respondedores de anticuerpos (114, 171).

Se conoce que los anticuerpos juegan un papel importante en la reacción contra tejidos del huesped en la enfermedad de Chagas. Cossio y col en 1974 observaron la presencia de anticuerpos reaccionantes contra membrana plasmática de células de miocardio y músculo esquelético (55,56) También se han descripto anticuerpos que reaccionan

con antígenos de las células de la vaina de Schwann (antinervio periférico) (110).

Aún no se conoce si la presencia de estos anticuerpos presentes en pacientes chagásicos con cardiopatía están relacionados con el grado de lesión orgánica. Apparentemente no se discute su participación aún cuando no se conocen los mecanismos involucrados en el desarrollo de la lesión tisular (203,165,166,56,208).

Respuesta celular

La infección por T.cruzi genera una respuesta inmune mediada por células (IMC) que se puede evidenciar in vitro (32). También se ha propuesto la existencia de cierto grado de inhibición de IMC en caso de enfermos crónicos con sintomatología característica de la enfermedad de Chagas (154,144). Estudios in vivo sobre hipersensibilidad retardada realizados mediante pruebas intradérmicas muestran resultados contradictorios en relación a la respuesta de los pacientes (32,82,209).

Las pruebas experimentales señalan que la IMC opera en la resistencia contra T.cruzi, así, animales timectomizados o tratados con sueros antitimocitos o ratones congénitamente atímicos no resisten a la infección, en compa-

ración con los animales no tratados y eutímicos (203,115,180 169,186) mostrando un aumento notable de la parasitemia y muerte. Se han efectuado experiencias de transferencia adoptiva de células totales del bazo, con buenos resultados, aunque al ser utilizadas estas células se corre el riesgo de transferir aquellas formadoras de anticuerpos (32,168,36).

La efectividad de mecanismos de citotoxicidad en la destrucción de epimastigotes y tripomastigotes de T.cruzi con la participación de células inmunocompetentes ha sido informada por varios autores (32,112,116,176) aunque coinciden en señalar la activa participación de anticuerpos en dichos mecanismos.

Así como se ha demostrado el papel de los anticuerpos en la autoagresión del huésped, se demostró la presencia de actividad destructiva de ciertas células involucradas en la respuesta celular contra tejidos normales del huésped (177). Algunos autores han demostrado la existencia de linfocitos T citotóxicos para tejido muscular y nervioso en ratones (165,166)

Inmunodepresión

La respuesta inmune del huésped juega un papel importante en la defensa contra la infección por T.cruzi, aunque

esta no es del todo eficaz para rechazar la infección le permite llegar a un estado de equilibrio con el parásito. La ruptura de este equilibrio en beneficio del parásito puede modificar el cuadro de la enfermedad con el consiguiente perjuicio para el huésped.

En otras enfermedades o en el caso de transplantes de órganos, los pacientes deben recibir tratamiento con drogas inmunosupresoras. La posibilidad de modificar el equilibrio parásito-huésped y de crear infecciones exacerbadas por el estado de inmunosupresión, preocupa a numerosos investigadores.

Se han realizado estudios en pacientes que debieron ser tratados con drogas inmunosupresoras por distintas razones, y los resultados son variados, algunos autores han observado reagudizaciones de la enfermedad mientras que otros no han encontrado modificaciones sustanciales (33,14,143).

La información actual sobre inmunosupresores en la etapa crónica, no es suficiente para formar una opinión exacta en este sentido. En la etapa aguda la infección se exagera, como se ha observado en casos fatales de Chagas agudo provocados después de transplantes. Esta

es una llamada de atención que obliga a controlar la infección parasitaria al dador y receptor de órganos.

3.3 Mecanismos desarrollados por el parásito para evadir la respuesta inmune

La infección por T.cruzi produce una respuesta inmunológica en el huésped que tiene la capacidad de agredir y otra de destruir al parásito pero en todos los casos el huésped quedará infectado toda su vida, debido a que no hay curación espontánea en la enfermedad de Chagas. Esta infección coexistirá con una respuesta inmune operante. Esto implicaría que ella no es completamente efectiva o bien que el parásito de alguna manera tiene mecanismos para eludirla.

La capacidad del parásito de invadir células y de reproducirse dentro de ellas lo favorece pues lo aísla de la respuesta inmune. Las formas expuestas a esta, las formas circulantes, poseen la capacidad de eliminar los anticuerpos pegados sobre su superficie, mediante exocitosis de los complejos antígeno-anticuerpo previa formación de casquetes (caps) (86,129,182). Muchos autores han informado un estado de inmunosupresión a causa de la infección (32, 162, 59).

Otro mecanismo de defensa del parásito es la fábula-
ción. (121). Ciertos componentes solubles serían libera-
dos por las formas circulantes, para efectuar un cliva-
je de los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas pegadas
sobre su superficie, impidiendo de esta manera la acción
de ciertos mecanismos de defensa como la lisis mediada
por complemento.

Hasta el momento no se ha demostrado variación anti-
génica para el T.cruzi pero esta posibilidad aún no de-
be descartarse.

4. CURSO DE LA INFECCION, PATOLOGIA Y PATOGENIA

4.1 Curso de la infección

La enfermedad de Chagas muestra diferentes fases en
el hospedador vertebrado.

Un primer periodo, con proliferación de amastigotes
una vez que la forma infectante penetró en el huésped,
la explosión de las células infectadas y la infección de
nuevas células mediante formas circulantes, sirve de
introdutoria a la instalación de la fase aguda de la en-
fermedad, caracterizada principalmente por fiebre y he-
patosplenomegalia. En algunas ocasiones se puede observar

el "chagoma", lesión cutánea nodular de puerta de entrada del parásito. Cuando esta vía es la conjuntival puede producirse una lesión edematosa en el párpado, complejo oftalmo ganglionar (signo de Romana) (138).

La fase aguda va acompañada por un aumento de parásitos en circulación generalmente detectables por los métodos parasitológicos corrientes. En los tejidos se encuentran células parasitadas e infiltración en masa de células mononucleares. Ambos pueden originar lesiones graves que pueden determinar la muerte del paciente (62,133).

Superada la fase aguda, al existir todos los mecanismos inmunes activados, el paciente pasa a una forma crónica asintomática que puede durar indefinidamente o evolucionar hacia la etapa crónica sintomática.

La fase crónica de la infección por T.cruzi se caracteriza principalmente por una parasitemia difícilmente detectable y la permanencia de anticuerpos específicos que pueden ser evidenciados por cualquier método serológico. Durante este periodo se instalan lentamente las alteraciones características de la enfermedad crónica: la miocarditis chagásica crónica y las megavisceras intestinales.

4.2 Patología y patogenia

Cuando el T.cruzi penetra en el hospedador, las primeras células invadidas son los macrófagos. Las células parasitadas, al romperse desencadenan fenómenos inflamatorios inespecíficos constituidos por un infiltrado inicial de polimorfonucleares y neutrofilos seguido de células mononucleares, que se acompaña de edema.

En el periodo agudo las lesiones histológicas son generalmente inflamatorias y están en relación con la presencia de nidos de amastigotes en los tejidos, en algunos casos destruidos (9).

Aunque el parásito puede encontrarse en diferentes órganos y en el interior de cualquier célula, tiene cierta tendencia a invadir músculo esquelético o cardíaco y actuar sobre el sistema nervioso central. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son miocarditis o meningoencefalitis.

En pacientes que han fallecido en la etapa aguda de la enfermedad se han encontrado parásitos con relativa facilidad en la observación histológica de miocardio. Se ha observado también que las fibras musculares están disociadas por la presencia de infiltrados mononucleares y de edema, pudiendo encontrarse disminuidos el número

de ganglios del sistema nervioso autónomo (8, 131). Se ha descrito también que en el periodo agudo existen lesiones degenerativas del sistema nervioso autónomo (10). En sistema nervioso central se han encontrado focos de infiltrados mononucleares con afluencia de células macrofágicas (10, 143).

En la transmisión congénita de la infección, esta podría producirse antes del quinto mes de embarazo. Aunque es poco frecuente hay que pensar en una placentitis chagásica (18). Cuando la placenta de una paciente con serología reactiva para Chagas se encuentra engrosada y pálida macroscópicamente, y microscópicamente presenta infiltrados de células mononucleares a nivel de vellosidades y entre ellas, el trofoblasto se encuentra parcialmente destruido y hay parásitos en las células Hofbauer, esto indica la presencia de una placentitis chagásica. Las lesiones histológicas en el niño son similares a las descritas en la infección aguda.

En parte de los infectados aparecen las lesiones del periodo crónico propiamente dicho, especialmente en el corazón y tubo digestivo, así se han descrito en corazón, aneurisma de punta de ventrículo izquierdo como consecuencia de trastornos del sistema de conducción (10).

Se han encontrado zonas de trombosis mural a nivel de ventrículo izquierdo. Microscópicamente se han informado áreas de fibrosis e infiltrados mononucleares en ausencia de parásitos.

Las fibras musculares fragmentadas con infiltrados adiposos originan una miocarditis microfocal característica de esta etapa de la enfermedad y responsable del electrocardiograma patológico (10,172). Se ha descrito que existe una distribución preferencial a nivel de la parte derecha del Haz de His (8).

La destrucción neuronal del sistema nervioso autónomo sería la responsable de las lesiones en el tubo digestivo, esta destrucción sería la causa principal de la inducción de megavisceras (10,206).

La patogenia de las lesiones presentes en este periodo no está aún totalmente aclarada.

5. MODELOS EXPERIMENTALES

El cuadro agudo de la enfermedad de Chagas es fácil de reproducir experimentalmente, de hecho muchos estudios han sido desarrollados en este modelo. Sin embargo teniendo en cuenta que la historia natural de esta enfermedad es más compleja que un simple primer estado agudo, se hace

necesario conocer y reproducir el estado crónico. En los últimos años se ha avanzado en tal sentido trabajando en ratones, conejos, perros y primates no humanos.

El ratón es uno de los animales que más se ha empleado y en el cual se han obtenido los mejores resultados hasta el presente. La infección aguda con la utilización de dosis adecuadas para cada cepa de ratón ha sido exitosa logrando la muerte de los animales en periodos puntuales. Se han observado considerables diferencias entre cepas de ratones y también según el sexo de los animales (32). Cuando se utilizan bajas dosis de parásitos un porcentaje de los animales logra sobrevivir evolucionando hacia la enfermedad crónica. Existen además cepas de T.cruzi que no producen mortalidad y el total de los ratones evolucionan al estadio crónico, con altas parasitemias (10, 84).

El 50% de los animales infectados con 25 tripomastigotes presentan lesiones características en miocardio (infiltración mononuclear focal) generalmente predominante en el atrio y en la zona atrioventricular (122).

También se ha descrito miocarditis crónica presente en corazones que macroscopicamente mostraban dilatación con aneurisma de punta y con trombosis intracar-

díaca (10). Las alteraciones electrocardiográficas también han sido encontradas en ratones infectados con bajas dosis de parásitos, cuyas principales características son alteraciones del tamaño del QRS (123).

A nivel de músculo esquelético los ratones presentan lesiones más intensas que en el miocardio. Esta miositis se caracteriza por presentar áreas de infiltrados mononucleares que a través del tiempo van reemplazándose por células adiposas. Los nidos de amastigotes frecuentemente han sido encontrados en músculo esquelético.

Se desarrolló un modelo experimental en conejos, logrando inducir en estos animales una miocarditis crónica con alteraciones electrocardiográficas tanto por infección como por inoculación de una fracción subcelular de T.cruzi sedimentada a 100 000 xg, obtenida de un homogeneizado de amastigotes y tripomastigotes (208). También se han encontrado lesiones histológicas compatibles con la enfermedad de Chagas crónica en ratas (164).

Los perros de pocos meses de vida son poco resistentes a la infección aguda provocada al utilizar dosis que el animal adulto resiste. El perro adulto presenta una infección sin evolución hacia la enfermedad crónica, reproduciendo algunas alteraciones electrocardiográficas e histológicas

características (10, 124)

Finalmente se han informado varios estudios sobre primates no humanos de distintas especies, donde se han reproducido alteraciones electrocardiográficas y lesiones tisulares (20).

El modelo ratón a pesar de sus limitaciones para extrapolarse a la enfermedad humana es probablemente el más útil por su fácil manejo y disponibilidad. Sin embargo es importante continuar las investigaciones en animales superiores de interés ya por su cercanía filogenética con el hombre (mono) como por su importancia en el ciclo de transmisión del parásito en las zonas endémicas (perro) (216), con el fin de reproducir la historia natural de la enfermedad. Estas investigaciones aportan resultados útiles en los ensayos inmunológicos y terapéuticos.

6. QUIMIOTERAPIA Y DIAGNOSTICO

6.1 Quimioterapia

Experimentalmente se han ensayado numerosas drogas con efecto tripanomicida de las cuales sólo unas pocas han sido utilizadas en la clínica médica.

La bisquinaldina (Cruzón) fue una de las primeras sustancias utilizadas en el humano, la misma fue encontrada

activa en formas de meningoencefalitis aguda (137). Se ensayaron derivados de las 8 aminoquinolinas, utilizadas en el tratamiento del paludismo, con un éxito parcial (98). Con los compuestos arsenicales trivalentes, útiles en el tratamiento de la Trypanosomiasis Africana, se obtuvieron resultados totalmente negativos (81).

Derivados de los nitrofuranos parecen mostrar la mayor actividad antiparasitaria. El nifurtimox presentó un importante efecto tripanomicida (19,192) aunque investigadores de Argentina y Brasil informaron resultados diferentes, atribuibles probablemente a la participación de distintas cepas del parásito en la naturaleza (38,39,51). Las diferencias tienen también relación con la zona geográfica, así este fármaco presenta mayor efecto terapéutico en el sur de Brasil, Argentina y Chile y bajo en centro y norte de Brasil.

El nifurtimox que se administra oralmente produce una serie de efectos colaterales caracterizados por cefaleas, anorexia, pérdida de peso, trastornos gástricos, excitación, neuritis periférica, etc. Estos efectos son reversibles al suspender el tratamiento.

Actualmente se trabaja sobre los efectos del nifurtimox sobre las células de los mamíferos. Se conoce que el

mecanismo de acción de la droga implica la formación de radicales libres, modificación en las membranas celulares (69) y alteraciones estructurales en testículo de ratón (146).

Otra droga actualmente aplicada es el nitroimidazol (Benznidazol) altamente activa (51), del mismo modo que la anterior con un amplio espectro de efectos colaterales, eritema cutáneo urticariante y maculoso, trastornos hematopoyéticos, etc.

No existe hasta el momento una quimioterapia ideal, aunque, en los casos de infección aguda tanto el nifurtimox como el benznidazol producen un blanqueo parasitológico y negativización de la serología. En la etapa crónica se aconseja cautela en su uso.

6.2 Diagnóstico

El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en su etapa aguda se efectúa mediante técnicas sencillas de búsqueda del parásito en circulación, gota gruesa, Strout (201), o bien por medio de técnicas como el xenodiagnóstico (53,58,134) o el hemocultivo (2,64,160) ambos con alta sensibilidad. Esta etapa de la infección se caracteriza por presentar un alto nivel de formas circulantes del parásito y baja cantidad de anticuerpos es-

pecíficos, por esta razón los métodos parasitológicos son de gran utilidad.

En la etapa crónica de la infección los niveles de parasitemia disminuyen a valores en la mayoría de los casos no detectables. En este caso el diagnóstico parasitológico sólo podría limitarse al xenodiagnóstico y hemocultivo con una sensibilidad no mayor al 50% en ambas pruebas. En cambio la serología se convierte en la forma más certera de diagnóstico de laboratorio en esta etapa. Actualmente se emplean técnicas como la inmunofluorescencia (IFI) (5) o ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) (198), fijación de complemento (FC)(91), hemaglutinación indirecta (HAI) y aglutinación directa (AD) (213), que muestran una alta sensibilidad en la detección de anticuerpos específicos. La reacción de IFI y AD que utilizan antígenos de superficie del parásito, son las que aparecen reactivas más precozmente, en el curso de la infección.

La sensibilidad de las reacciones serológicas oscila entre un 95 y 100% y su especificidad es alta, salvo que se evalúen sueros de pacientes que padecen alguna otra tripanosomiasis o leishmaniosis.

7. ANTIGENOS DE T. CRUZI.

7.1. Generalidades.

Observando el ciclo de vida del T. cruzi podemos pensar que la composición antigénica de este protozoario debe ser compleja y que muchos de sus componentes forman parte de la interacción del parásito con el medio donde se encuentra. Es fácil pensar que la membrana del parásito juega un papel fundamental en este sentido. Por esta razón ha sido objeto de numerosos estudios morfológicos, bioquímicos e inmunológicos.

Se conoce que las infecciones con trypanosomas del grupo brucei en el hombre y en los animales producen numerosos picos de parasitemia a lo largo de mucho tiempo (57) y se sabe que los trypanosomas correspondientes a esos picos son antigénicamente diferentes, durante el curso de la infección (57). Esta variación antigénica en la membrana del parásito podría ser un mecanismo de evasión del mismo a la respuesta inmune del huésped.

Hasta el presente no se ha observado variación antigénica de T. cruzi, es más, en numerosos estudios se informa que no habría (194).

Los primeros estudios sobre antígenos se desarrollaron tratando de caracterizar distintas cepas de T.

cruzi y se ha informado la existencia de diferencias antigénicas en este sentido (83 , 109 , 152), aunque hasta el momento no se ha podido establecer perfiles relacionables con la distribución geográfica de tipos clínicos producidos por los diferentes aislados del parásito; la posibilidad que estos aislados estén formados por muchas poblaciones diferentes fué explorada en varios aspectos (71).

Muchas infecciones por protozoarios incluyendo T. cruzi muestran la presencia de antígenos circulantes (12 , 90 , 65) y algunos autores han informado la presencia de estos exoantígenos en infecciones agudas experimentales (12 , 32) y demuestran que algunos podrían ser capaces de inducir inmunoprotección (90 , 102). Es posible que los exoantígenos sean análogos a los antígenos liberados por células infectadas cuando ellas provocan la liberación de los trypomastigotes (165). Muchos componentes y complejos moleculares han sido hallados como antígenos solubles (12 , 90) y algunos estudios demostrarían que ellos provienen de la superficie del parásito.

La superficie del T. cruzi como la de la mayoría las células tiene carbohidratos y glicoconjugados, al-

gunos importantes receptores para muchas células (6 , 63 , 125 , 196). Se han ensayado alrededor de 30 lectinas diferentes, con especificidad para N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, D-galactosa, D-manosa y ácido siálico y todas han aglutinado al menos una forma del parásito.

Un conjunto de glicoproteínas y un glicolípido fueron aislados de epimastigotes por extracción fenólica (6 , 7). El análisis de la fracción glicolipídica mostró una variedad de componentes incluyendo lípidos, fósforo, bases (esfinganinas), carbohidratos y aminoácidos (63 , 127 , 126): El complejo de glicoconjugados estaba formado por tres glicoproteínas de distinta movilidad electroforética. Estos estudios fueron realizados en la cep Y. Algunas fracciones subcelulares de epimastigotes de la cepa Tulahuén también mostraron la misma composición en glicoconjugados (173). Fracciones de epimastigotes de la misma cepa, atenuada en su infectividad por sucesivos pasajes en medio de cultivo mostraron algunas diferencias con respecto a la original; en este sentido (128).

Las glicoproteínas encontradas parecen no contener aminoácidos aromáticos y no se marcan in vivo o

in vitro con lactoperoxidasa y ^{131}I y no son retenidas por columnas de lectinas de Lens culinaris ligada a agarosa (6 , 7).

Seneca en 1966 indujo una inmunoprotección en ratones utilizando un extracto fenólico (191), sin embargo no se tiene información acerca de los efectos de los glicoconjugados purificados, en este sentido. Se demostró que aquel extracto crudo cuando era utilizado en altas concentraciones era tóxico para los ratones inmunizados (191).

Snary en 1979 obtuvo una glicoproteína presente en las tres formas del parásito. Amastigotes, tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Y, marcados con ^{125}I , lisados y cromatografiados en columna de lectina de Lens culinaris ligada a agarosa, mostraron tener en su superficie una glicoproteína de peso molecular 90 KD. Este glicoconjugado sería invariable y antigénico e inoculado a ratones en presencia de adyuvantes, mostró una protección parcial. En suero de pacientes con estadio crónico de la enfermedad, se demostró la presencia de anticuerpos contra esta glicoproteína (193,196 ,197).

Nogueira y col. han encontrado en tripomastigotes sanguíneos la misma glicoproteína de 90 KD, retenida

— por Concanavalina A ligada a agarosa, con un punto isoeléctrico de 5.0, que justificaría la considerable carga negativa de los tripomastigotes, los autores también demostraron que sueros de pacientes crónicos fueron capaces de precipitarla (149) y han propuesto que la misma sería responsable de propiedades antifagocíticas de las formas circulantes sanguíneas (149).

Otra glicoproteína específica de la forma epimastigote fué identificada por Nogueira y col, con un peso molecular de 75 KD, de punto isoeléctrico 7.2 y con marcación, retención por Con A-agarosa y precipitación por suero similares a la glicoproteína principal de peso molecular 90 KD. Estas dos glicoproteínas son producto de genes diferentes, pues presentan mapas peptídicos (por digestión con tripsina y quimiotripsina) diferentes y no tienen reactividad inmunológica crzada (149).

Snary y col. en 1981 aislaron una glicoproteína de peso molecular 72 KD específica de epimastigotes, empleando anticuerpos monoclonales, probablemente la misma identificada por Nogueira (149). Este compuesto indujo una inmunoprotección en ratones los cuales fueron desafiados con formas metacíclicas, pero no fueron pro

tegidos los animales desafiados con formas sanguíneas (193, 195).

El hecho que los antígenos de membrana sean los primeros reconocidos por el sistema inmune ha llevado a muchos autores al estudio de los mismos con fines de obtener un inmunógeno útil para ser utilizado como vacuna.

La purificación de estructuras ligadas a la membrana plasmática ha sido encarada por distintos métodos (66 157 185 190) pero aún no han sido fraccionadas y purificadas para encontrar sus componentes inmunologicamente activos. La fracción flagelar proveniente de un fraccionamiento por centrifugación diferencial y ulterior purificación en un gradiente de densidad de sacarosa por ultracentrifugación, de un homogeneizado de epimastigotes (Tulahuén) rotos por presión y descompresión mostró propiedades inmunoprotectoras en ratones luego del desafio con formas sanguíneas circulantes (187 ,190). Una fracción de membranas purificadas por el mismo método mostró menor efectividad que la fracción flagelar (190) lo cual podría deberse a una diferente presentación de los antígenos al sistema inmune más que a una real diferencia en la composición de ambas fracciones. Otras fracciona

nes subcelulares obtenidas por fraccionamiento por centrifugación diferencial, mostraron características inmunogénicas, bioquímicas y ultraestructurales diferentes entre sí. El sedimento de 105 000 x g presentó todos los glicoconjugados obtenidos en la cepa Y por extracción fenólica (173).

Afchain y col. identificaron una serie de antígenos por inmunoelectroforesis usando sueros hiperinmunes de conejo contra epimastigotes (3). Una de las líneas de precipitación producidas en el gel fué utilizada para inmunizar conejos. Los antisueros obtenidos fueron utilizados para purificar antígenos de superficie de T. cruzi y no presentaron reactividad cruzada con otros trypanosomatidos, incluyendo varias cepas de leishmania (3).

El tema de purificación de antígenos de T. cruzi ha sido encarado por muchos autores con distintos objetivos. Por un lado es conocida la necesidad de contar con antígenos específicos del parásito, que permita un mejor diagnóstico serológico. Muchas infecciones provocadas por otros trypanosomatidos incluyendo leishmanias inducen anticuerpos en el huésped que son capaces de reaccionar contra T. cruzi y viceversa, desde el momento

que hay una gran cantidad de antígenos compartidos entre estos parásitos (82). Por otro lado se conoce la capacidad de ciertos antígenos de evocar una respuesta autoinmune en ausencia de infección (210), y otros involucrados en la inducción de resistencia del huésped a la misma.

Los mecanismos involucrados en la inducción de patología por estos antígenos aún se desconocen aunque hay informaciones que aseguran la activa participación del sistema inmune en la formación de la misma (56).

Una probable reacción cruzada entre T.cruzi y tejidos de corazón y nervioso de mamíferos fue observada en pacientes chagásicos (56,167). Los autores relacionaron la presencia de anticuerpos involucrados en esa reactividad cruzada con la instalación de la patología crónica de la enfermedad de Chagas. Scott y col. demostraron que no había identidad entre la glicoproteína de peso molecular 90 KD purificada por Snary y el antígeno reconocido por un anticuerpo monoclonal proveniente de T.cruzi, que tuvo reacción cruzada con neuronas de mamífero (196,183).

Las técnicas de producción de hibridomas (117), que han sido utilizadas con éxito en la producción de anticuerpos monoclonales para el estudio y purificación de antígenos protectores de Malaria (219,75) pueden representar un camino alternativo en el conocimiento de los antígenos del T.cruzi, y mediante estas técnicas de purificación lograr separar aquellos componentes del parásito responsables de la agresión y protección.

7.2 Inmunoprotección experimental

La posibilidad de obtener protección contra T.cruzi ha sido estudiada por diversos autores y con variados resultados. El uso de parásitos vivos atenuados, muertos, fracciones subcelulares, macromoléculas y otros flagelados análogos, han sido el fundamento de todos los estudios, utilizándolos como elementos para proteger experimentalmente animales ante un desafío de formas virulentas del parásito.

Distintos inmunógenos han sido empleados con referencia a este tema: podemos agrupar a estos en tres grandes categorías: parásitos vivos, parásitos enteros muertos y homogeneizados totales, y fracciones de los mismos. En el primer grupo encontramos aquellos que son capaces de infectar entre los cuales se hayan las cepas atenua-

das naturalmente. Menezes y col en 1969 y 1971 (140,141) inmunizó huéspedes vertebrados con formas de cultivo provenientes de una cepa de T.cruzi atenuada mediante el pasaje sucesivo del parásito en cultivo (PF). De este mismo modo se logró obtener una línea no infectiva de la cepa Tulahuén (189), sus efectos inmunizantes fueron ensayados en ratones con un alto grado de protección (37); sin embargo esta cepa recobró la infectividad mediante su pasaje en sangre (189). Varios grupos han seguido esta línea de investigación para obtener una posible vacuna. El hecho que se pueda inducir una activa infección por la inoculación de organismos con virulencia residual y la posible recuperación de esta, en aquellos supuestamente atenuados torna discutible y desaconsejable la obtención de una vacuna por esta vía (15,16).

Se han empleado también parásitos con alta virulencia inyectando dosis subletales y cepas virulentas con tratamiento paralelo del huésped con tripanomicidas. El conocimiento actual sobre estos fármacos y sus efectos tornarían difícil la prosecución de esta línea de trabajo (73,74).

En el grupo de parásitos no infectantes aquellos atenuados por agentes externos, se encuentran los apor-

tes de Hungerer y col. en 1976 (99), que utilizaron el bromuro de etidio aboliendo la capacidad infectante de los trypanosomas. En este caso los resultados fueron negativos. Esto fue comprobado por Brener y col. posteriormente, observando que los ratones inmunizados y desafiados presentaban altas parasitemias (31).

Fernandes y col. mostraron que formas de cultivo tratadas con actinomicina D retenían la movilidad de los parásitos y se inhibía su multiplicación y diferenciación. Con parásitos así tratados inmunizó ratones que tuvieron una protección parcial ante el desafío con T.cruzi (73,74).

Trypanosomátidos monogénéticos que aparentemente presentaron una reacción cruzada con antígenos provenientes de T.cruzi, también protegieron ratones.

Johnson y col. en 1963 (102) y Pereyra y col. en 1977 (157) utilizaron Crithidia fasciculata y Souza y col. en 1971 y 1974 (202) aislaron un flagelado Herpetomonas samuelpessoai obteniendo protección en ratones. Los mismos autores informaron otras experiencias con resultados negativos.

Muchos autores usaron formas de cultivo muertas por agentes químicos tales como el merthiolate (147),

formaldehido (95) y perclorato de sodio (111), como agentes inmunizantes. Todos ellos han comunicado sólo una protección parcial. Hanson y col. en 1976 (94) utilizaron parásitos irradiados como vacuna en ratones, obteniendo sólo una baja protección de los mismos.

Mejores resultados fueron obtenidos con vacunas de parásitos desintegrados y fracciones del mismo. Goble y col. en 1974 (82) obtuvieron un notable aumento de la sobrevivencia de los ratones inmunizados con parásitos rotos con sonicador. Neal y col. en 1977 (148) obtuvieron similares resultados al utilizar homogeneizados provenientes de una ruptura mediante congelamiento y descongelamiento. En 1968 Gonzalez Capa y col. (88) y Segura y col. en 1977 (190), utilizaron formas de cultivo rotas por presión y descompresión, para inmunizar ratones, obteniendo protección en los animales. En estos experimentos se demostró que la mayor presión desnaturalizaba los antígenos protectores. Variando la presión utilizada durante la ruptura de los parásitos se obtuvieron preparaciones con diferente grado de actividad. Así, utilizando una presión de 3000 kg/cm^2 el homogeneizado total de los epimastigotes protegió al 43% de los ratones. Cuando el homogeneizado se preparó a 1200 kg/cm^2

sobrevivió el 73% de los animales, y al usar 600 kg/cm^2 la protección fue del 92%. Esto indicó que altas presiones abolían la actividad protectora. El homogeneizado preparado a 600 kg/cm^2 disminuía su capacidad protectora si se lo inoculaba cuatro horas después de su preparación mientras que si se rompía a 140 kg/cm^2 se conservaba ésta por encima de las 12 horas (88).

Actualmente se está trabajando en la obtención de ciertas proteínas de membrana de T.cruzi y algunos autores han efectuado planes de inmunización de ratones. observando una sobrevivencia de los animales inoculados con este tipo de glicoconjugados (197).

La presunta existencia de una reacción cruzada entre los antígenos de T.cruzi y tejidos del huésped, demuestran la importancia de investigar inmunógenos no constituidos por parásitos enteros o extractos totales. El estudio de fracciones subcelulares que podrían proteger ante un desafío, no dando efectos de autoinmunidad aparecería como un camino alternativo en este sentido. En 1977 Segura y col. demostraron que la fracción flagelar proveniente de un fraccionamiento por centrifugación diferencial y posterior purificación por gradientes de densidad producía una alta protección en ratones

ante el desafío de formas sanguíneas virulentas.

Cuando las fracciones subcelulares se evaluaron en cuanto a su capacidad de evocar una respuesta inmunoprotectora en ratones, se observó que la fracción que sedimenta a 1000 x g mostró la mayor protección de los animales, conjuntamente con el homogeneizado total como es de esperar.

Estos resultados llevaron a profundizar más el estudio de esta fracción, es así que fue sembrada en un gradiente discontinuo de sacarosa, que fue ultracentrifugado a 90 000 xg. Los autores obtuvieron tres bandas y un precipitado, y al estudiarlos por microscopía electrónica observaron que la banda 1 estaba compuesta por membranas y los flagelos del parásito, la banda 2 por membranas, la banda 3 por núcleos y restos celulares y el precipitado por cinetoplastos (184,190). Cuando se ensayaron estas bandas en pruebas de inmunización se obtuvo que la banda enriquecida en flagelos mostró los mayores porcentajes de protección. Se realizaron estudios a fin de evaluar número de dosis, proteínas suministradas para optimizar la inmunización (88,190).

Gonzalez Capa y col. determinaron en 1980 que sueros de ratones inmunizados con la fracción flagelar no

tenían actividad lítica sobre tripomastigotes sanguíneas. (85), esto indicaría que al menos en estos animales no habría relación entre la respuesta inmunoprotectora y la actividad lítica de los anticuerpos involucrados (85). Hajos y col. en 1982 aislaron mediante inmunoadsorción a partir de la fracción flagelar anticuerpos provenientes de pacientes crónicos humanos. Estos resultados contrastan con los obtenidos en ratones sobre la participación de la respuesta inmune humoral (93).

Con el mismo enfoque de análisis de los antígenos de T.cruzi a través de las fracciones subcelulares Kaneda y col. en 1973 (108) demostraron que una fracción ribosomal (150 000 xg) tendría propiedades inmunizantes. Sin embargo esta fracción es una de las que produjeron lesiones tisulares y alteraciones electrocardiográficas en conejos (208). También se comprobó que no sólo la fracción microsomal de T.cruzi produce lesión sino también la de otro flagelado tiene efectos similares (C.fasciculata) (104).

Es importante hacer notar que una vacuna además de no ser infectante debe conferir protección total al huésped tornándolo inmune a la infección por T.cruzi.

Las vacunas que inducen infecciones atenuadas y confieren una protección parcial no serían útiles para combatir la enfermedad y no recomendables en la actual fase de los conocimientos. No hay ninguna demostración de que una infección chagásica que se instale sin curso detectable no provoque manifestaciones clínicas tardías de la enfermedad. Una vacuna que confiera protección parcial permitiendo la instalación de una infección crónica desde el comienzo, se contrapone con uno de los principales objetivos de la inmunoprotección que es el control de la enfermedad, ya que mantendría importantes focos de infección en la cadena epidemiológica. Por esto se puede decir que una simple supervivencia de los animales no es, de ninguna manera, indicio de protección contra la enfermedad de Chagas, y estas investigaciones deberían acompañarse con estudios histológicos, electrocardiográficos y parasitológicos a largo plazo. Para ello es fundamental contar previamente con buenos modelos experimentales crónicos que reproduzcan la evolución de la enfermedad del humano.

8. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Los objetivos de este trabajo fueron:

Investigar los efectos agresivos y protectores que produce la inmunización con fracciones subcelulares de epimastigotes de T.cruzi sobre el ratón, ya sea por si solas o cuando los animales, después de la inmunización reciben un desafío de parásitos infectantes.

Caracterizar bioquímicamente a la fracción flagelar capaz de evocar una respuesta inmunoprotectiva, frente a la infección por T.cruzi en animales de experimentación.

Conservar las propiedades de esta fracción, mediante su liofilización.

Inmunopotenciar sus propiedades inmunoprotectoras con el uso de adyuvantes

Materiales y métodos

1. OBTENCION DE MATERIALES

1.1. Cultivo de T. cruzi

El aislado Tulahuén utilizado en este trabajo fué aislado de un triatomino en Chile en 1945 (161) y ha sido conservado mediante pasajes en animales y medio de cultivo. En nuestro laboratorio la lí
ne
ue
nea de cultivo/reaislada de ratones mediante el empleo de un medio de cultivo bifásico compuesto de dos fases; una líquida y otra sólida. La fase líquida contiene 2.8 gr % p/v de infusión cerebro-corazón (Difco) y 1 % p/v de glucosa, la fase sólida contiene 1.5 % de agar, 1.3 % de agar nutritivo (Difco), 0.8 % NaCl y el agregado de 2 % de sangre desfi
br
in
ada
brinada de conejo.

También se mantiene por sucesivos pasajes en ratones de 30 gr y de 60 días de edad, con un inóculo por vez de 300.000 parásitos por ratón. Estos animales infectados hacen un pico de parasitemia entre los 10 y 12 días post-infección, cuando se produce su muerte.

5×10^3 (5 DL50) parásitos provenientes de la sangre de ratones infectados inoculados en ratones Balb/c de 70 días de edad producen la muerte del 100 % de éstos entre los 12 y 14 días. Cuando se utiliza trypomastigotes provenientes de materia fecal de triatominos infectados (10^3 par/raton) entre el 60 y 100 % de los animales muere entre los 20 y 30 días post-inoculación.

Se han utilizado en este trabajo dos medios de cultivo bifásico: uno de mantenimiento y otro de recolección de los parásitos, la

diferencia entre ambos es que en el segundo la fase sólida no contiene sangre defibrinada de conejo.

Erlenmeyers conteniendo 30 ml de fase sólida son autoclavados a 0.5 atmósferas durante 20 minutos, cuando el medio se enfría a 50°C se agrega esterilmente la sangre de conejo, en el caso de la preparación del medio de mantenimiento. Veinticuatro horas después de mantenidos los erlenmeyers a 37°C como prueba de esterilidad, se les agrega 5 ml de fase líquida conteniendo entre 0.4 y 4×10^6 parásitos por ml. El crecimiento de los mismos se desarrolla a 30°C y 50 % de humedad relativa ambiente.

La curva exponencial de crecimiento llega a su máximo a los siete días, tiempo en el cual los parásitos son repicados. El pasaje a medio de recolección se efectuó mediante la transferencia a éste en la fase líquida de 0.4 a 4×10^6 parásitos por ml, en un volumen igual al empleado para los repiques en el medio de mantenimiento. En este medio los parásitos alcanzan su máximo punto de crecimiento a los cinco días post-siembra, tiempo al cual se efectúa la colección de los mismos. El cultivo muestra un 99 % de formas epimastigotes con un 1 % de tripomastigotes.

Previamente a la recolección del material se observó cada erlenmeyer individualmente, descartando cualquier tipo de contaminación ya sea macroscópica o microscópica (microscopía óptica). Del mismo modo se evaluó el estado de los parásitos desde el punto de vista de su mor-

fología descartando cualquier alteración.

La recolección de los parásitos se efectuó recogiendo los sobrenadantes (fase líquida) y lavando el agar con una solución de 0.25 M de Sacarosa y 5 mM de KCl (SKS). Los parásitos fueron lavados en la misma solución, por sedimentación mediante centrifugación a 5000xg durante 20 minutos en una centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B, Du Pont Instruments, Newtown USA) a 4°C, tres veces. El precipitado final obtenido se resuspendió 1:10 p/v en SKS y se conservó a 4°C hasta el momento de la ruptura.

1.2. Ruptura de los parásitos.

Los parásitos fueron rotos por presión y descompresión utilizando un desintegrador Sorvall-Ribi (I. Sorvall Inc. Connecticut, USA). El procedimiento se llevó a cabo a 4°C en todas las etapas. Se comprimió la suspensión de parásitos a 140 Kg/cm² y la cámara de ruptura fué saturada en una atmósfera de N₂ con una velocidad de paso de 2.5 ml del gas/min. En estas condiciones los parásitos son desintegrados y la observación al microscopio electrónico muestra una buena conservación de estructuras relacionadas con membranas nuclear y plasmática (184).

1.3. Obtención de la Fracción flagelar.

El homogeneizado proveniente de la ruptura por presión y descompresión, fué centrifugado a 1000xg durante 15 minutos a 4°C en un rotor Sorvall HB4. El sedimento fué resuspendido 1:5 p/v y sembrado en un gradiente discontinuo de sacarosa -5mM KCl. El gradiente fué

preparado en tubos de polialomero de 34 ml de capacidad (Beckman, C326825, Beckman Instruments, Inc. California, USA) utilizando tres diferentes molaridades de sacarosa: 2.2, 1.9 y 1.53 M. El gradiente recibió una siembra de 2 ml y se centrifugó durante 60 minutos a 90000 xg a 4°C, en un rotor Beckman SW 25.1, en una ultracentrífuga preparativa Beckman L5 65B (Beckman Inst. California, USA).

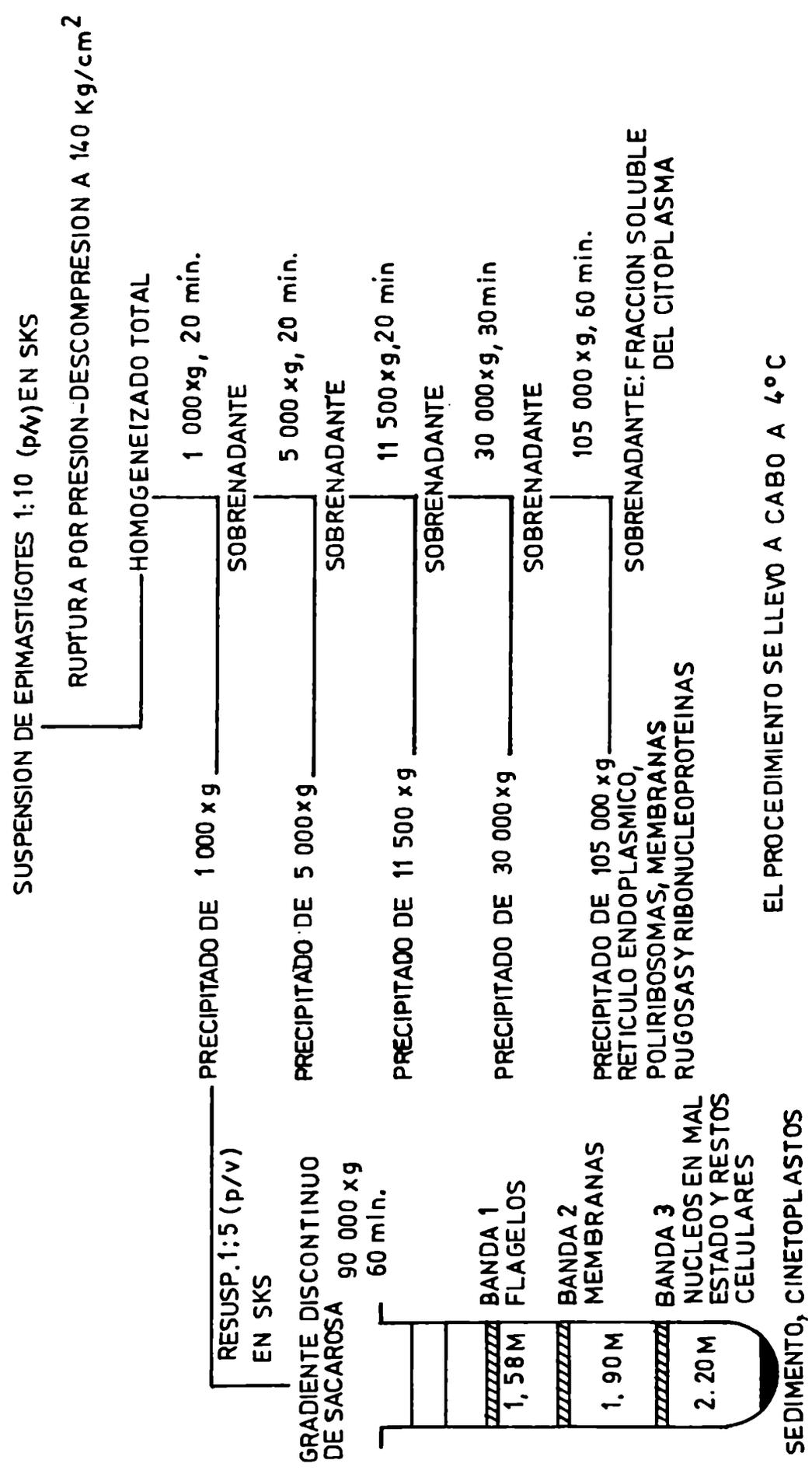
Se obtuvieron las siguientes fracciones: un precipitado que atravesó la capa de 2.2 M compuesto por cinetoplastos, una banda frenada por la molaridad 2.2 constituida por núcleos y restos celulares, otra ubicada en la zona de molaridad 1.9, constituida por membranas y la tercera frenada por la molaridad 1.58 enriquecida en flagelos (184), denominada flagelar (F).

1.4. Obtención de la fracción Microsomal y Citoplasmática soluble.

El esquema del fraccionamiento subcelular se muestra en la Fig. 1. Del sobrenadante de la centrifugación a 1000xg se partió para la obtención del resto de las fracciones subcelulares. Las centrifugaciones (Centrífuga Sorvall RC5B) a 5000 y 11500xg se realizaron en un rotor Sorvall HB4 y la de 30000xg usando un rotor Sorvall SS34. La centrifugación a 105000xg se realizó en un rotor Beckman T.40, utilizando una ultracentrífuga preparativa Beckman L565B.

La observación por microscopía electrónica indicó que el precipitado de 105000xg denominado microsomal (Mc) contenía retículo endoplásmico, polirribosomas, membranas rugosas, ribonucleoproteínas y fragmen-

FIGURA I : ESQUEMA DE LA SEPARACION DE FRACCIONES SUBCELULARES POR CENTRIFUGACION DIFERENCIAL Y PURIFICACION DE LA FRACCION FLAGELAR



tos de membrana plasmática. La fracción soluble llamada citoplasmática soluble o citosol, contenía todos los componentes celulares no ligados a fracciones particuladas (72).

Una vez obtenidas, las fracciones fueron lavadas 2 veces con SKS a igual fuerza centrífuga que la utilizada durante su obtención, luego pesadas y nuevamente resuspendidas 1:5 (p/v).

1.5. Conservación de la fracción flagelar por liofilización.

Para la conservación de la fracción flagelar se procedió en primer lugar a dializar el material, para disminuir la concentración de sacarosa, contra agua destilada o 0.15 M de NaCl durante dos o tres horas respectivamente hasta alcanzar una concentración de 0.25 M de Sacarosa, controlada por refractometría (equipo LCC, Lab. Crudo Camaño) Para su liofilización, el congelamiento de las ampollas se efectuó mediante el uso de una mezcla refrigerante carbónica, con un gradiente de temperatura de aproximadamente 3°C por minuto, con una rotación constante sobre su eje longitudinal para favorecer el congelamiento en una fina capa alrededor de las paredes de la ampolla. La liofilización se llevó a cabo en volúmenes de 0.5 ml, en ampollas colocadas en un accesorio multibocas de un equipo LARK 2 (FIC Buenos Aires, Argentina), durante 2 hs.

La fracción flagelar si es congelada y descongelada rápidamente antes de su liofilización pierde en parte sus propiedades de inducir resistencia contra la infección por T. cruzi, esto ha sido aprovechado

para utilizarlo como inmunógeno capaz de mostrar la actividad de un adyuvante.

1.6. Adyuvantes utilizados en los trabajos de inmunoprotección experimental.

En este trabajo se utilizaron cuatro tipos de adyuvantes: Corynebacterium parvum (Cp), cepa CN6134 (Wellcome Research Laboratories, Beckenham, Ing.), Bordetella pertussis (Bp), cepa 10536 (Instituto Malbrán, Buenos Aires, Argentina),* Bacille Calmette Guerin (BCG), cepa 1173P2 (Instituto Malbrán, Buenos Aires, Argentina), Adyuvante Incompleto de Freund (AIF), (Difco Laboratories, Detroit, Michigan USA) y Saponina (Quillaia) (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, USA)

1.7. Preparación de Hiperinmunosueros.

Los sueros hiperinmunes contra las fracciones Flagelar, Microsomal y Citoplasmática soluble se prepararon en conejos (156). Cada animal recibió 10 mg de proteínas en un volumen de 1 ml e igual cantidad de adyuvante completo de Freund (ACF). Se aplicó sobre el lomo del conejo 20 inoculaciones subcutáneas de 0.1 ml de la emulsión dispuestas en dos hileras de 15 cm de longitud cada una y separadas a una distancia de 3-4 cm entre sí. Los animales recibieron tres dosis cada veinte días, alternando el sector de lomo en cada inoculación. Veinte días después de la última inoculación los conejos recibieron una hiperimmunización por vía intraperitoneal de 20 mg de proteínas sin adyuvante. Al cabo de seis días se efectuó una sangría de prueba y en caso de presentar

alto título de reactividad ante su antígeno homólogo comprobado por inmunodifusión en agar, los animales se sacrificaron sangrándolos por punción cardíaca. De la sangre una vez coagulada, se separó el suero.

1.7.1. Adsorción de los antisueros.

Un mililitro de cada uno de los antisueros fué adsorbido con 20 mg de proteínas totales de cada una de las otras dos fracciones y con ambas al mismo tiempo. También se reservaron antisueros sin adsorber.

Todos los hiperinmunosueros fueron adsorbidos con albúmina bovina, para evitar reacciones inespecíficas en las pruebas de reactividad antigénica sobre papel de nitrocelulosa bloqueado con esta proteína (ver punto 3 de este trabajo).

2. CARACTERIZACION DE LA FRACCION FLAGELAR.

2.1. Análisis electroforético de la fracción.

Para caracterizar la fracción flagelar, en este trabajo se empleó electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de un detergente aniónico, dodecil sulfato de sodio (SDS). Se utilizó un gel formado por 10 % p/v de acrilamida utilizando 5 % p/v de acrilamida como gel de concentración. Se utilizó como buffer de corrida 25 mM de Tris (hidroximetil) aminometano (TRIS), 192 mM de Glicina y 0.1 % p/v de SDS con un pH 8.3.

Tanto el gel de corrida como el de concentración se prepararon con buffer TRIS HCl, pH 8.8 y 6.8 respectivamente. La polimerización

del gel se realizó utilizando N.N.N'.N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) como iniciador de la reacción y persulfato de amonio como catalizador.

La electroforesis fué realizada en una placa de 15 cm de largo por 16 cm de ancho y 0.2 cm de espesor, utilizando una cuba electrofóretica vertical BRL 1070 Modelo V161 (BRL Bethesda Research Laboratories Inc. USA) y como fuente de poder un rectificador biestable de Laboratorios Crudo Camaño (Científica Comercial Argentina, Bs. As. Argentina).

Antes de la corrida propiamente dicha se realizó una electroforesis previa aplicando una intensidad de corriente constante de 25 mA durante 4 horas a 4°C. La corrida del material se realizó utilizando 7 mA durante 17 horas en cámara fría a 4°C, con un voltaje inicial de 100 volts. Cada canal en la placa de gel de poliacrilamida recibió una siembra de 100-150 microgramos de proteínas totales.

El material ajustado a la concentración deseada con buffer TRIS HCl pH 6.8 recibió un tratamiento de 30 minutos a 37°C y ebullición en baño a 100°C durante 2 minutos, en presencia de 2 % p/v de SDS y 1 % v/v de B-mercaptoetanol. Luego de este tratamiento las muestras fueron sembradas en el gel con 5 % de glicerina y 0.1 % de azul de bromofenol como indicador del frente de corrida. En ningún caso el volumen sembrado superó los 200 microlitros.

En cada experiencia se corrió paralelamente marcadores de peso molecular: albúmina bovina (SAB), ovoalbumina (OV), pepsina (Peps), Trypsinogeno (Tryp), lactoglobulina (BLG) y lisozima (Lis), (100 micro

gramos de Dalton Mark VI MW SDS 70 kit, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). La movilidad electroforética fué relacionada con el frente de corrida marcado por el azul de bromofenol tomado como 1.0.

2.1.1. Análisis del gel de poliacrilamida.

2.1.1.1. Coloración para proteínas con azul de Comassie.

Una vez terminada la corrida electroforética el gel fué sumergido en 0.25 % p/v de azul de Comassie en una solución al 45 % v/v de metanol y 9.2 % v/v de ácido acético glacial, durante ocho horas a temperatura ambiente. La decoloración del gel, luego de este tiempo, se realizó por sucesivos lavados con una solución al 5 % v/v de metanol y 7.5 % de Acido acético glacial.

2.1.1.2. Coloración para glicoproteínas.

Los geles fueron coloreados para el estudio de glicoconjugados mediante tinción con reactivo de Schiff previo tratamiento con ácido periódico. Una vez terminada la corrida la porción del gel destinada para este fin fué sumergida en solución fijadora formada por 40 % v/v de Etanol, 5 % de ácido acético glacial, durante una noche, posteriormente el gel se colocó en contacto con 0.7 % p/v de ácido periódico en 5 % v/v de ácido acético, durante 2 horas, luego se realizaron varios lavados con 0.2 % p/v de metabisulfito de sodio en 5 % v/v de ácido acético. Finalmente el gel se trató con fucsina básica al 0.4 % en una solución al 0.8 % de metabisulfito de sodio y 1 % v/v de

HCl concentrado, previamente decolorada con carbón activado.

2.1.1.3. Las coloraciones fueron graficadas por densitografía en un equipo espectrodensitógrafo Crudo Camaño Modelo C (Laboratorios Crudo Camaño, Buenos Aires, Argentina) utilizando una ranura de 0.2 mm y una zona de monocromación de 2 mm.

2.2. Análisis químico y enzimático.

La concentración de proteínas en la fracción flagelar y fracciones subcelulares se determinó por el método de Lowry y col. (132), usando como testigo seroalbúmina bovina.

Se determinó la actividad de las enzimas ATPasa sensible a oligomicina, como marcador de membrana interna mitocondrial (79); hexoquinasa, como marcador de glicosomas (103); y adenilato ciclasa (170,175), como marcador de membrana plasmática.

3. REACTIVIDAD ANTIGENICA FRENTE A HIPERINMUNOSUEROS.

Los diferentes componentes antigénicos de la fracción flagelar separados en la electroforesis en gel de poliacrilamida fueron evaluados desde el punto de vista antigénico por su reactividad frente a sueros hiperinmunes contra las fracciones flagelar, Microsomal y citoplasmática soluble. La técnica consistió en transferir las distintas proteínas del perfil electroforético a una plancha de papel de nitrocelulosa de 02 m (Nuclepore Cellulosic, Commerce Circle, Pleasanton, USA), por corriente, utilizando una intensidad constante de

200 mA y un voltaje inicial de 90 volts. Las proteínas quedan retenidas en la superficie del papel a través de los grupos nitro del mismo. El buffer de transferencia consistió en 25 mM de TRIS, 192 mM de Glicina y 20 % v/v de metanol.

Luego de separar un tira de papel para ser revelada por coloración para proteínas con 0.1 % p/v de amido Schwartz en 45 % v/v de metanol y 10 % v/v de ácido acético, la plancha se bloqueó con 3 % p/v de albúmina bovina en TRIS-HCl 10mM y 0.9 % p/v de NaCl, durante 1 hora a temperatura ambiente. La albúmina bloquea todos los grupos nitrados no ocupados por los antígenos transferidos.

Distintas tiras de papel fueron incubadas con cada antisuero adsorbido, el que fué diluído 1:100 en TRIS-HCl 10 mM, 0.9 % NaCl, durante 1 hora a 37°C. Concluída la incubación las tiras de papel fueron lavadas exhaustivamente en el mismo buffer en presencia de 0.05 % v/v de Polioximetilen sorbitan monolaurato (TWEEN 20), para eliminar el resto de anticuerpo no reaccionante.

Las tiras de papel fueron incubadas durante una hora con un conjugado anti inmunoglobulina G de conejo ligado a peroxidasa (Orion Diagnóstica, Helsinki, Finland), diluído 1:100 en el buffer descripto para la incubación de los antisueros.

Luego de varios lavados en TRIS-HCl-TWEEN, las tiras se revelaron con el sustrato de la enzima peroxidasa, diaminobencidina, en presencia de peróxido de hidrógeno. Las bandas se observaron con el color

característico de la diaminobencidina oxidada (207)

4. EXPERIENCIAS DE INMUNOPROTECCION

4.1. Animales.

Se utilizaron ratones machos de las cepas BALB/c y SWISS endocriados de 21 días de edad provistos por la Sección Bioterio del Departamento de Radiobiología de la Comisión Nacional de Energía Atómica (Buenos Aires, Argentina).

4.2. Estudios anatomopatológicos.

Los animales muertos por efectos de la infección por T. cruzi o aquellos sacrificados para los distintos estudios según los esquemas experimentales fueron desvicerados y sus órganos fijados en formaldehído al 10 % en buffer de fosfatos pH 7.4 , luego fueron deshidratados en alcohol utilizando, concentraciones crecientes y embebidos en parafina. Cortes de 5 micrones de espesor fueron obtenidos en un micrótomo Leitz 1207 (Leitz, Alem.) y luego teñidos con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

Debido a la variabilidad de la intensidad de las lesiones ellas fueron clasificadas en: ausencia de lesión (aparición normal de miocardio y músculo esquelético), lesión leve (escaso número de infiltrados mononucleares en aurícula o espacios perivasculares en músculo esquelético), moderada (confluencia de infiltración inflamatoria en la misma localización) y lesión severa infiltración inflamatoria difusa en miocardio y

músculo esquelético).

4.3. Estudios parasitológicos.

La parasitemia se determinó mediante la observación directa al microscopio de 0.5 microlitros de sangre proveniente de la cola del animal.

Los xenodiagnósticos se efectuaron según la normatización propuesta por Cerisola en 1974 (53), usando 10 ninfas del tercer estadio de T. infestans, en el caso de xenodiagnósticos únicos y 4 ninfas por vez en el caso de xenodiagnósticos seriados, repitiendo la aplicación de insectos por lo menos tres veces por animal.

4.4. Estudios serológicos.

La investigación de anticuerpos específicos contra T. cruzi en los sueros de los animales estudiados en este trabajo se efectuó sobre ocho diluciones a partir de la muestra pura.

El dosaje de IgG se efectuó utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta (5) usando un antisuero contra inmunoglobulina G (IgG) hecho en cabra, (TAGO, INC. Burlingame, CA USA) para evidenciar anticuerpos pegados a la superficie de los epimastigotes usados como antígeno.

Un suero se consideró positivo por encima de su dilución al medio.

Se investigó además la presencia de Inmunoglobulina M (IgM) en todos los sueros estudiados mediante la técnica descripta por Freilij

y colaboradores en 1983 (79'), basada en la captación de IgM de los sueros mediante la utilización de microplacas de poliestireno de 96 orificios los cuales han sido sensibilizados con suero anti IgM de ratón. Los sueros fueron puestos en contacto con la placa y luego revelados con antígeno de aglutinación directa (epimastigotes tripsinados) (213). La presencia de IgM específica contra T. cruzi se evidenció al quedar esta pegada y en posición de reaccionar con el antígeno.

Se tomó como título reactivo de cada suero a la última dilución cuyo manto cubría el 50 % del fondo del pocillo. Se consideró positiva la reacción a partir de la dilución al medio inclusive.

4.5. Esquema experimental.

4.5.1. Modelo de inmunización e infección aguda.

El esquema de inmunización fué de tres dosis semanales de la fracción flagelar por vía intraperitoneal (IP), con una dosis total de proteínas entre 250 y 300 microgramos. Veinte o 24 días después de la última dosis los animales fueron desafiados, con un número de parásitos que producía la muerte del 100 % de la población (5×10^3 parásitos provenientes de sangre)* o que reproducía la infección natural (1×10^3 parásitos provenientes de triatominos infectados, conteniendo 20 tripomastigotes metacíclicos).

* Para el aislado Tulahuén, 5×10^3 parásitos corresponden a 5 DL50 para ratones BALB/c o SWISS de 70 días de edad.

La parasitemia de los ratones se controló a partir de los cinco días postinfección. Las muestras se tomaron cada 48 horas y los datos se expresan como parásitos por mililitro de sangre, y representan la media de tres animales en cada ocasión. El seguimiento de los ratones se continuó hasta los 60 días postdesafío. Con el mismo fin se efectuaron xenodiagnósticos únicos, 10 días antes del desafío y 10, 15 y 30 días post-infección. En el caso de animales con parasitemia negativa a observación directa 30 días post-desafío, se efectuaron xenodiagnósticos seriados. Entre los 25 y 30 días de evolución los triatomíneos alimentados sobre los animales con parasitemia negativa fueron analizados. De los insectos, en los que no se observó parasitemia, se tomó su materia fecal e inoculó por vía subcutánea (sc) en ratones lactantes (10 días). En estos ratones se investigó parásitos durante 20 días de la misma forma que se describió precedentemente. Al cabo de este tiempo se efectuaron xenodiagnósticos seriados a estos ratones. En síntesis, en el caso de encontrar parasitemia negativa por observación directa, se procedió a efectuar dos ciclos completos de pasaje y xenodiagnóstico con la sangre de estos animales para garantizar dentro de estos límites la negativización parasitológica de los ratones vacunados.

4.5.1.1. Evaluación de la fracción flagelar liofilizada.

Los experimentos se llevaron a cabo con cuatro grupos de 5 ratones. Los grupos de animales fueron inoculados con fracción flagelar liofilizada (FI), o con flagelos frescos (Ff) o con solución sali

na (SS). Los animales recibieron 5×10^3 tripomastigotes provenientes de sangre de ratón veinte días después de la última dosis.

4.5.1.2. Estudio de inmunopotenciadores de la actividad inmunogénica de la fracción flagelar.

Utilizando una fracción flagelar inactivada por congelamiento y descongelamiento a fin de elegir el adyuvante con mayor actividad.

A efectos de observar la potenciación de la respuesta inmunoprotectora producida por la fracción flagelar se hizo necesario trabajar con un material que mostrara un bajo índice de protección en términos de sobrevida de los animales luego del desafío de estos con formas virulentas.

Los experimentos se diseñaron como sigue: Siete grupos de 10 animales, fueron inoculados con la fracción flagelar inactivada por congelamiento (Fli) con y sin adyuvante. Cinco grupos de 5 ratones cada uno recibió las mismas dosis de adyuvantes mas solución salina (SS) y un grupo de animales sólo recibió solución salina. El peso de los animales fué seguido desde el comienzo de la experiencia y los datos se expresan como promedio aritmético del total de los ratones integrantes del grupo.

Con cada una de las tres dosis de inmunógeno se inoculó 150 microgramos de Cp, 1.25×10^9 U de Bp, 150 microgramos de BCG, 75 microgramos de Saponina y 0.25 ml de AIF en volúmenes iguales a las dosis de antígeno, hasta completar los 0.5 ml utilizados en el inóculo. Los

animales fueron desafiados con 10^3 parásitos de sangre de ratón.

Estudios de inmunoprotección con la fracción flagelar liofilizada y B. pertussis como adyuvante.

Todas las experiencias se diseñaron tomando veinte ratones que fueron inmunizados con Fl, 20 con Fl más Bp y 20 con SS. Los animales de cada grupo fueron desafiados con 10^3 parásitos provenientes de materia fecal de triatominos infectados conteniendo 20 tripomastigotes metacíclicos. Los animales recibieron fracción flagelar liofilizada y adyuvante (Bp) en las concentraciones mencionadas.

Diez y treinta días después del desafío se sacrificó igual número de animales. En cada sacrificio se extrajo sangre por punción venosa en forma aséptica, para el estudio de cinética de anticuerpos durante el desarrollo de las experiencias.

Los ratones sobrevivientes fueron sacrificados al día 50 post-infección.

Se efectuó control de peso de los animales desde el comienzo de la inmunización, hasta el momento del sacrificio.

4.5.2. Modelo de inmunización e infección crónica.

La Enfermedad de Chagas en su etapa crónica ha sido estudiada por diversos autores, se observó que la inoculación de bajas dosis de parásitos reproducía en el ratón alteraciones electrocardiográficas y lesiones tisulares similares a las encontradas en el hombre. Siguiendo el esquema de Laguens y col. (122,123) sobre la reproductibilidad de es-

tas alteraciones en el ratón, los animales fueron desafiados con 25 tripomastigotes provenientes de sangre de ratón infectado.

Para las experiencias de inmunoprotección, la inmunización se llevó a cabo utilizando tres dosis quincenales de inmunógeno con dosis de proteínas cercanas a los 300 microgramos totales y el desafío se efectuó 30 días después de la última dosis. Los ratones fueron controlados por xenodiagnóstico antes y después de la infección y sacrificados luego de los noventa y 120 días posteriores al desafío, para la realización de estudios anatomopatológicos.

4.5.2.1. Estudio de los efectos de la fracción flagelar para inducir resistencia contra la enfermedad de Chagas crónica, comparación con la fracción Microsomal y Citosol, de epimastigotes de T. cruzi. Estudio de los efectos de estos antígenos en ausencia de infección. Las experiencias fueron diagramadas de la siguiente forma: Grupos de 40 ratones recibieron tres dosis de las subfracciones F, Mc, o Citosol. Cada animal recibió un total de 250, 3.100 y 3.000 microgramos de proteínas de F, Mc y Citosol, respectivamente. Cuarenta ratones los cuales, recibieron sólo SS, fueron utilizados como controles.

Treinta días después de la última dosis de antígeno o SS, 20 animales inoculados con cada fracción o SS fueron desafiados con 25 formas sanguíneas. Los 20 restantes, no fueron desafiados y se estudiaron por el mismo esquema experimental para observar los efectos de los antígenos en ausencia de infección.

Para estudiar si el medio de cultivo donde crecen los epimastigotes tiene algún efecto sobre las lesiones tisulares, 20 animales fueron inoculados con este medio (1.4 mg de proteínas) por vía intraperitoneal, con el mismo esquema ya descrito.

La parasitemia se controló por xenodiagnóstico antes y 120 días después del desafío, el último, al momento del sacrificio. Todos los animales fueron sacrificados a los 150 días de haber recibido la última dosis de antígeno o SS.

Se efectuaron estudios electrocardiográficos a los ratones bajo anestesia con eter antes de ser sacrificados, para cada animal se efectuaron las derivaciones DI, DII, DIII, AVL y AVF en un equipo FUKUDA CENTURY Modelo SCC-1 Fukuda Densh Co, LTD, Tokio, Japón) a una velocidad de registro de 50 mm por segundo.

Resultados

1. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA FRACCION FLAGELAR.

1.1. Análisis electroforético.

La fracción flagelar al ser analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, muestra un complejo perfil con bandas proteicas que cubren practicamente la corrida. Se encuentran presentes no menos de 17 bandas, las cuales se extienden desde la zona de altos pesos moleculares hasta el frente de corrida (Figura 3). En la Figura 2 se puede observar la distribución proteica por coloración con azul brillante de Comassie y la densitografía del gel.

El mismo perfil proteico se observa en hoja de nitrato de celulosa al ser electrotransferidas las proteínas fraccionadas por la electroforesis en presencia de SDS; esta imagen fué la utilizada en los ensayos de comportamiento antigénico frente a hiperinmunsueros (Figura 2B).

La coloración por PAS (oxidación de los terminales glucosídicos de los glicoconjugados y posterior reacción con reactivo de Schiff) mostró en los geles de poliacrilamida una única banda de bajo peso molecular. Esta banda de 15 KD es sumamente difusa debido probablemente a su alta concentración en glúcidos y practicamente alcanza el frente de corrida (Figura 4).

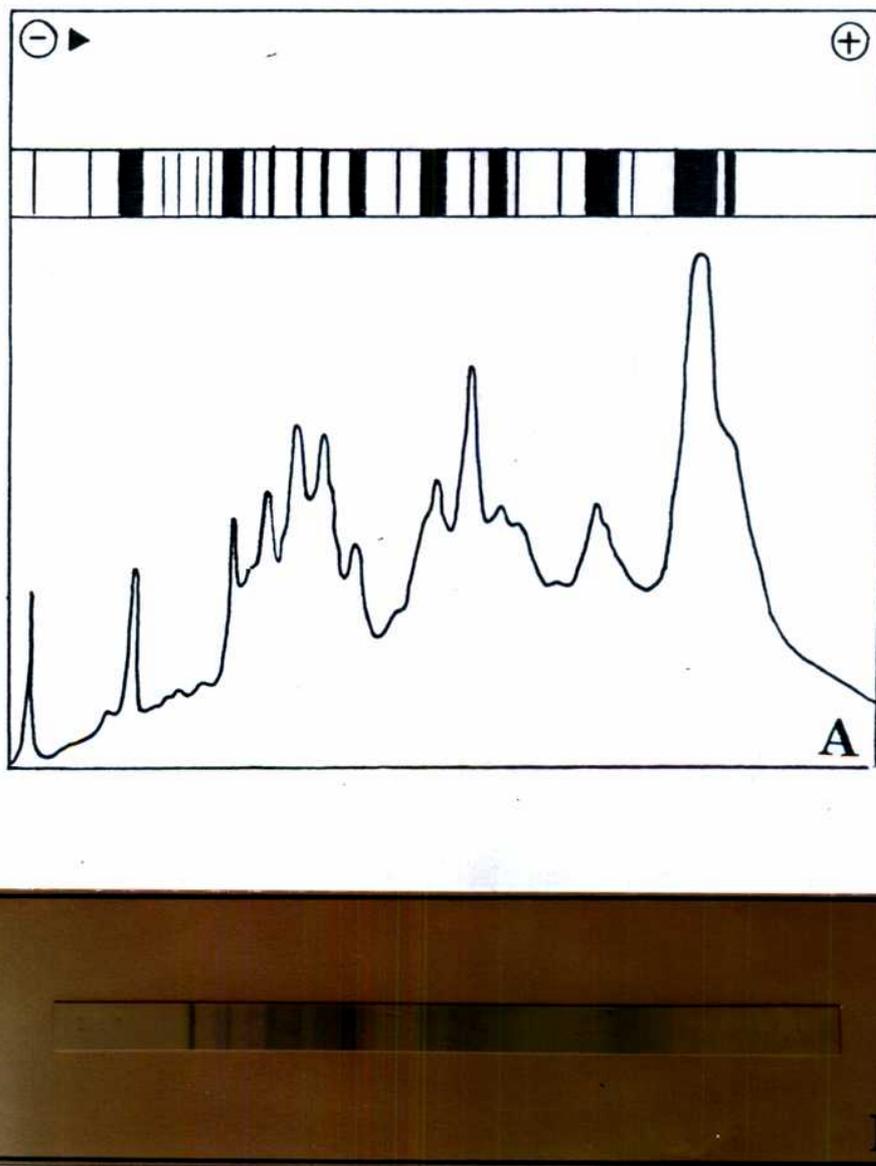
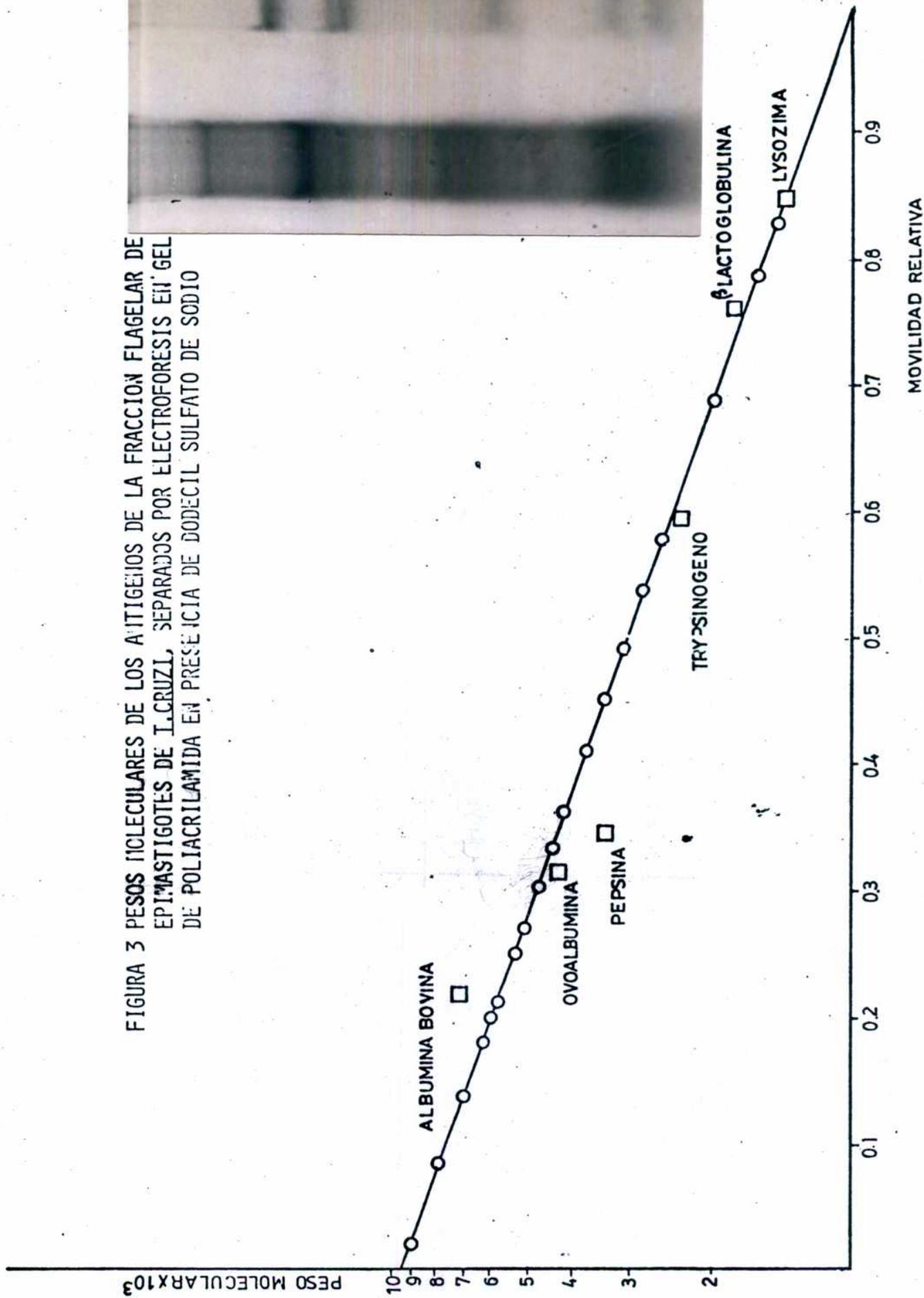
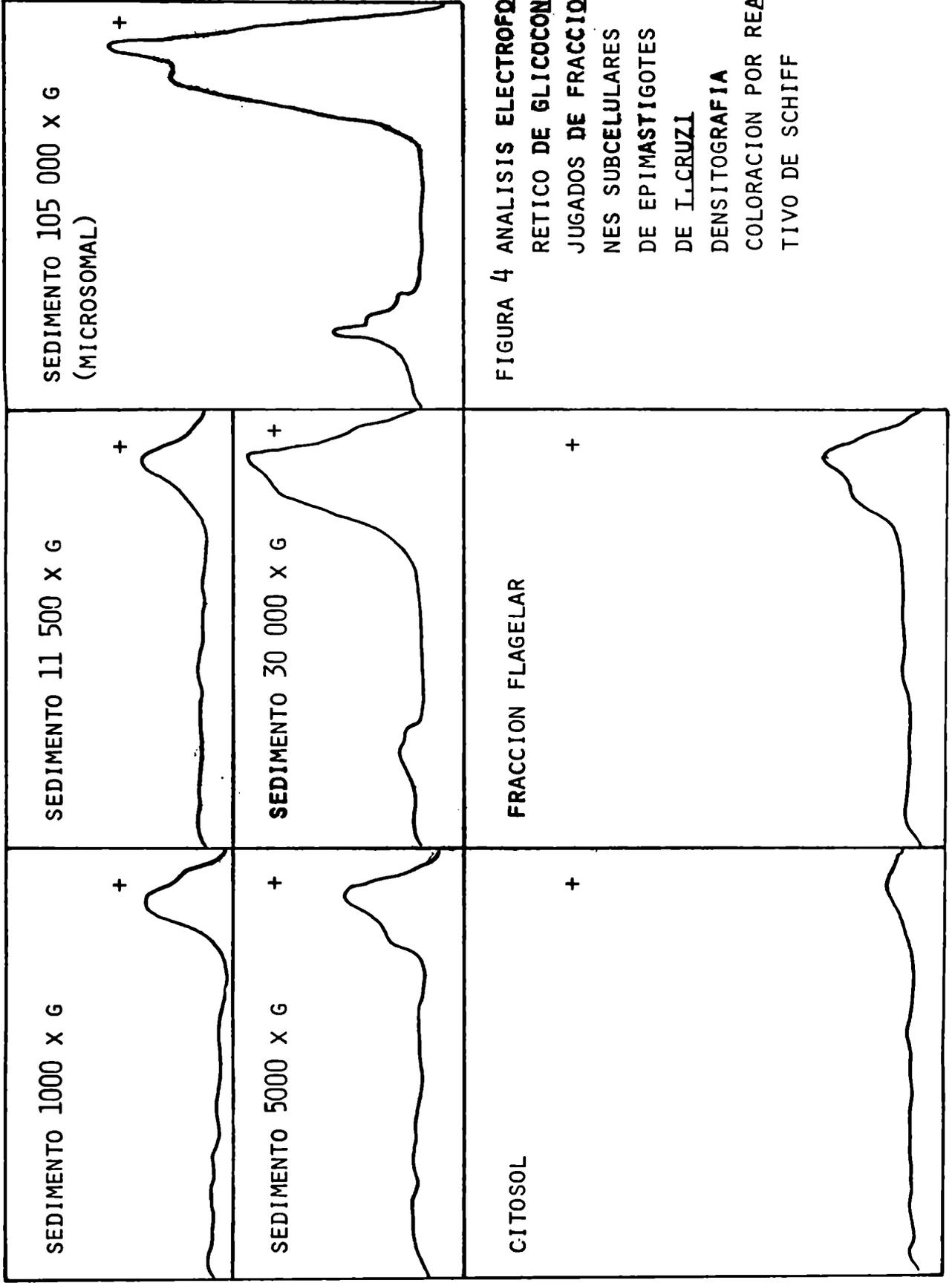


FIGURA 2 PERFILES ELECTROFORETICOS DE LA FRACCION FLAGELAR (SDS PAGE)

- A ESQUEMA Y DESINTOGRAFIA DEL GEL
- B ANTIGENOS ELECTROTRANSFERIDOS A NITROCELULOSA

FIGURA 3 PESOS MOLECULARES DE LOS ANTIGENOS DE LA FRACCION FLAGELAR DE EPIMASTIGOTES DE *T. CRUZI*, SEPARADOS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECIL SULFATO DE SODIO





1.2. Determinaciones enzimáticas y rendimiento proteico.

La determinación de actividad de las enzimas ATPasa sensible a oligomicina, hexoquinasa y adenilato ciclasa como marcadores de membrana interna mitocondrial, glicosoma y membrana plasmática se muestra en la Tabla 1 del mismo modo que la concentración de proteínas dosadas por el método de Lowry y col. presentes en la fracción luego de su obtención. El rendimiento en términos de proteínas es del 0.2 % en relación al homogeneizado de epimastigotes rotos por presión y descompresión.

La recuperación enzimática fué del 0.1 % para ATPasa y adenilato ciclasa y del 0.2 % hexoquinasa, todas referidas a la actividad encontrada en el homogeneizado total. En el mismo experimento se observó que la mayor actividad específica de ATPasa sensible a oligomicina y la hexoquinasa se encontró en el sedimento de 30000xg (0.11, 2,32) y la mayor actividad específica de adenilato ciclasa se encontró en el sedimento de 105 000xg (0.25).

2. ANALISIS INMUNOQUIMICO

Al hacer reaccionar los distintos antisueros preparados con la fracción flagelar, microsomal y citoplasmática soluble, con los antígenos separados por electroforesis y electro-

FRACCION	ACTIVIDAD ENZIMATICA *							
	PROTEINAS	ATPASA SENSIBLE A O- LIGOMICINA		HEXOQUINASA		ADENILATO CICLASA		
		MG/ML	TOTALES	U/MG PROT.	U TOTALES	U/MG PROT.	U TOTALES	U/MG PROT. U TOTALES
HOMOGENEIZA- DO TOTAL	5.25	262.50	0.05	12.60	0.93	245.03	0.08	21.02
SEDIMENTO 1000 X G	6.65	19.95	0.04	0.79	0.91	18.33	NO EFECT.	NO EFECT.
F. FLAGELAR	0.28	0.67	0.02	0.02	0.64	0.45	0.03	0.02

TABLA I DETERMINACIONES DE ACTIVIDAD ENZIMATICA Y PROTEINAS TOTALES EN LA FRACCION FLAGELAR, HOMOGENEIZADO TOTAL Y SEDIMENTO DE 1000 X G

* TODAS LAS UNIDADES DE ACTIVIDAD ENZIMATICA CORRESPONDEN A μ MOLES/ MIN EN TODOS LOS CASOS

transferidos a hojas de nitrato de celulosa, se observaron diferencias en la reactividad de los hiperinmunesueros, tanto de los originales como de los adsorbidos con los antígenos heterólogos. Al utilizar tiras de nitrato de celulosa con antígenos de la fracción flagelar se observaron diferentes bandas con los distintos antisueros y al adsorber éstos con sus antígenos heterólogos desaparecieron algunas bandas, especialmente aquellas de alto peso molecular, por encima de 75KD, en tanto que otras se mantuvieron presentes (Figura 5). La banda de peso molecular 15KD, glicoconjugado observado en la coloración para evidenciar estos compuestos, fué reconocida por el antisuero antíflagelar, sea éste adsorbido o no. Al utilizar antimicrosomal y adsorber con citosol o citosol mas flagelar desapareció un conjunto de bandas de pesos moleculares cercanos a los 25KD lo que no ocurrió al adsorber el antisuero sólo con flagelar. No se observaron diferencias importantes al utilizar anticitosol con o sin adsorber.

3. MODIFICACION DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS CRONICA MEDIANTE LA INMUNIZACION CON FRACCION FLAGELAR. COMPARACION CON LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR LAS FRACCIONES MICROSOMAL, CITOSOL Y SEDIMENTO DE 5000xg.

- 1 MARCADORES DE PESOS MOLECULARES
- 2 COLORACION CON NEGRO DE AMIDO 10 B
- 3 SUERO ANTI FRACCION MICROSOMAL
- 4 SUERO ANTI FRACCION MICROSOMAL ADSORBI-
DO CON FRACCION FLAGELAR
- 5 SUERO ANTI FRACCION MICROSOMAL ADSORBI-
DO CON CITOSOL
- 6 SUERO ANTI FRACCION MICROSOMAL ADSORBI-
DO CON LAS FRACCIONES FLAGELAR Y CITO-
SOL
- 7 SUERO ANTI CITOSOL
- 8 SUERO ANTI CITOSOL ADSORBIDO CON FRAC-
CION FLAGELAR
- 9 SUERO ANTI CITOSOL ADSORBIDO CON FRAC-
CION MICROSOMAL
- 10 SUERO ANTI CITOSOL ADSORBIDO CON LAS
FRACCIONES FLAGELAR Y MICROSOMAL
- 11 SUERO ANTI FRACCION FLAGELAR
- 12 SUERO ANTI FRACCION FLAGELAR ADSORBI-
DO CON CITOSOL
- 13 SUERO ANTI FRACCION FLAGELAR ADSORBI-
DO CON FRACCION MICROSOMAL
- 14 SUERO ANTI FRACCION FLAGELAR ADSORBI-
DO CON LAS FRACCIONES MICROSOMAL Y
CITOSOL
- 15 SUERO DE CONEJO NORMAL

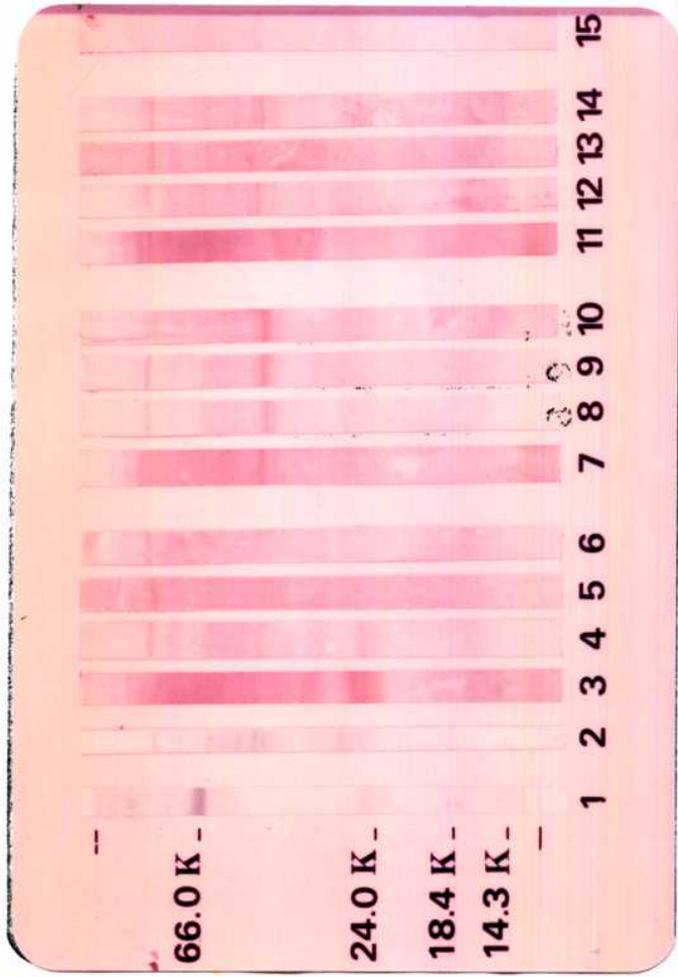


FIGURA 5 REACCION INMUNOENZIMATICA SOBRE AN-
TIGENOS DE LA FRACCION FLAGELAR
(SEPARADOS POR ELECTROFORESIS Y E-
LECTROTRANSFERIDOS A NITROCELULOSA)
LUEGO DE REACCIONAR FRENTE A HIPER-
INMUNOSUEROS CONTRA OTRAS FRACCIO-
NES SUBCELULARES

3.1. Efecto de la fracción flagelar y antígenos de T. cruzi sobre ratones inmunizados en ausencia de infección.

La parasitemia de los ratones que recibieron fracciones subcelulares fué negativa; lo que fué comprobado tanto por observación directa como por xenodiagnóstico (Tabla 2).

Los estudios histopatológicos mostraron que el 10 % de los ratones que recibieron solución salina o medio de cultivo de T. cruzi o fracción flagelar presentaban miocarditis de carácter leve, no encontrándose miositis.

Los animales inoculados con la fracción microsomal presentaron una intensa miocarditis como también un compromiso en músculo esquelético. No hubo lesiones importantes en miocardio o músculo esquelético en los ratones que recibieron sedimento de 1000xg o citosol (Tabla 2).

Al momento del sacrificio el 50 % de los animales inoculados con el sedimento de 1000xg o citosol, presentó alteraciones electrocardiográficas (bloqueo auriculoventricular de primer grado y complejo QRS más alto que 0.03 seg). Los animales inmunizados con la fracción flagelar presentaron un electrocardiograma similar a los controles.

Para descartar la posibilidad de que la miocarditis inducida por la fracción microsomal pudiera ser causada por un efec

INMUNOGENO	INTENSIDAD				NUMERO DE RATONES / NUMERO TOTAL			
	MIOCARDITIS/MIOSITIS				CON MIOSITIS (%)	CON ALTERAC.ECG (%)	CON PARASIT. (%)	CON PARASIT. (%)
	AUSENTE	LEVE	MODERADA	GRAVE				
F. FLAGELAR	17/20	3/0	0/0	0/0	3/20 (15)	0/20 (0)	0/17	0/17
SEDIMENTO 1000 x G	12/16	3/0	1/0	0/0	4/16 (25)	0/16 (0)	1/16	0/16
MICROSOMAL	1/17	10/1	5/0	2/0	17/18 (94)	1/18 (5)	2/17	0/12
CITOSOL	11/16	4/1	2/0	0/0	6/17 (35)	1/17 (6)	9/18	0/17
S. SALINA	15/11	2/0	0/0	0/0	2/17 (11)	0/11 (0)	0/12	0/12

TABLA 2 EFECTO DE LA INMUNIZACION CON LA FRACCION FLAGELAR Y ANTIGENOS DE L. CRUZI SOBRE RATONES SWISS, EN AUSENCIA DE INFECCION. NUMERO DE ANIMALES CON: DIFERENTE GRADO DE LESION, ALTERACIONES ELECTROCARDIOGRAFICAS Y PARASITEMIA

to tóxico, se estudió el efecto paulatino de la inoculación de varias dosis. Los animales sacrificados en las primeras 72 horas post-inoculación no mostraron lesiones a nivel de músculo esquelético o miocardio. Los animales inoculados sólo con una dosis y estudiados 20 y 120 días post-inoculación tuvieron una mínima incidencia de miocarditis y miositis. En cambio los animales inoculados con tres dosis y estudiados 37 o 120 días después de la primera inoculación mostraron una alta incidencia de miocarditis y baja incidencia de miositis.

3.2. Efecto de la inmunización con la fracción flagelar para evocar resistencia contra la enfermedad de Chagas crónica.

Los animales desafiados con 25 tripomastigotes provenientes de sangre de ratón infectado, presentaron parasitemia sólo detectable por xenodiagnóstico. La observación directa de las muestras de sangre no permitió detectar parásitos en circulación. Se encontraron parásitos en el 50 % de los ratones no inmunizados y desafiados. El más bajo número de animales con xenodiagnóstico positivo fué encontrado entre los que fueron inmunizados con la fracción flagelar previamente al desafío y el mayor número se encontró en los grupos de ratones inoculados con la fracción microsomal. Los controles normales no presentaron parasitemia (Tabla 2).

INMUNOGENO	INTENSIDAD			NUMERO DE RATONES/ NUMERO TOTAL				
	MIOCARDITIS/MIOSITIS			CON MIOCARDITIS (%)	CON MIOSITIS (%)	CON ALTERAC.ECG	CON PARASIT.	
	AUSENTE	LEVE	MODERADA					GRAVE
F. FLAGELAR	12/13	6/3	2/3	0/11	8/20 (40)	7/20 (35)	0/19	1/16
SEDIMENTO 1000 X G	6/6	4/0	5/4	0/5	9/15 (60)	9/15 (60)	0/13	4/15
F. MICROSO MAL	3/5	9/5	3/2	1/5	13/16 (81)	12/17 (70)	6/18	6/12
CITOSOL	2/2	4/2	2/3	0/1	6/8 (75)	6/8 (75)	2/8	2/5
S. SALINA	3/4	7/5	7/4	0/4	14/17 (82)	13/17 (76)	4/16	5/13

TABLA 3 RATONES SWISS INMUNIZADOS CON ANTIGENOS DE I. CRUZI Y DESAFIADOS CON 25 TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS. NUMERO DE ANIMALES CON: DIFERENTE GRADO DE LESION, ALTERACIONES ELECTROCARDIOGRAFICAS Y PARASITEMIA

Los estudios de histopatología mostraron en los controles desafiados una alta incidencia de miocarditis y miositis. Los animales inmunizados con citosol o la fracción microsomal presentaron lesiones similares a esos controles. Los ratones inmunizados con la fracción flagelar tuvieron la más baja incidencia de miocarditis. Los animales inoculados con el sedimento de 1000xg o citosol mostraron lesiones de intensidad intermedia entre las encontradas en los animales inoculados con microsomal y flagelar (Tabla 3).

En términos de miositis los animales inmunizados con la fracción flagelar presentaron la más baja intensidad e incidencía con respecto a los controles y a los ratones inmunizados con las otras fracciones.

El análisis electrocardiográfico mostró que el 50 % de los inoculados con fracción microsomal, citosol o solución sa-lina del presentó bloqueos y ampliación del complejo QRS, no observándose alteraciones en los animales inmunizados con la fracción flage-lar.

4. RESISTENCIA CONTRA LA INFECCION AGUDA POR T. CRUZI, INDUCIDA POR LA INMUNIZACION DE RATONES BALB/c CON LA FRACCION FLAGELAR.

4.1. Animales inmunizados y desafiados con T. cruzi virulento.

Los animales inmunizados con la fracción flagelar y desafia

dos según un esquema agudo de infección (5×10^3 parásitos de sangre de ratón infectado) mostraron parasitemias 10 veces menores que la de los grupos controles no inmunizados y desafiados (Figura 6). El grupo inmunizado presentó valores máximos de parasitemia cercanos a los 5×10^4 parásitos por mililitro.

La sobrevivencia de los ratones inmunizados fué del 100 % mientras que los controles murieron al día 14 post-infección (Figura 6).

Los estudios histopatológicos mostraron en el grupo control infectado un cuadro de infección aguda generalizada, caracterizada por infiltrados mononucleares, edema, necrosis y nidos de amastigotes de T. cruzi observados sistemáticamente en todos los órganos, con predominio en músculo estriado (Tabla 4) y con la excepción del sistema nervioso (cerebro y cerebelo) que no presentó lesiones.

Los animales inmunizados y desafiados no presentaron lesión en los órganos estudiados, con excepción de infiltrados caracterizados por un compromiso sistemático de grado leve o moderado en músculo estriado y miocardio (Tabla 4). Sólo un animal presentó escaso número de parásitos en intestino.

4.2. Animales inmunizados y no desafiados.

En los animales inmunizados no desafiados no se observó parasitemia y en algunos animales sacrificados experimentalmente

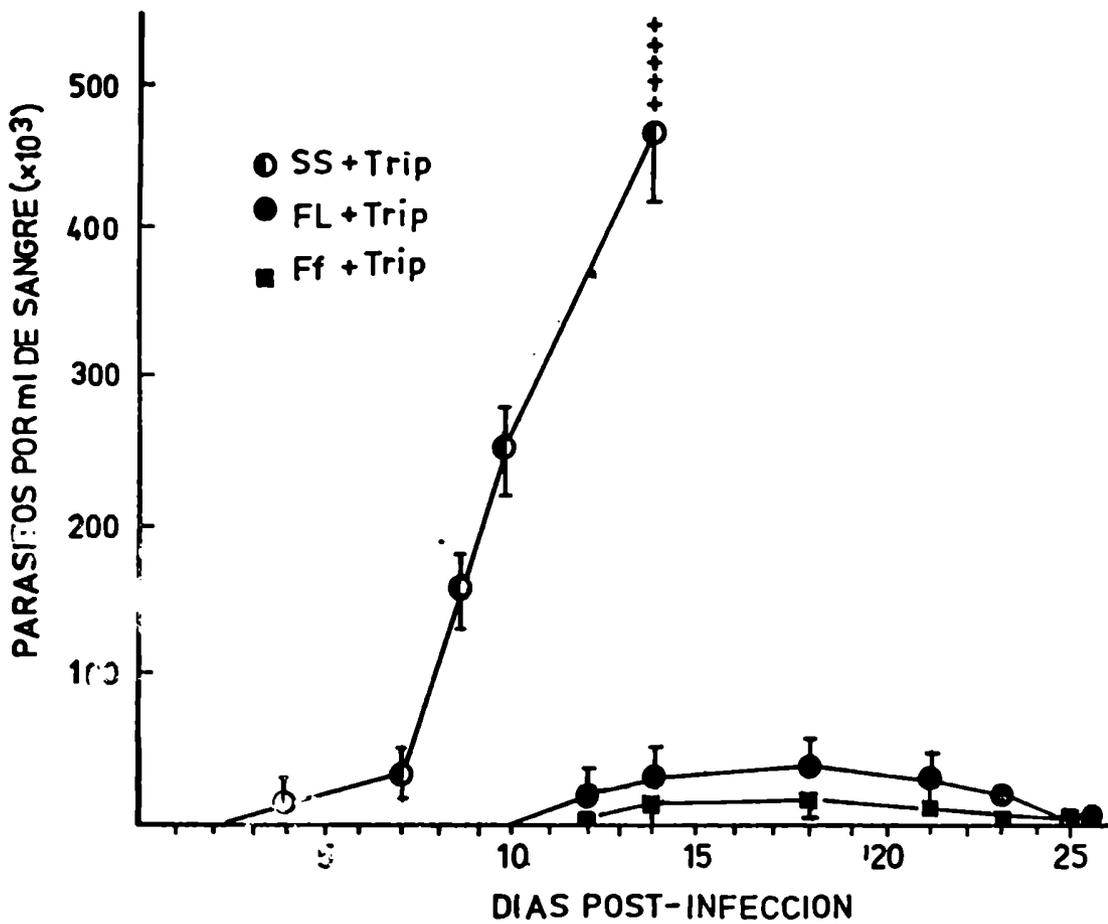


FIGURA 6 NIVELES DE PARASITEMIA EN RATONES BALB C INMUNIZADOS CON LA FRACCION FLAGELAR FRESCA O LIOFILIZADA, LUEGO DE UN DESAFIO CON 5×10^3 TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS

SS SOLUCION SALINA, F_F FRACCION FLAGELAR FRESCA
 FL FRACCION FLAGELAR LIOFILIZADA, TRIP TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS

 DESVIACION ESTANDARD

Inmunog.	Desafío	Total de animales	Tejido	Grado de lesión			
				Ausente	Leve	Modera <u>da</u>	Grave
Ff	si	7	Miocardio	0	5	2	0
		6	Músculo	1	2	3	0
		7	Colon	4	1	2	0
		7	Hígado	6	1	0	0
Fl	si	10	Miocardio	8	2	0	0
		10	Músculo	4	5	1	0
		10	Colon	4	5	1	0
		9	Hígado	8	1	0	0
SS	si	9	Miocardio	0	3	6	0
		10	Músculo	0	1	0	9
		10	Colon	0	6	3	1
		9	Hígado	0	1	6	2
SS	no	5	Miocardio	5	0	0	0
		5	Músculo	5	0	0	0
		5	Colon	5	0	0	0
		5	Hígado	3	1	1	0

TABLA 4 ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DE RATONES BALB/c INMUNIZADOS CON LA FRACCION FLAGELAR FRESCA O LIOFILIZADA, LUEGO DEL DESAFIO CON 5×10^3 TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS

FF FRACCION FLAGELAR FRESCA, FL FRACCION FLAGELAR LIOFILIZADA, SS SOLUCION SALINA

no se observaron alteraciones histopatológicas con excepción de un compromiso aislado de grado leve en músculo, miocardio y vejiga (Tabla 4).

4.3. Animales normales.

Animales normales no inmunizados ni desafiados, formaron parte del esquema experimental empleado en este trabajo, cuando se consideró como parámetro la posible alteración histopatológica. Estos animales presentaron alteraciones muy leves en un número pequeño de ellos. Como ejemplo se describe un grupo de animales estudiados conjuntamente con los experimentos de modelo agudo. Se observó que un animal de 5 estudiados presentó un daño moderado en el hígado y otro de carácter leve en el mismo tejido (Tabla 4).

5. CONSERVACION DE LAS PROPIEDADES INMUNOPROTECTORAS DE LA FRACCION FLAGELAR AL SER LIOFILIZADA.

5.1. Mortalidad, parasitemia y anatomía patológica.

La fracción flagelar una vez liofilizada conservó sus propiedades de inducir resistencia contra la infección por T. cruzi del mismo modo que el material que es inoculado inmediatamente después de ser obtenido, fracción flagelar fresca (Ff).

Los animales inmunizados con el inmunógeno liofilizado inoculado entre las 24 hs y los 7 días después del proceso de

liofilización, mostraron similar grado de protección ante el desafío de formas letales de T. cruzi provenientes de sangre de ratones infectados, en términos de sobrevivencia (100 %) y parasitemia con valores 10 veces menores al de los controles (Figura 6).

El estudio anatomopatológico de los tejidos de los animales mostró un grado de protección en los animales inmunizados con la fracción flagelar liofilizada y desafiados, ya que no presentaron lesiones graves en comparación con los animales controles (Tabla 4).

5.2. Anulación de la capacidad infectante de una suspensión de parásitos de cultivo, al ser liofilizada.

Cincuenta ratones lactantes fueron inoculados con una suspensión de parásitos proveniente de medio de cultivo luego de haber sido liofilizada. Los animales no presentaron parasitemia comprobada por observación directa de la sangre y por xenodiagnóstico seriado, demostrando de esta forma que el material liofilizado no contiene formas parasitarias vivas.

La suspensión de parásitos al ser liofilizada y luego resuspendida en solución isotónica, mostraba por microscopía óptica abundante material parasitario destruido y numerosas formas inmóviles.

6. ENSAYO DE INMUNOPOTENCIADORES PARA AUMENTAR LA RESISTENCIA
CONTRA LA INFECCION POR T.CRUZI EVOCADA POR LA FRACCION FLAGELAR

Con el objeto de seleccionar un inmunopotenciador adecuado se efectuaron experimentos con una fracción flagelar inactiva liofilizada (Fli) que se inoculó por vía subcutánea acompañada del adyuvante. Luego de la obtención y antes de su liofilización la fracción flagelar fué congelada y descongelada repetidas veces, éste efecto ha sido ensayado anteriormente (85), observándose que el material así tratado disminuye considerablemente sus características de evocar una respuesta inmunoprotectora. Este material fué el utilizado para inmunizar ratones en presencia de distintos adyuvantes.

En términos de sobrevivencia de los animales desafiados se observó que de todos los adyuvantes utilizados, fué B. pertussis el que mostró mayor grado de protección en ratones. Con excepción del adyuvante incompleto de Freund, que evidenció el mayor deterioro de los animales aún desde la inmunización, y Cparvum, en todos los casos los animales vacunados en presencia de adyuvante mostraron una disminución de la parasitemia, aumento de la sobrevivencia y recuperación de su peso luego del desafío con parásitos infectantes, en relación a sus respectivos controles (Figura 7 y Tabla 5).

Inmunógeno	Días post-infección							Sobrevida a los 60 días (%) *
	0	10	15	20	25	30	35	
Fli + Bp	8/8	8/8	6/8	5/8	5/8	5/8	5/8	62
Bp	4/4	4/4	2/4	0/4				0
Fli + Cp	9/9	9/9	9/9	7/9	6/9	5/9	4/9	44
Cp	4/4	4/4	3/4	0/4				0
Fli + AIF	10/10	10/10	1/10	0/10				0
AIF	3/3	3/3	1/3	0/3				0
Fli + BCG	9/9	9/9	4/9	3/9	2/9	2/9	2/9	22
BCG	4/4	4/4	2/4	0/4				0
Fli	10/10	10/10	5/10	1/10	1/10	1/10	1/10	10

* SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

TABLA 5 SOBREVIDA (N° DE ANIMALES VIVOS / N° ANIMALES TOTALES) AL DESAFIO DE RATONES BALB/c INMUNIZADOS CON FRACCION FLAGELAR DE EPIMASTIGOTES DE T. CRUZI, LIOFILIZADA E INACTIVADA, EN PRESENCIA DE ADYUVANTES

FLI FRACCION FLAGELAR INACTIVADA, Bp B. PERTUSSIS, Cp C. PARVUM
 AIF ADYUVANTE INCOMPLETO DE FREUND, BCG BACILLE CALMETTE GUERIN

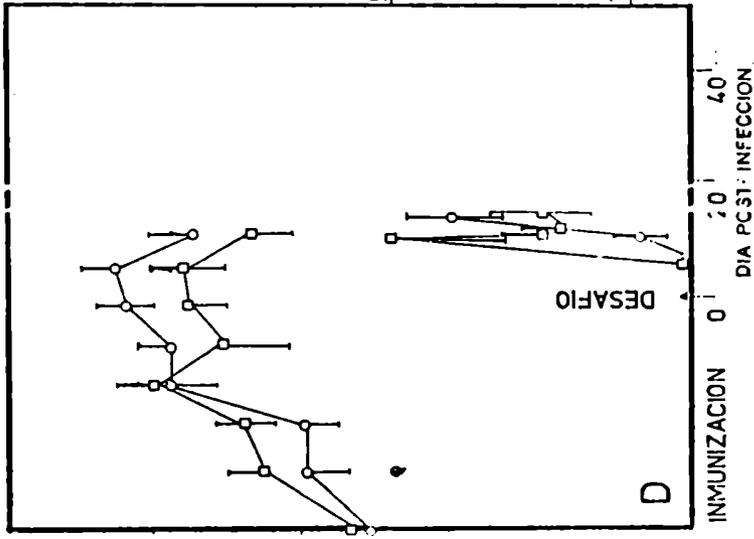
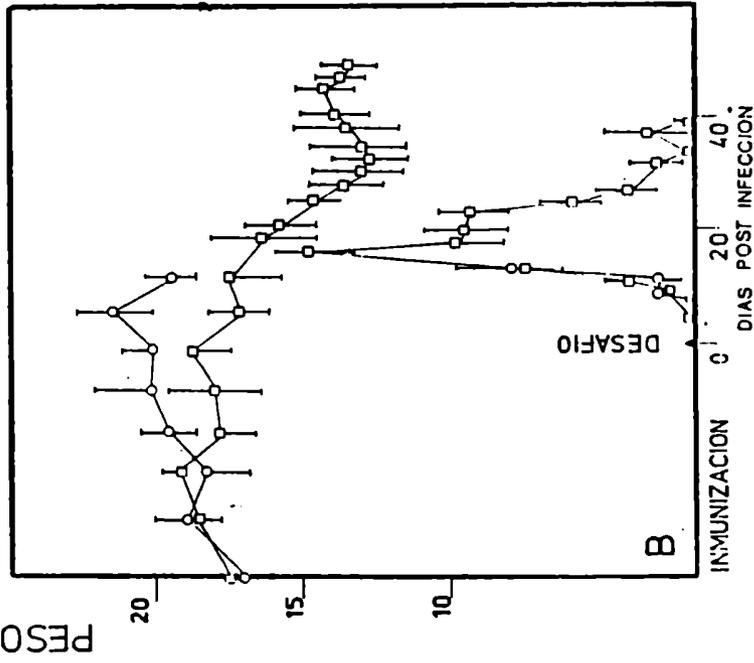
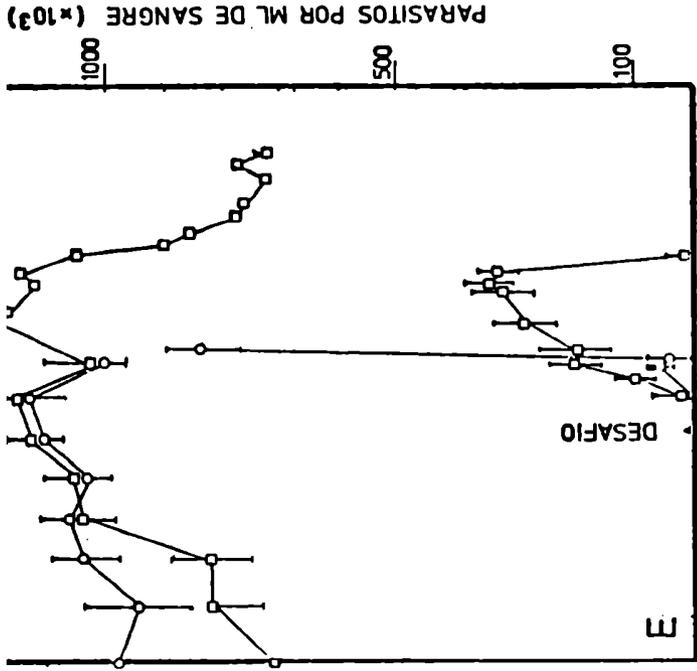
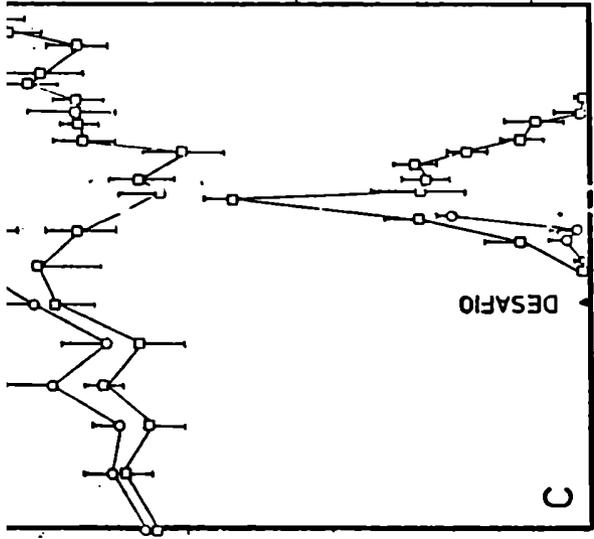
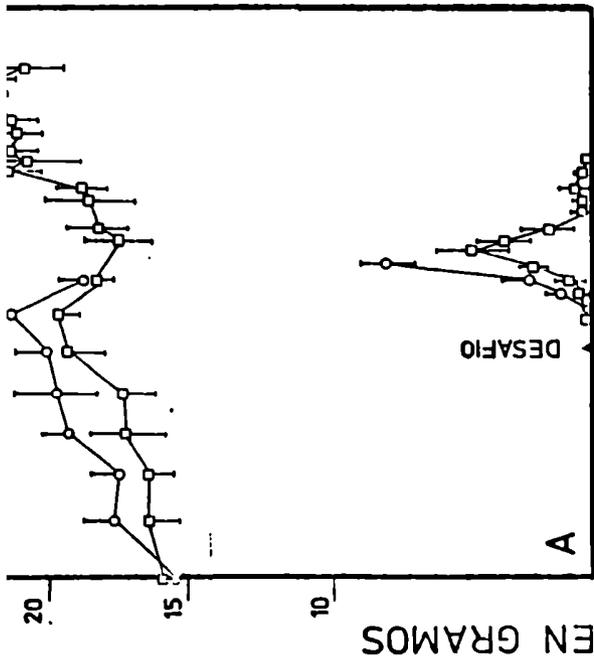


FIGURA 7: PARASITEMIA AL DESAFIO (5×10^3 TRIP. SANG) DE RATONES BALB/c INMUNIZADOS CON FRACCION FLAGELAR LIOFILIZADA E INACTIVADA EN PRESENCIA DE ADYUVANTES.
 PESO DE LOS ANIMALES DURANTE LA EXPERIENCIA.
 □ ANIMALES INMUNIZADOS
 ○ ANIMALES INOCULADOS CON ADYUVANTE

A : B. pertussis
 B : C. parvum
 C : BCG
 D : ADYUVANTE INCOMPLETO DE FREUND
 E : FRACCION FLAGELAR LIOFILIZADA E INACTIVADA SIN ADYUVANTE

DESAFIO. ESTANDARD

La sobrevivencia de los animales fué del 10 % para los que recibieron material liofilizado inactivado, del 62 % para los que recibieron flagelos liofilizados (Fli) mas B. pertussis del 44 % para aquellos que recibieron Fli mas C. parvum, 22 % para los animales inoculados con Fli mas BCG y del 0 % para los animales que recibieron Fli y adyuvante incompleto de Freund. El 100 % de los controles, ratones no inmunizados y desafiados, murió el día 14 después de la infección. Todos los animales que recibieron solamente los adyuvantes, sin inmunógeno parasitario, tuvieron un comportamiento similar a los controles al ser desafiados, muriendo también en la misma fecha que aquellos (Tabla 5).

Los animales inoculados con saponina murieron antes del desafío. De todos los adyuvantes ensayados se seleccionó Bordetella pertussis como el mejor inmunopotenciador de la fracción flagelar ya que potenció 6 veces el efecto del inmunógeno inactivo en términos de sobrevivencia y dos veces en términos de disminución de la parasitemia.

En los experimentos que se describen a continuación, se utilizó Bordetella pertussis con fracción flagelar activa conservada liofilizada como se describió en el punto 1.5 de Materiales y Métodos de este trabajo.

Estos experimentos de inmunoprotección se llevaron a cabo utilizando un desafío que se parece más a la infección que se transmite naturalmente por el vector. Este desafío consiste de parásitos obtenidos del tracto digestivo de Triatoma infestans alimentados sobre sangre de ratón infectado con T. cruzi, aislado Tulahuén.

Los animales desafiados con 10^3 formas parasitarias conteniendo 20 tripomastigotes metacíclicos provenientes de triatominos, mostraron un comportamiento diferente en términos de mortalidad con respecto a los desafiados con 5×10^3 parásitos circulantes de sangre de ratón. El 60 % de los ratones murió a los 30 días post-infección.

Cuando los animales fueron inmunizados con la fracción flagelar liofilizada activa resultaron protegidos de este desafío en relación a la sobrevida y parasitemia. El 80 % de los animales sobrevivió (Tabla 6) presentando parasitemias menores en un orden de magnitud que la que mostraron los controles no inmunizados en el momento de su parasitemia máxima (Tabla 6). Los ratones inmunizados presentaron 20 días después del desafío un máximo de 1×10^5 parásitos por mililitro de sangre, mientras que los controles mostraron su pico al día 35 con 1.6×10^6 par/ml.

Los animales murieron en ambos casos al alcanzar los respectivos picos de parasitemia.

INMUNOG.	Nº ANIMALES VIVOS/Nº TOTAL DE ANIMALES (PARASITOS POR ML DE SANGRE x 10 ³)						SOBREVIDA (%)
	Días post-infección						
	0	10	20	30	40	50 *	
F1	5/5 (0)	5/5 (8)	5/5 (126)	4/5 (10)	4/5 (0)	4/5 (0)	80
F1+Bp	6/6 (0)	6/6 (0)	6/6 (0)	6/6 (0)	6/6 (0)	6/6 (0)	100
SS	5/5 (0)	5/5 (3)	5/5 (36)	5/5 (900)	3/5 (1.600)	3/5 (1.000)	40

* MOMENTO DEL SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

TABLA 6 SOBREVIVENCIA Y PARASITEMIA DE RATONES BALB/C INMUNIZADOS CON FRACCIÓN FLAGELAR LIOFILIZADA EN PRESENCIA DE ADYUVANTE AL SER DESAFIADOS CON 10⁵ PARASITOS PROVENIENTES DE TRIATOMINOS INFECTADOS.

FL FRACCIÓN FLAGELAR LIOFILIZADA, BP B. PERTUSSIS, SS SOLUCIÓN SALINA

La inmunización de los ratones acompañada por la inoculación de Bordetella pertussis, adyuvante que mostró el mayor grado de inmunopotenciación, fué capaz de inducir una protección del 100 % de los animales en términos de sobrevida y una ausencia total de parasitemia luego del desafío con las formas meta-cíclicas (Tabla 6).

No se detectaron parásitos en la sangre de estos ratones inmunizados y desafiados, lo cual fué comprobado por observación directa, xenodiagnóstico y por la inoculación de las heces de los triatomíneos utilizados en este ensayo a ratones lactantes de 10 días de edad. Estos animales fueron controlados por observación directa y xenodiagnóstico no detectando parásitos (Ver punto 4.3 de Material y Métodos de este trabajo). Durante los experimentos, los animales inmunizados con FL acompañado o no de adyuvantes mostraron curvas de peso similares a las que presentaron los ratones normales que no recibieron ningún tratamiento (Fig. 8). El peso promedio de estos animales se estabilizó a partir de los 70 días de vida (20 días post-infección en los animales que fueron desafiados), en 26 - 28 gramos (Figura 8). Los ratones que no recibieron inmunógeno y fueron desafiados mostraron 5 días después una pérdida de su peso original del 15 % aproximadamente y una pérdida del 30 % por debajo del peso promedio de los ratones normales. Los ratones desafiados no recupera

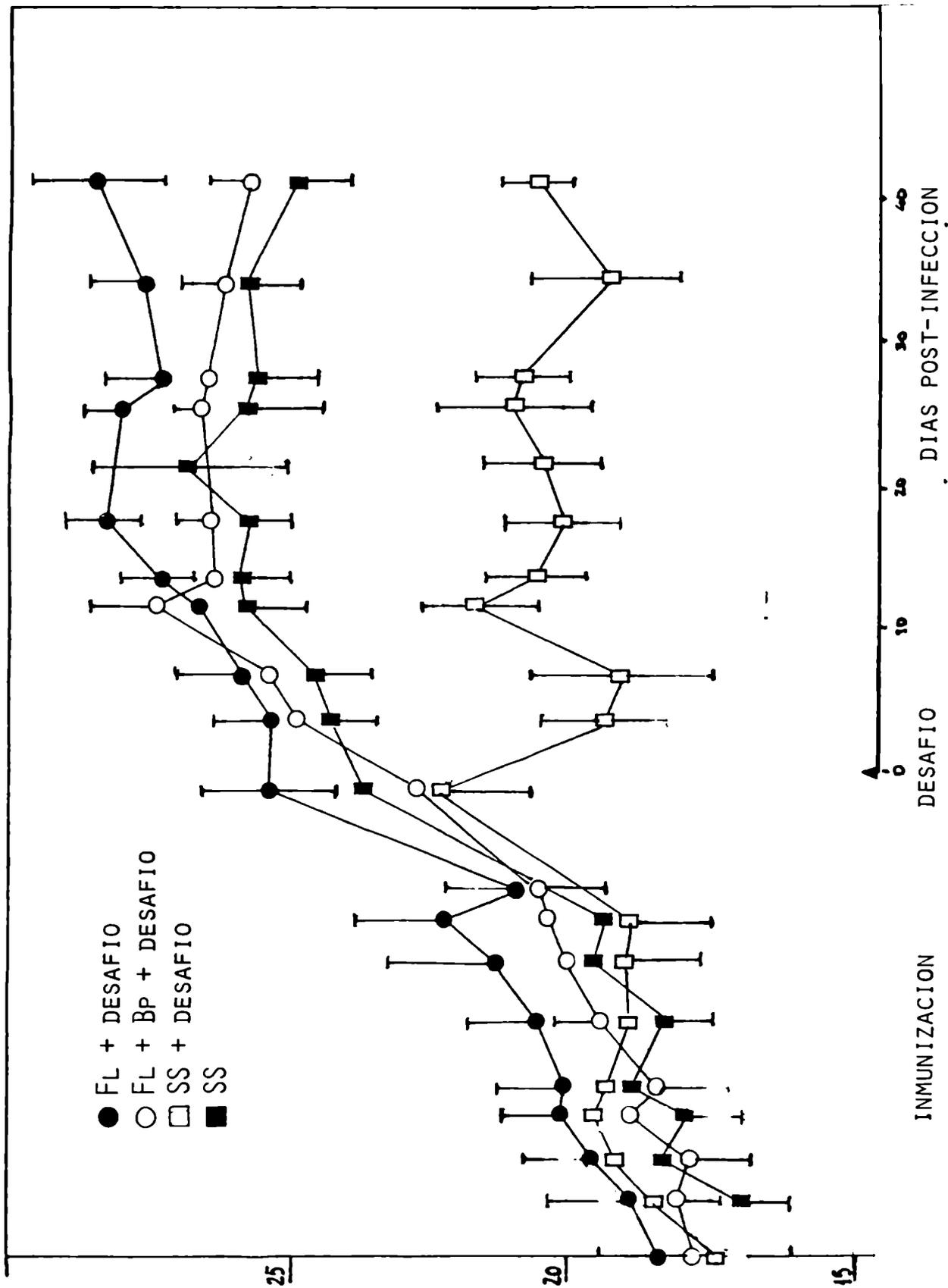


FIGURA 8 PESO PROMEDIO DE RATONES BALB/c INMUNIZADOS CON FRACCION FLAGELAR LIOFILIZADA Y *B. PERTUSSIS*, CONTROL NORMAL Y ANIMALES NO INMUNIZADOS SS: SOLUCION SALINA, FL: FRACCION FLAGELAR LIOFILIZADA, BP: *B. PERTUSSIS*

INMUNOGENO	PICO DE PARASITEMIA (Par./ml x 10 ³) día	Nº DE ANIMALES *	% DE SOBREVIVIDA 60 días post-desafío
Ff	(30) 14	80	80-100
Fl	(40) 20	50	80-100
Fl+Bp	(0) 0 ***	40	100
Controles**	(1.600) 12-30	100	0-40

* Total de 3 a 10 experiencias con el mismo esquema experimental

** Los valores dependen del tipo de desafío empleado (tripomastigotes sanguíneos o metacíclicos)

*** No se observó parasitemia por observación directa, xenodiagnóstico e inoculación a ratones lactantes en dos series de pasaje

TABLA 7 MEJORAMIENTO DE LA ACTIVIDAD INMUNOPROTECTIVA DE LA FRACCION FLAGELAR DE EPIMASTIGOTES DE T. CRUZI OBTENIDO POR LIOFILIZACION Y EL USO DE ADYUVANTE
FF FRACCION FLAGELAR FRESCA, FL FRACCION FLAGELAR LIOFILIZADA, Bp B. PERTUSSIS

INMUNOGENO	PROMEDIO GEOMETRICO DE LAS INVERSAS DE LOS TITULOS IgG/IgM				
	Dos muestras de mezcla de tres sueros/grupo		Cinco muestras individuales/grupo		
	10 **	30	60	70	90
FL *	<u>8</u> NEG	<u>16</u> NEG	<u>16.0</u> 8.0	<u>11.3</u> 256.0	<u>19.0</u> 4.7
FL+ BP *	No efec. NEG	<u>16</u> NEG	<u>45.0</u> 2.0	<u>45.0</u> 64.0	<u>64.0</u> 5.6
SS *	<u>NEG</u> NEG	<u>NEG</u> NEG	<u>4.0</u> 16.0	No efec. 16.0	<u>2.0</u> NEG
CONTROL NORMAL NO DESAF.	<u>NEG</u> NEG	<u>NEG</u> NEG	<u>NEG</u> NEG	<u>2.0</u> NEG	<u>NEG</u> NEG

TABLA 8 CINETICA DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA T. CRUZI EN RATONES BALB C, DURANTE LA INMUNIZACION Y DESPUES DEL DESAFIO CON 10^3 TRIPOMASTIGOTES METACICLICOS

* Los inmunógenos fueron: Fracción flagelar liofilizada (Fl) y Fl más Bordetella pertussis (Fl + Bp). El desafío se administró a los 32 días del séguimiento y de la primera dosis, correspondientes a los 18 días de la tercera dosis inmunizante.

** Los días de seguimiento se contaron desde la administración de la primera dosis inmunizante.

ron su peso original y continuaron disminuyeron su peso hasta su muerte (Figura 8).

La tabla 7 resume los datos de la tabla y figura 6, mostrando el mejoramiento de la actividad inmunoprotectora de la fracción flagelar obtenido por la liofilización y el uso de B.pertussis como adyuvante.

En la misma tabla se muestra el número total de animales investigados en todas las experiencias de inmunoprotección, sumando todos los experimentos efectuados.

En las experiencias de inmunización e infección con el modelo crónico los resultados presentados son producto de tres experimentos con el mismo esquema experimental.

Se investigó la respuesta de anticuerpos específicos contra T.cruzi. Las muestras de suero fueron tomadas a través de todos los experimentos de sangre obtenida a partir de animales sacrificados durante la inmunización y en la etapa posterior al desafío. Se observó que los animales inmunizados presentaron anticuerpos de tipo IgG durante la inmunización y después del desafío. A ellos se agregó la aparición de títulos importantes de anticuerpos de tipo IgM después del desafío (Tabla 8). Los animales inmunizados y no desafiados presentaron anticuerpos de tipo IgG desde los 10 días después de la primera dosis de inmunógeno, manteniéndose durante todo el tiempo de las observaciones experimentales (90 días) efectuadas, que no figuran en la tabla 8.

Discusión

Desde 1909 cuando fué descubierta por Carlos Chagas la tripanosomiasis que lleva su nombre, uno de los máximos anhelos de los investigadores en el campo de la inmunología fué el desarrollo de una vacuna contra la enfermedad. El conocimiento posterior indicó que la investigación sobre vacunas debía acompañarse de la búsqueda del conocimiento sobre la fisiopatología de la enfermedad en animales de experimentación y fundamentalmente del estudio concomitante de los fenómenos de autoinmunidad. En este trabajo la investigación se centró en una de las alternativas de desarrollo de una vacuna contra la enfermedad de Chagas y se acompañó el estudio con las observaciones de la posible aparición de fenómenos autoinmunes como resultado de la inmunización con antígenos de T. cruzi.

Las fracciones subcelulares de epimastigotes de T. cruzi separadas por centrifugación diferencial muestran un comportamiento diferente desde el punto de vista bioquímico e inmunológico(184). La fracción enriquecida en flagelos, obtenida a partir del sedimento de 1000xg por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, presentó características especiales en relación a las otras fracciones subcelulares, principalmente en lo referente a la capacidad de evocar una respuesta inmunoprotectora contra la infección por T. cruzi (190).

Esta fracción flagelar presentó un perfil electroforético característico y reproducible en las diferentes preparaciones.

Se pudo observar un grupo complejo de bandas proteicas con actividad antigénica frente a sueros inmunes. La reactividad de estas bandas con hiperinmunsueros contra otras fracciones de epimastigotes de T. cruzi, mostró que existen antígenos compartidos por las distintas fracciones subcelulares y específicos de la fracción flagelar, probablemente responsables del comportamiento inmunológico de la misma.

El análisis de glicoconjugados en esta fracción mostró sólo una banda que se teñía con colorantes para proteínas y glúcidos, lo que sugiere su caracter glicoproteico. Su peso molecular es de 15KD y se encontró presente también en las fracciones microsomal y citosol, ya que reaccionó con los antisueros preparados con estas y fué visible en los perfiles electroforéticos de ambas (173).

Las glicoproteínas presentes en el homogeneizado total de epimastigotes de T. cruzi de la cepa Tulahuén se encontraron también presentes en la fracción microsomal (173), y coincidieron con las descritas por Colli y col. en 1975, en la cepa Y de T. cruzi. Estos glicoconjugados no están presentes en la fracción flagelar, salvo la banda de bajo peso molecular antes descrita, la cual podría estar relacionada con el lipopeptidofosfoglicano encontrado por Lederkremer y col. en 1977 y 1978 (126,127).

El nivel de actividad de adenilato ciclasa, junto con la demostración de la presencia de todos los glicoconjugados en la

fracción microsomal, sugiere que la misma está enriquecida en membrana plasmática. Por el contrario, esta estructura no parece ser cuantitativamente importante en la fracción flagelar. La determinación de ATPasa sensible a oligomicina y de hexoquinasa en la fracción flagelar, sugiere una baja contaminación con membrana interna mitocondrial y con glicosomas. El rendimiento efectivo de la obtención de la fracción flagelar en términos de proteínas totales fué bajo (0.2 %), pero ^o permitió desarrollar una etapa experimental importante para el conocimiento de los efectos de sus antígenos en el ratón.

Uno de los principales interrogantes fué si las fracciones subcelulares de T. cruzi podían inducir la generación de lesiones en animales que desarrollan la enfermedad de Chagas crónica. En los experimentos llevados a cabo con ratones inmunizados y no desafiados se observó que las fracciones microsomal y citosol producían lesiones por sí mismas y en ausencia de infección. La inducción de miocarditis en el ratón después de la inmunización con la fracción microsomal de T. cruzi coincide con los resultados de otros autores obtenidos al inmunizar conejos con el sedimento de 100000xg (208), obtenido de un homogeneizado de amastigotes y tripomastigotes. El conejo es otro de los animales en los que se ha desarrollado un modelo de enfermedad de Chagas crónica. La inmunización con estas fracciones parece causar un efecto reducido so-

bre el músculo esquelético del ratón y un efecto importante sobre músculo cardíaco. Este hecho podría sugerir la existencia de diferentes mecanismos patogénicos para la producción del daño a nivel cardíaco y del músculo esquelético.

Las alteraciones electrocardiográficas fueron principalmente observadas en los animales inmunizados con citosol y estuvieron acompañadas por una miocarditis de menor intensidad que la producida por la inmunización con la fracción microsomal. Estos resultados pueden ser interpretados como una disociación de los efectos patogénicos sobre tejido miocárdico por dos fracciones de T. cruzi, una rica en proteínas como es el citosol y otra rica en ARN y estructuras relacionadas como la fracción microsomal (184,72)

El efecto lesionante de la fracción microsomal sobre el ratón dependió del número de dosis del inmunógeno administradas. El fenómeno no es tóxico ya que administrando una única dosis, no se observaron lesiones en los ratones desde las 24 horas hasta los 120 días, y podría ser de origen inmune ya que la aparición de lesiones se observó en animales que habían recibido dosis a repetición.

La fracción flagelar no indujo por sí misma lesiones en los animales inmunizados. El conjunto de estos resultados indica que la fracción microsomal y citosol contienen componentes capaces de inducir una miocarditis similar a la encontrada en la enfermedad de Chagas crónica experimental(122,123) que no se hallan presentes en

la fracción flagelar.

Los parámetros de medida del efecto inmunoprotector de antígenos de parásitos son generalmente: mortalidad, respuesta inmune y parasitemia. Este último es el de mayor interés práctico debido a que la intención final de la investigación tendiente al desarrollo de una vacuna es la obtención de un inmunógeno que prevenga la infección. En el caso de la enfermedad de Chagas, la investigación de la parasitemia se efectúa por observación directa y por xenodiagnóstico y pasajes seriados entre mamíferos e insectos, como se ha efectuado en este trabajo. Los pasajes seriados se utilizan para agotar la posibilidad de aislar o demostrar la existencia de parásitos (85,190). Estos métodos aseguran dentro de un límite razonable la presencia o ausencia de parásitos en circulación.

En la introducción de este trabajo se ha descrito que entre las formas de transmisión de la enfermedad de Chagas la más importante es la mediada por el insecto vector siguiéndole en importancia la transfusión de sangre. Estas formas de transmisión son las que se tomaron conceptualmente como base para decidir que tipo y que fuente de tripomastigotes se emplearían para los desafíos de los animales inmunizados. En los experimentos de inmunoprotección efectuados tomando como base un modelo crónico se emplearon parásitos provenientes de sangre de ratón, un modelo desarrollado por otros autores (122). En el modelo crónico 25 tripomas

tigotes no producen la muerte de los animales en las etapas tempranas de la infección y la parasitemia se detecta en los ratones no tratados previamente, por xenodiagnóstico o hemocultivos. Por el contrario, en el modelo agudo se utilizan más de 1 DL50 por ratón como desafío, la parasitemia se detecta principalmente por observación directa y existe una mortalidad del 100 % entre los 10 y 20 días después de la infección. Estos datos coinciden con los de otros autores (190). Los experimentos de este trabajo que utilizan tripomastigotes metacíclicos tienden a conocer el efecto inmunoprotector evocado en ratones por antígenos de la fracción flagelar, frente al desafío con formas infectantes de T. cruzi, más próximo a lo que ocurre en la infección natural. En este sentido se utilizaron 20 tripomastigotes por ratón, los que produjeron la muerte del 60-100 % de los animales no tratados previamente a los treinta días de la infección. Las parasitemias fueron siempre detectadas por observación directa. En todos los casos se empleó la vía intraperitoneal para administrar el desafío. La vía intraperitoneal es ampliamente usada en experiencias de infección en ratones (118) y permite gran reproducibilidad de resultados en términos de parasitemia y sobrevida(190).

En los experimentos de inmunoprotección efectuados sobre el modelo crónico del ratón, los animales inmunizados con fracción microsomal o citosol, o con fracción flagelar presentaron parasite

mía después del desafío, pero la incidencia fué diferente. El más bajo número de animales con parasitemia fué observado en los grupos de animales inmunizados con la fracción flagelar y el sedimento de 1000xg de epimastigotes. Los grupos de ratones inmunizados con fracción microsomal y con citosol presentaron un número de animales con xenodiagnóstico positivo similar a los controles no inmunizados. A pesar de la presencia de animales infectados entre los previamente inmunizados con la fracción flagelar, se observó que los mismos se encontraban totalmente protegidos contra el desarrollo de alteraciones electrocardiográficas. En cambio los ratones que recibieron las fracciones microsomal o citosol sufrieron alteraciones similares a los controles no inmunizados.

También se observó que la inmunización con la fracción flagelar antes del desafío, protegió parcialmente de la generación de micarditis. Por el contrario los animales inmunizados con la fracción microsomal previamente al desafío, no fueron protegidos en términos de daño histológico, mostrando un cuadro similar o más grave que el de los infectados, no inmunizados.

Los resultados obtenidos en la investigación del efecto de la inmunización con las fracciones microsomal, citosol y flagelar en un modelo crónico de la infección chagásica, muestran la posibilidad de obtener diferentes lesiones por inmunización con la fracción microsomal y citosol en ausencia de infección e indican

que la fracción flagelar no sólo presenta los mejores resultados de protección, sino también los menores riesgos de producir lesión por sí misma.

En los experimentos de inmunoprotección experimental llevados a cabo en modelo agudo de infección chagásica en el ratón, la fracción flagelar fué capaz de conferir una alta protección a los ratones inmunizados ante un desafío con altas dosis de formas sanguíneas virulentas (190).

Sin embargo la fracción utilizada en esos experimentos no podía ser conservada y se utilizaba inmediatamente después de obtenida; los intentos de conservar la actividad por una noche a 0° C o congelado a -20° C dieron resultados negativos (82'). Por este motivo, fué interés principal de este trabajo el desarrollo de un procedimiento de conservación de la fracción flagelar en plenitud de su actividad. El proceso de liofilización desarrollado en este trabajo permitió contar con preparaciones de la fracción estables dentro de los siete días de su obtención. Estas preparaciones conservaban las propiedades inmunoprotectoras de la fracción flagelar fresca. Los animales inmunizados con la fracción flagelar fresca o liofilizada resultaron protegidos en un 100 % en términos de sobrevida y presentaron curvas de parasitemia 10 veces menores que los controles no inmunizados.

Otro aspecto importante de la liofilización de la fracción flagelar es la posibilidad de matar a los parásitos que eventualmente podrían sobrevivir al tratamiento de homogeneización y contaminar la fracción. Los animales inoculados con suspensiones liofilizadas de epimastigotes sin homogeneizar, no presentaron parasitemia por observación microscópica directa y xenodiagnóstico seriado.

Con la fracción flagelar liofilizada se efectuaron estudios de inmunoprotección en el ratón. El análisis histopatológico de los animales inmunizados con esa fracción y desafiados con formas sanguíneas circulantes mostró menor intensidad e incidencia de lesiones con respecto a los animales inmunizados con la fracción flagelar fresca. La respuesta de estos últimos fué coincidente con los resultados de protección obtenidos por otros autores en las mismas condiciones experimentales (190).

La respuesta inmune de los ratones inmunizados con la fracción flagelar liofilizada pudo ser potenciada mediante el uso de adyuvantes. La utilización de una fracción inactivada por congelación permitió encontrar el adyuvante más potente sobre todos los ensayados. En este trabajo se observó una buena eficacia en el uso de Bordetella pertussis en relación a los parámetros estudiados (parasitemia, sobrevida y peso); en cambio, con BCG y Corynebacterium parvum no se mejoraron los niveles de parasitemia, aunque

se observó una tendencia a aumentar la sobrevivencia de los animales.

La inmunización con la fracción flagelar activa efectuada en este trabajo fué potenciada por el uso de Bordetella pertussis como adyuvante hasta obtener: a) una sobrevivencia del 100 %, b) ausencia de parasitemia, demostrada por xenodiagnóstico y pasajes seriados. Este hecho es marcadamente auspicioso ya que es la primera vez que se describe un blanqueo parasitológico de ratones como producto de la inmunización con componentes de T. cruzi previamente al desafío con parásitos virulentos del intestino de vichucas y en dosis que causan mortalidad elevada (60 %-100 %). Menezes en 1969 y Hauska en 1950, informaron: inmunidad estéril, en ambos casos inmunizando con parásitos vivos de virulencia atenuada (140,95) En trabajos más recientes, utilizando como inmunógeno parásitos vivos (atenuados) o muertos, productos o fracciones de los mismos, u otros tripanosomatidos monogenéticos, no se observó en ningún caso inmunidad estéril.

Algunos autores han utilizado C. parvum y muramil dipeptido como adyuvantes de diferentes inmunógenos y han encontrado resultados positivos en términos de aumento de la sobrevivencia y disminución de la parasitemia (25,113).

B. pertussis ha sido definido como un inmunopotenciador de la respuesta inmune humoral, aunque también se ha demostrado que

activa la respuesta mediada por células (70). En este trabajo no se puede definir el tipo de respuesta involucrada, ya que ello depende de diversos factores como número de dosis, intervalo entre ellas y principalmente relación entre las dosis de fracción flagelar y adyuvante.

La inmunización con la fracción flagelar liofilizada mas B. pertussis puede evocar una respuesta inmune detectada por la presencia de anticuerpos de tipo IgG durante la inmunización, las cuales persisten después del desafío. Los anticuerpos de tipo IgM específica solamente se observaron después del desafío. Esta diferencia podría deberse a que el desafío induce una infección mínima no detectable por métodos parasitológicos y abortiva, o al diferente aporte antigénico de los tripomastigotes metacíclicos, comparados con la fracción flagelar de epimastigotes.

Resumen y conclusiones

Los antígenos de las fracciones subcelulares de T.cruzi poseen características inmunogénicas y bioquímicas diferentes y una capacidad para inducir resistencia contra la enfermedad de Chagas distinta.

En este trabajo se presenta la caracterización bioquímica de la fracción flagelar de epimastigotes de T.cruzi y los resultados obtenidos al inmunizar ratones con dicha fracción, observando que la misma fue capaz de inducir una inmunoprotección en los animales contra infecciones letales producidas por el parásito.

Esta protección se traduce en el hecho que los animales inmunizados con la fracción flagelar liofilizada, acompañada de B.pertussis como adyuvante, sobrevivieron sin parasitemia, o sea que se ha desarrollado un sistema inmunogénico capaz de obtener un blanqueo parasitológico cuando es utilizado como vacuna en animales de experimentación.

La fracción utilizada es totalmente inocua en el ratón ya que no induce daño histológico y alteraciones electrocardiográficas por si misma, a diferencia de otras fracciones subcelulares de T.cruzi (microsomal y cito-

sol).

La fracción flagelar, a diferencia de las fracciones microsomal y citosol, es capaz de inducir en ratones una resistencia contra la enfermedad de Chagas crónica en términos de alteraciones histológicas y electrocardiográficas.

En el curso de estos estudios se ha desarrollado un método de conservación de la actividad inmunoprotectiva de la fracción flagelar que permite utilizarla una semana después de su obtención con similar eficacia.

La conservación de la fracción mediante su liofilización permite también descartar toda posibilidad de presencia de parásitos vivos con capacidad infectante en la misma.

Dentro de los límites del control parasitológico presentado en este trabajo, se ha desarrollado un procedimiento para obtener un inmunógeno vacunante que permite al ratón resistir infecciones por T.cruzi.



Bibliografía

1. ABALOS JW. Simposio Internacional sobre enfermedad de Chagas. pp.347-356, Buenos Aires, Argentina, 1972.
2. ABRAMO ORREGO L, LANSETTI JC, BOZZINI JP, MARTINI GJW de. Medicina (Buenos Aires) 40 (Supl.1): 56-62, 1980.
3. AFCHAIN D, LE RAY D, CAPRON A, JADIN J. Protistologica 9: 213-220, 1973.
4. ALCANTARA A, BRENER Z. Acta Tropica (Basel) 35: 209-219, 1978.
5. ALVAREZ M, CERISOLA JA, ROHWEDDER RW. Bol. Chil. Parasitol. 23: 4-9, 1968.
6. ALVES MJM, COLLI W. J. Protozool. 21: 575-578, 1974.
7. ALVES MJM, COLLI W. FEBS Letters 52: 188-190, 1975.
8. ANDRADE ZA. O sistema de conducao do coracao no Doenca de Chagas. En: Enfermedad de Chagas. Posse RA. Mouzo G y Barrio W, E j. pp 79-88. Buenos Aires, Argentina, 1981.
9. ANDRADE ZA, ANDRADE SG. Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. pp. 85-96. Buenos Aires, Argentina, 1972.
10. ANDRADE ZA, ANDRADE SG. Patología. En: Trypanosoma cruzi e Doenca de Chagas, Brener Z e Andrade Z, Ed. pp. 199-248. Guanabara Koogan SA. Rio de Janeiro, Brasil, 1979.
11. AOMINE M. Comp. Biochem. Physiol. 68: 131-147, 1981.
12. ARAUJO FG, CHIARI E, DIAS JC. The Lancet, January 31: 246-249, 1981.
13. AVILA JL, CASANOVA MA, AVILA A. & BRETANA A. J. Protozool. 26: 304-311, 1979.
14. BAROUSSE AP, COSTA JA, EPOSTO M, LAPLUME H, SEGURA EL. Medicina (Buenos Aires) 40 (Supl 1): 17-26, 1980.
15. BASOMBRIO M, BESUSCHIO S. Inf. Immun. 36, 1: 351-356, 1982.
16. BASOMBRIO M, BESUSCHIO S and COSSIO P. Inf. Immun. 36, 1: 342-350, 1982.

17. BITTENCOURT AL. Congenital Chagas'disease. Am J. Dis. Child. 130: 97-103, 1976.
18. BITTENCOURT AL. Pathologic aspects of congenital transmission of Trypanosoma cruzi. En: New Approaches in American Trypanosomiasis Research. PAHO. Scient. Publ. N°318, pp. 216-222, Washington DC. USA, 1976.
19. BOCK M, GONNERT R, HABERKORN A. Bol. Chil. Parasitol. 24: 13-19, 1969.
20. BOLOMO M, MILEI J, COSSIO P, SEGURA EL, LAGUENS R, FERNANDEZ L, ARANA R. Medicina (Buenos Aires) 40 (6-1): 667-672, 1980.
21. BONET AH, CICHERO JA. Sem. Med. (Buenos Aires) 133: 581-587, 1968.
22. BONGERTZ V, HUNGERER KD. Exp. Parasitol. 45, 8-18, 1980.
23. BONGERTZ V, DVORAK J. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32 (4): 716-722, 1983.
24. BONTENPI E, FRANKE DE CAZZULO B, RUIZ AM and CAZZULO JJ. Comp. Biochem. Phys. (En prensa).
25. BOMFORD R and Mc HARDY N. Parasitology 78: 77-87, 1979.
26. BOWMAN IBR, TOBIE EJ, von BRAND TH. Comp. Biochem. Physiol. 9: 105-114, 1963.
27. BRACK C. Acta Tropica (Basel) 25: 289-356, 1968.
28. von BRAND T. Chemistry of lipids. En: Biochemistry of parasites, Academic Press, Ed. pp 191-205, New York, USA, 1966.
29. von BRAND T. Total protein content and protein fractions. En: Biochemistry of parasites, Academic Press. Ed. pp. 231-238, New York, USA, 1966.
30. BRENER Z. Ann. Rev. Microbiol. 27: 347-382, 1973.
31. BRENER Z. Rev. Inst. Med. Trop. (S. Paulo), 4: 119-126, 1962.

32. BRENER Z. *Adv. Parasitol.* 18: 247-292, 1980.
33. BRENER Z, CHIARI I. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 629-636, 1971.
34. BRONIA DIH, AEBERHARD EE, MONTAMAT EE, SEGURA EL. *Medicina (Buenos Aires)* 40 (Supl. 1): 154-158, 1980.
35. BRONIA DIH, MONTAMAT EE, AEBERHARD EF, SEGURA EL. *Medicina (Buenos Aires)* 36: 294-298, 1976.
36. BURGESS DE, HANSON WL. *Inf. Immun.* 25: 838-843, 1979.
37. CAMPANINI A, ESTEVA M, LAGUENS R, SEGURA EL. *Medicina (Buenos Aires)*, 42: 502-506, 1982.
38. CACADO JR, SALGADO AA, BATISTA SM, CHIARI C. *Rev. Goiana Med.* 22: 203-233, 1976.
39. CACADO JR, SALGADO AA, MARRA MD, ALVAREZ JM, MACHADO JR. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 17: 111-125, 1976.
40. CANNATA J, VALLE E, DOCAMPO R, CAZZULO JJ. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6: 151-160, 1982.
41. CANNATA JJB, FRASCH ACC, CATALDI de FLOMBAUM MA, SEGURA EL, CAZZULO JJ. *Biochem. J.* 184:409-419, 1979.
42. CATALDI de FLOMBAUM MA, CANNATA JJB, CAZZULO JJ, SEGURA EL. *Com. Biochem. Physiol.* 56B: 67-69, 1977.
43. CAZZULO JJ. *Medicina (Buenos Aires).* 38: 53-59, 1978.
44. CAZZULO JJ, FRANKE de CAZZULO BM, HIGA AI, SEGURA EL. *Com. Biochem. Physiol.* 64B: 129-131, 1979.
45. CAZZULO JJ, FRANKE de CAZZULO BM. *Experientia (Basel).* 38: 1135-1137, 1982.
46. CAZZULO JJ, FRANKE de CAZZULO BM, SEGURA EL. *Com. Biochem. Physiol.* 67B: 163-166, 1980.
47. CAZZULO JJ, JUAN SM, SEGURA EL. *Comp. Biochem. Physiol.* 56B: 301-303, 1977.

48. CAZZULO JJ, JUAN SM, SEGURA EL. J. Gen. Microbiol. 99: 237-241, 1977.
49. CAZZULO JJ, VALLE E, DOCAMPO R, CANNATA J. J. Gen. Microbiol. 117: 271-274, 1980.
50. CERISOLA JA. Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas pp. 115-124, Buenos Aires, Argentina, 1972.
51. CERISOLA JA. Chemotherapy of Chagas' infection in man. En: Chagas' disease. PAHO. Scient. Publ. N°347 pp. 35-47, Washington, DC USA, 1977.
52. CERISOLA JA, RABINOVICH A, ALVAREZ M, di CORLETTO CH, PRUNEDA J. Bol. Of. Sanit. Panam. '73: 203-221, 1972.
53. CERISOLA JA, ROHWEDDER R, SEGURA EL, DEL PRADO CE, ALVAREZ M, MARTINI GJW de. El xenodiagnóstico, normalización, utilidad. Publicación del Ministerio de Bienestar Social. Secretaría de Estado de Salud Pública (Buenos Aires), 1974.
54. CORONEL C, GEREZ de BURGOS N, BURGOS C, BLANCO A. Medicina (Buenos Aires) 40 (Supl. 1) 159-164, 1980.
55. COSSIO PM, LAGUENS RP, KREUTZER E. DIEZ C, SEGAL A, ARANA RM. Amer. J. Path. 86: 533-544, 1977.
56. COSSIO PM, DIEZ C, SZARFMAN A, KREUTZER E, CANDIOLO B, ARANA RM. Circulation 49: 13-21, 1974.
57. CROSS GAM. HOLDER AA, ALLEN G & BOOTHROYD JD. Am J. Trop. Med. Hyg. 29: 1027, 1980.
58. OUBA CA, ALVARENGA N, BARRETO A, MARSDEN P, CHIRINI C. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 20: 145-151, 1979.
59. CUNNINGHAM DS, KUHN RE. J. Parasitol. 22: 155-160, 1980.
60. CHAGAS C. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1: 159-218, 1909.
61. CHAGAS C. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 3: 219-275, 1911.
62. CHAGAS C. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 8: 37-60, 916.

63. CHIARI E. DE SOUZA W, ROMANHA AJ, CHIARI CA, BRENER Z. *Acta Tropica* 35: 113-117, 1978.
64. CHIARI E. DIAZ JCP. *Rev. Soc. Bras. Med.* 9: 133-136, 1975.
65. D'ALESSANDRO P. *Exp. Parasitol.* 32, 149, 1972.
66. DA SILVEIRA JF, ABRAHAMSOHN PA, DOLLI W. *Biochim. Biophys. Acta* 550, 22. 1979.
67. DAO L. *Rev. Policl. Caracas* 17: 17-32, 1948.
68. DELAIN E. L'acide desoxyribonucléique du kinetoplasta de *Trypanosoma cruzi*. Organisation moleculaire et effects de certains trypanocides. These de Doctorate es Sciences Naturelles. Univ. Paris VI-Paris, 1972.
69. DOCAMPO R, MORENO SNJ, STOPPANI AOM. *Arch. Biochem. Bioph.* 207: 316-324, 1981.
70. DRESSER DW, PHILLIPS J, The cellular targets for the action of adjuvants: T. adjuvants and B-adjuvants. In *Immunopotentialiation CIBA Fdn Symp 18* (Ed J.W.Wolstenholme and J Knight) pp 102-20 Amsterdam Associated Scientific Publishers.
71. ENGEL JC, DVORACK J, SEGURA EL, CRANE M. J. *Protozool* 29 (4): 555-560, 1982.
72. ESTEVA M, RUIZ AM, CABEZA MECKERT P, CAZZULO JJ, SEGURA EL. *J. Protozool.* 30,1: 164, 1983.
73. FERNANDES JF, HALSMAN M, CASTELLANI O. *Nature.* 207:1004-1005, 1965.
74. FERNANDES HF, HALSMAN M, CASTELLANI O. *Exp. Parasitol.* 18: 203-210, 1966
75. FREEMAN RR, TREJDOSIEWICZ AJ, CROSS GAM. *Nature(Lond.)* 284, 366-369, 1980.
76. FRANKE de CAZZULO BM, CAZZULO JJ. *Comp. Biochem. Physiol.* 71 B: 321-324, 1982

77. FRASCH ACC, CAZZULO JJ, STOPPANI AOM. *Comp. Biochem. Physiol.* 61B: 207-212, 1978.
78. FRASCH ACC, GOIJMAN SG, CAZZULO JJ, STOPPANI AOM. *Mol. Biochem. Parasitol.* 4: 163-170, 1981.
79. FRASCH ACC, SEGURA EL, CAZZULO JJ, STOPPANI AOM. *Comp. Biochem. Physiol.* 60B: 270-275, 1978.
- 79! FREILIJ D, MARCIPAR A, YANOVSKY J, SUBIAS E, III R. *Anual Prot. Ar*
80. GEREZ de BURGOS NM, BLANCO A, SEGURA EL. *Medicina (Buenos Aires)* 38: 151-154, 1977.
81. GOBLE FC. *Bol. Ofic. San. Panamer.* 51: 439-449, 1961.
82. GOBLE FC. *South American Trypanosomiasis. En: Immunity in parasitic animal. Vol. 2, Jackson GJ, Herman R and Singer I. Ed. pp. 597-686. Academic. Press, New York, 1970.*
- 82! GONZALEZ CAPPA SM, CANTARELLA AI, SEGURA EL, J. *Parasitol.* 62:13
83. GONZALEZ CAPPA SM, KAGAN I. *Exp. Parasitol.* 25: 50-57, 1969.
84. GONZALEZ CAPPA SM. CHIALE P. DEL PRADO CE, KATZIN AM, MARTINI GJW de, ISCLA ED de, ABRAMO ORREGO L, SEGURA EL. *Medicina (Buenos Aires)* 40 (Supl. 1): 63-68, 1980.
85. GONZALEZ CAPPA SM, BRONZINA A, KATZIN AM, GOLFERA H, MARTINI GW de, SEGURA EL. *J Protozool* 27,4: 467-471, 1980
86. GONZALEZ CAPPA SM, KLOETZEL J, KATZIN AM, RIBEIRO DOS SANTOS R. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 28: 275-280, 1980.
87. GONZALEZ CAPPA SM, PESCE UJ, CANTARELLA AI, SCHMUNIS GA. *Exp. Parasitol.* 35: 179-186, 1974.
88. GONZALEZ CAPPA SM, SCHMUNIS G, TRAVERSA O, YANOVSKY J, PARODI A. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 17: 709-715, 1968.
89. GORIN PAJ. BARRETO BERGTER EM, DA CRUZ FS. *Carbohyd Res.* 88: 177-188, 1981.
90. GOTTLIEB M. *Exp. Parasitol.* 45: 200-207, 1978.
91. GUERREIRO C, MACHADO A. *Brasil. Med.* 27: 225-226, 1913.
92. GUTTERIDGE WE, TAYLOR MB. *Congresso Internacional sobre Doença de Chagas. Resumo N°M-22, Rio de Janeiro, Brasil, 1979.*

93. HAJOS S, CARBONETTO C, MARGNI R, ESTEVA M. SEGURA EL.
Immunol. letters. 4: 199-203, 1982.
94. HANSON WL, CHIEN JJ, CHAPMAN WL, ROBERSON EL. Int. J. Parasitol. 6: 341-347, 1976.
95. HAUSCHKA TS, GODWIN NB, PALMQUIST J, BROWN E, Am. J. Trop. Med. Hyg. 30: 1-16, 1950.
96. HOARE CA. The trypanosomes of mammals. A zoological monographs Blackwell Scientific Publications. ed. pp 60-80. Oxford and Edinburg, 1979.
97. HOWARD JE, RUBIO M. Bol. Chil. Parasitol. 23: 107-112, 1968.
98. HOWARD JE, RIOS C, EBENSPERGER I, OLIVOS P. Bol. Chil. Parasitol. 12: 42-54, 1957.
99. HUNGERER KD, ENDERS B, SWISLER O. Behring Inst. Mitl. 60: 84-97, 1976.
100. ISOLA ELD DE, LAMMEL EM, KATZIN VJ, GONZALEZ CAPPAS SM, J. Parasitol. 67: 53-58, 1981.
101. ITOW S, CAMARGO EP. J. Protozool, 24: 591-595, 1977.
102. JOHNSON P. NEAL RA, GALL D. Nature, 200-283, 1963.
103. JOSHI MD, JAYANNATHAN V. Hexoquinase I. Brain Methods in Enzimology, (Colowick S.P. and Kaplan, N.O. eds.) 9: 371-375. Academic Press, New York, 1966.
104. CABEZA MECKERT P, CAZZULO JJ, SEGURA EL, ESTEVA MI, RUIZ AM, GELPI R, LAGUENS R. Experientia, 1983. En prensa.
105. JUAN SM, CAZZULO JJ, SEGURA EL. Com. Biochem. Physiol. 63B: 531-535, 1979.
106. JUAN SM, CAZZULO JJ, SEGURA EL. J. Biochem. 9: 395-400, 1978.
107. JUAN SM, CAZZULO JJ, SEGURA EL. J. Parasitol. 63: 921-922, 1977.
108. KANEDA Y. Jap. J. Parasit. 3: 146-153, 1973.

109. KETTERIDGE D. Acta Trop. (Basel) 32: 173-189, 1975.
110. KHOURY EL, RITACCO V, COSSIO PM, LAGUENS RP, SZARFMAN A, DIAZ C, ARANA RM. Clin. Exp. Immunol. 36: 8-15, 1979.
111. KIERSZENBAUM F, BUDZKO DB. Inf. Immun. 12: 461-464, 1975.
112. KIERSZENBAUM F, Am. J. Trop. Med. Hyg. 28: 965-968, 1979.
113. KIERSZENBAUM F, FERRARESI RW. Enhancement of host resistance against Trypanosoma cruzi. Inf. Immun. 25 (1): 273-278, 1979.
114. KIERSZENBAUM F, HOWARD JG. J. Immunol. 116: 1208-1211, 1976.
115. KIERSZENBAUM F, PIENKOWSKY MM. Inf. Immun. 24: 117-120, 1979.
116. KIPNIS TL, JAMES SL, SHER A, DAVID JR. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30: 47-53, 1981.
117. KOHLER G, MILSTEIN C. Nature (London) 256: 457, 1975.
118. KRETTLI A Efeito de anticorpos e do complemento sobre tripomastigotes sanguineos de camundongos infectados com T. cruzi Tese Doutor en Cs. Inst. de Cs. Biological de UF Minas Gerais Belo Horizonte MG. Brasil, 1978.
119. KRETTLI AU, BRENER Z. J. Immunol. 116: 755-760, 1976.
120. KRETTLI AU, NUSSENZWEIG RS. Presence of immunoglobulins on the surface of circulating trypomastigotes of Trypanosoma cruzi resulting in activation of the alternative pathway of complement and lysis. PAHO, Scient. Pub. N°347, pp 71-73 Washington DC, USA, 1977.
121. KRETTLI AU, THOMAS N, EISEN H. Escape mechanisms of Trypanosoma cruzi from the host immune system en les colloques de l'Intern. Cancer Immunology and Parasite Immunology. (L Israel Plagrang and J.C. Salomon Eds.) 97: 553-558.
122. LAGUENS RP, CABEZA MECKERT P, BASOMBRIO MA, CHAMBO GJ, COSSIO PM, ARANA RM, GELPI R. Medicina (Buenos Aires) 40 (Supl. 1) 33-39, 1980.

123. LAGUENS RP, CABEZA MECKERT P, GELPI RJ. *Medicina (Buenos Aires)* 41: 35-39, 1981.
124. LAURICELLA M, LAZZARI J, BAROUSSE A, SEGURA EL. *J. Protozool.* 29, 2: 324, 1982.
125. LEDERKREMER RM de ALVES MJM, FONSECA GC, COLLI W. *Biochim. Biophys. Acta* 444: 85-98, 1976.
126. LEDERKREMER RM de, CASAL OL, TANAKA CT, COLLI W. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 85, 1268, 1978.
127. LEDERKREMER RM de, TANAKA CT, ALVES MJM, COLLI W. *Eur. J. Biochem.* 74, 263, 1977.
128. LEDERKREMER RM de, WAKSMAN N, MARTINI GWJ, SEGURA EL. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B: 313-316, 1982.
129. LEON W. Villalta F, QUEIROZ T, SZARFMAN A. *Inf. Immun.* 26: 1218-1220, 1979.
130. LOPETEGUI R, SOSA MIATELLO CS, LA VIA MI. *Medicina (Buenos Aires)* 40 (Supl. 1) 91-96, 1980.
131. LOPEZ ER, TARURI WL, BOGLIOLO L, ALMEIDA HO, CHAPADEIRO E, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 19: 301-309, 1977.
132. LOWRY DH, ROSEBROUGH N, FARR A, RANDALL RJ. *J. Biol. Chem.* 193-265, 1951.
133. LUGONES HS. *Rev. Fac. Med. Tucumán (Argentina).* 3: 239-251, 1961.
134. MARSDEN P, BARRETO AC, ALVARENGA NJ, CUBA CA. 12º Congreso Soc. Brasil. *Med. Trop. Resumen N°35*, Belen, Brasil, 1976.
135. MATTEI DM, GOLDENBERG S, MOREL C, ACEVEDO HP, ROITMAN I. *FEBS Letters* 74: 264-268, 1977.
136. MAZZA S. *Rev. Univers. Buenos Aires (Argentina).* 4: 400-403, 1926.
137. MAZZA S, BSSO G, BASSO R. *Publicaciones MEPRA* 61: 1-76, 1942.

138. MAZZA S, LOPEZ MANSILLA R. Publicaciones MEPRA 43: 57-58, 1940.
139. Mc HARDIE N. Tropenmed. Parasitol. 28: 195-201, 1977.
140. MENEZES H. Rev. Inst. Med. Trop. (S. Paulo) 11: 258-263, 1969.
141. MENEZES H. Rev. Inst. Med. Trop. (S. Paulo), 13: 144-154, 1971.
142. MILDES RV, KLÖETZEL J, DEANE MP. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 15: 386-392, 1973.
143. MONTEVERDE DA, TARUTO AL, LUCATELLI N. Rev. Neurológica Argentina. 2: 260-266, 1976.
144. MONTUFAR OMB, MUSATTI C, MENDES E, MENDEZ NF. J. Clin. Microbiol. 5: 401-404, 1977.
145. MOREL L, SIMPSON L. Am J. Trop. Med. Hyg. 20: 1070-1074, 1980.
146. MORENO SNJ, PALMERO DJ, EIGUCH de PALMERO K, DOCAMPO R. STOPPANI AOM. Medicina (Buenos Aires) 40: 553-559, 1980.
147. MUNIZ J, NOBREGA G, CUNHA M. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 44: 529-541, 1946.
148. NEAL RA, JOHNSON P. Acta Tropica, 34: 87-96, 1977.
- 148! NIÑO F. Bol. Inst. Clin. Quir. (Buenos Aires) 2: 90-95, 1926.
149. NOGUEIRA N, CHAPLAN S, TYDINGS JD, UNKELESS J, COHN Z. J. Exp. Med. 153: 629-639, 1981.
150. NOGUEIRA N, COHN Z. J. Exp. Med. 143: 1402-1420, 1976.
151. NUSSENZWEIG V, BIANCALANA A, AMATO NETO V, SOONTAG R, FREITAS JLP, KLOETZEL J. Rev. Paul Med. 42: 57-58, 1953.
152. NUSSENZWEIG V, DEANE LM, KLOETZEL J. Exp. Parasitol. 14: 233-239, 1963.
153. PAN S CH T. Exp. Parasitol. 45: 215-224, 1978.

154. PATRUCCO A, CERISOLA JA, MICHEL M, CHIALE P, ALVAREZ M, SEGURA EL. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72: 425-426, 1978.
155. PELLEGRINI J. *Brasil. Med.* 63: 63-68, 1949.
156. PERASSI RH. Componentes antigénicos del suero y de la célula hepática en ratas normales y en ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono. Tesis doctoral en Farmacia y Bioquímica Instituto de Ciencias Químicas Universidad de Córdoba, 1968.
157. PEREIRA NM, SOUZA W, MACHADO RD, CASTRO FT. *J. Protozool.* 24:511-514, 1977.
158. PEREIRA BARRETO M. Epidemiología en *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Brener Z, Andrade Z, Ed. pp 89-151, Guanabara Koogan, SA, Río de Janeiro, Brasil, 1979.
159. PLESSMANN CAMARGO E, COHELO A, MORAES G, FIGUEIREDO EN. *Exp. Parasitol.* 46: 141-144, 1978.
160. PIFANO FC. *Arch. Venez. Pat. Trop.* 2: 89-120, 1954.
161. PIZZI T, *Biológica, Santiago* 3: 53-65, 1945.
162. RAMOS C, SCHADTLER SIWON I, ORTIZ ORT ZL. *J. Immunol.* 122: 1243-1247, 1979.
163. RANGEL HA, ARAUJO PMF, REPKA D, COSTA MG. *Exp. Parasitol.* 52: 199-209, 1981.
164. REVELLI SR, AMERIO N, MORENO HS, VALENTI JL, BALLARREY H, MORINI JC. *Medicina (Buenos Aires)* 40 (Supl. 1): 69-76, 1980.
165. RIBEIRO DOS SANTOS R, HUDSON L. *Paras. Immunol.* 2: 1-10, 1980.
166. RIBEIRO DOS SANTOS R, HUDSON L. *Clin. Exp. Immunol.* 40: 36-41, 1980.
167. RIBEIRO DOS SANTOS R, MARQUEZ JO, VON GAL FURTADO CC, RAMOS DE JC, MARTINS AR, KOBERLE F. *Tropenmed. Parasitol.* 30: 19-24, 1979.
168. ROBERSON EL, HANSON WL. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68: 338-343, 1974.

169. ROBERSON EL, HANSON WL, CHAPMAN W. *Exp. Parasitol.* 34: 168-173, 1973.
170. RODBELL M. *JB Chem.* 242: 5744-5747, 1967.
171. RODRIGUEZ AM, SANTORO F, AFCHAIN D, BAZIN H, CAPRON A. *Inf. Immun.* 31: 524-529, 1981.
172. ROSENBAUM MB. *Progress in cardiovascular diseases VII*: 199-225, 1964.
173. RUIZ AM, ESTEVA M, FRANKE DE CAZZULO B, TORRUELLA M, SEGURA EL, CAZZULO JJ. III Reunión Anual Soc. Arg. de Protozool. Res 27, Buenos Aires, Argentina, 1983.
174. SALEME A, YANICELLI GL, IÑIGO LA. *Arch. Argentinos Pediatría* 69: 162-169, 1971.
175. SALOMON Y, LONDON C, RODBELL M. *Anal. Biochem.* 58: 541-547, 1974.
176. SANDERSON C, SOUZA W. *J. Cell. Sci.* 37: 275-286, 1979.
177. SANTOS BUCH CA, TEIXEIRA ARL. *J. Exp. Med.* 140: 38-53, 1977.
178. SASTRE MBR, STOPANNI AOM. *FEBS Letters* 31: 137-142, 1973.
179. SCHMATZ D, MURRAY P. *Parasitology* 85: 115-125, 1982.
180. SCHMUÑIS GA, GONZALEZ CAPPAS SM, TRAVERSA OC, YANOVSKY JF. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 89-94, 1971.
181. SCHMUÑIS GA, SZARFMAN A. *Medicina (Buenos Aires)*. 37: 47-53, 1977.
182. SCHMUÑIS GA, SZARFMAN A, LAGENBACH T, SOUZA W DE. *Inf. Immun.* 20: 567-569, 1978.
183. SCOTT MT, MDYES L, WOOD JN, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76,5: 698-700, 1982.
184. SEGURA EL, *Antígenos de las fracciones subcelulares del T. cruzi*. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA, Buenos Aires, Argentina, 1978.

185. SEGURA EL, CURA EN. PAULONE I, VAZQUEZ C, CERISOLA JA. J. Protozool. 21: 571-574, 1974.
186. SEGURA EL, ESTEVA M, QUINTANS CJ, MONTORO LS, WEISSENBACHER MC. Medicina (Buenos Aires) 41: 328-332, 1981.
187. SEGURA EL, PAULONE I, CERISOLA JA, GONZALEZ CAPPA SM. J. Parasitol. 62: 131-133, 1976.
188. SEGURA EL, PEREZ A, ANDRADE J, YANOVSKY, MARTINI GJW. J. Protozool. 30 (1): 164, 1983.
189. SEGURA EL, ENGEL JC, KATZIN VJ, SUBIAS E, ISOLA ED DE, ESTEVA M; LAMMEL E, DE RISSIO AM, GONZALEZ CAPPA SM. Medicina (Buenos Aires), 40: 256, 1980.
190. SEGURA EL, VAZQUEZ C, BRONZINA A, CAMPOS JM, CERISOLA JA, GONZALEZ CAPPA SM. J. Protozool. 24: 540-543, 1977.
191. SENECA J, PEER P, HAMPER B. Nature (Lond.), 209-309, 1966.
192. SIMS P, GUTTERIDGE WE. Biochem. Pharmacol. (Oxford) 27: 2815-2820, 1978.
193. SNARY, D. Cell surface glycoproteins of *T. cruzi*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg. 77, 1:126-129, 1983.
194. SNARY D. Exp. Parasitol. 49, 68-70, 1980.
195. SNARY D, FERGUSON MAJ, SCOTT MT, ALLEN AK. Mol. Biochem. Parasitol. 343-348, 1981.
196. SNARY D, HUDSON L. FEBS Lett. 100, 166-169, 1979.
197. SNARY D, SCOTT MT. Interplay, p 253. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam, 1980.
198. SPENCER JC, ALLAIN DS, SULZER AJ, COLLINS WE. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29: 179-182, 1980.
199. STOPPANI AOM, BOISO JF DE. EXPERIENTIA 29: 1494-1496, 1973.
200. STOPPANI AOM, DOCAMPO R, BOISO JF DE, FRASCH ACC. Mol. Biochem. Parasitol. 2: 3-21, 1980.

201. STROUT RG. J. Parasitol. 48: 100, 1962.
202. SOUZA MC, ROITMAN I. Rev. Inst. Microbio. 2: 187-189, 1971.
203. SZARFMAN A, LUQUETTI A, RASSI A, REZENDE JM, SCHMUÑIS GA. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30: 43-46, 1981.
204. TAKEHARA HA, MOTA I. Congresso Internacional sobre Doença de Chagas. p. 157, Ríó de Janeiro, Brasil, 1979.
205. TALLIAFERRO WH, PIZZI T. J. Infec. Dis. 96: 199-227, 1955.
206. TARUFI WL, MARIA TA, LOPEZ ER. Rev. Assoc Med. Minas Gerais 21: 1-21, 1973.
207. TSANGV, PERALTA J, SIMONS R. Meth Enzimol. 92: 377-391, 1983.
208. TEIXEIRA ARL , SANTOS BUCH CA. Immunol. 28: 401-410, 1975.
209. TEIXEIRA ARL, TEIXEIRA G, MACEDO V, PRATA A. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27: 1097-1107, 1978.
210. TEIXEIRA ARL. Autoimmune mechanisms in Chagas' disease. American Trypanosomiasis Research. PAHO, Sci. Publ. N° 318, 98-108, 1975.
211. TORRUELLA M, FRANKE DE CAZZULO AM, ENGEL JC, RUIZ AM, SEGURA EL, CAZZULO JJ. Comp. Biochem. Physiol. 70B: 463-468, 1981.
212. VATTUONE NH, SZARFMAN A, GONZALEZ CAPPA SM. J. Trop. Med. Hyg. 76: 45-47, 1973.
213. VATTUONE NH, YANOVSKY JF. Exp. Parasitol. 30: 359-363, 1971.
214. WALTER RD, EBERT F. J. Protozool, 26: 653-656, 1979.
215. WHO. Chagas' disease. Report of a study group. Tech. Rep. N° 202, Geneva, 1969.
216. WINIVESKY-COLLI C, RUIZ AM, SEGURA EL. J. Protozool 30(1): 164, 1983.
217. WOOD DE, PIPKIN AC. Exp. Parasitol. 24: 176-183, 1969.

218. WOOD DE, SOUZA E. *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo, 18: 93-96, 1976.
219. YOSHIDA N, NUSSENZWEIG R, PTOCNJAK P, NUSSENZWEIG U, AIKAWA. Science 207: 71, 1980.
220. YOSHIDA N, PLESSMANN CAMARGO E. J. Bacteriol. 136: 1184-1186, 1978.
221. ZELEDON R. Rev. Brasil. Biol. 20: 408-414, 1960.
222. ZELEDON R, ALVARENGA NJ, SCHOSINSKY K. Ecology of *Trypanosoma cruzi*. En: The insect vector. PAHO, Scient. Publ. N°347, 1977.

Apendice

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ACF	Adyuvante completo de Freund
ADN	Acido desoxiribonucleico
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
ATPasa	Adenosina trifosfatasa
BCG	Bacille Calmette Guerin
BLG	β .Lactoglobulina
Bp	<u>Bordetella pertussis</u>
Cp	<u>Corynebacterium parvum</u>
F	Fracción flagelar
Ff	Fracción flagelar fresca
Fl	Fracción flagelar liofilizada
Fli	Fracción flagelar liofilizada inactiva
ip	Vía de inoculación intraperitoneal
KD	Kilodalton
Mc	Fracción microsomal
NAD	Nicotinamina adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamina adenina dinucleótido
OV	Ovoalbúmina
SAB	Seroalbúmina bovina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
sc	Vía de inoculación subcutanea
SS	Solución salina
Trip	Tripomastigotes