

00551

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO

EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

FACULTAD DE QUIMICA

288455

**“PARTICIPACION DE COMPLEJOS INMUNES FORMADOS
POR CRUZIPAINA Y ANTICUERPOS ANTICRUZIPAINA,
EN FENOMENOS DE INFLAMACION”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (Bioquimic)

P R E S E N T A :

Q.F.B. GEORGINA NIETO CASTAÑEDA

MEXICO, D.F.

2001

ESTE TRABAJO FUE DIRIGIDO POR LA DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIERREZ EN EL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM. FUE SUBSIDIADO PARCIALMENTE POR LOS PROYECTOS CONACyT NO. 2795 IM Y POR PAPIIT NO. IN 232399. LA Q.F.B. GEORGINA NIETO CASTAÑEDA AGRADECE LA BECA DE MAESTRIA OTORGADA POR CONACyT CON NUMERO 121717.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Yvonne Rosenstein Azuloay
Vocal	Dr. Pascal Herion
Secretario	Dr. Javier Plasencia de la Parra
Suplente	Dr. Edmundo Lamoyi Vázquez
Suplente	Dr. Fernando García Tamayo

Sitio donde se desarrolló el tema

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Universidad Nacional Autónoma de México, México.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a la Dra. Bertha Espinoza la dirección de este trabajo, y todos los años que trabajé bajo su dirección.

Al Dr. Javier Plasencia y a la Dra. Lilian Yépez por haber formado parte del comité tutorial para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Enrique Ortega por el soporte y apoyo a este proyecto.

A la Q.B. Beatriz Sánchez Hernández, por el apoyo técnico.

Al jurado asignado por sus valiosas observaciones y sugerencias para el mejoramiento de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de maestría No. 121717 que me fue otorgada.

Esto va dedicado a
los dos más grandes regalos,
que me ha dado la vida...

mi pequeño *Roberto Daniel y Carlos... los amo.*

INDICE

Tema	Página
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
I. 1. Enfermedad de Chagas	2
I. 1. 1. Distribución Geográfica de la Enfermedad de Chagas	3
I. 1. 2. Tratamiento y Prognosis de la Enfermedad de Chagas	5
I. 1. 3. Patogénesis de la Enfermedad de Chagas	5
I. 2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
I. 2. 1. Morfología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
I. 2. 2. Ciclo Biológico de <i>T. cruzi</i>	7
I. 3. Cruzipaina, Principal Proteasa de <i>T. cruzi</i> y Blanco de la Respuesta Inmunológica	10
I. 4. Respuesta Inflamatoria y Complejos Inmunes	11
I. 5. Respuesta Inmunológica durante la Miocarditis Crónica de la Enfermedad de Chagas	14
II. OBJETIVOS	17
II. 1. Objetivo General	17
II. 2. Objetivos Particulares	17
III. HIPOTESIS	18
IV. METODOLOGIA	19
IV. 1. Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19

IV. 2. Purificación de Cruzipaína	19
IV. 3. Electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida	20
IV .4. Actividad Proteolítica	20
IV. 4. 1. Caracterización de la Actividad Proteolítica	21
IV. 4. 2. Cuantificación de la Inhibición de la Actividad Proteolítica de la Cruzipaína	22
IV. 5. Identificación de la Cruzipaína por Western Blot	22
IV. 6. Repurificación de Cruzipaína	23
IV. 7. Producción de Anticuerpos Anticruzipaína	23
IV. 7. 1. Purificación de IgG de Suero de Cobayo Anticruzipaína	24
IV. 8. Producción de Anticuerpos Monoclonales Anticruzipaína	25
IV. 9. Producción de Complejos Inmunes Insolubles (CII)	25
IV. 9. 1. Complejos Inmunes Insolubles de cruzipaína (CII-crz)	26
IV. 9. 2. Complejos Inmunes Insolubles de albúmina (CII-alb)	26
IV. 10. Cultivo de Células -774	27
IV. 11. Cultivo y Diferenciación de Células THP-1	27
IV. 12. Cuantificación de la Activación de Estallido Respiratorio (Reducción de NBT)	28
IV. 13. Determinación de la Secreción de Factor de Necrosis Tumoral	28
IV. 13. 1 Cultivo de Fibroblastos L929	30
IV. 14. Cuantificación de Interleucina 1 e Interleucina 6	31
IV. 15. Análisis Estadístico	31
V. RESULTADOS	32

V. 1. Purificación de Cruzipaína	32
V. 1. 1. Pureza de la Cruzipaína	33
V. 2. Producción de Anticuerpos Anticruzipaína	38
V. 3. Formación de Complejos Inmunes Insolubles de Cruzipaína	43
V. 4. Activación de Estallido Respiratorio en Células J-774	44
V. 5. Activación de Estallido Respiratorio en Células THP-1	47
V. 6. Activación de Células THP-1 con Complejos Inmunes Insolubles de Cruzipaína (CII-crz)	50
V. 7. Secreción de TNF, IL-1 e IL-6 por Células THP-1 Estimuladas con CII-crz	54
VI. DISCUSION	59
VII. CONCLUSIONES	68
VIII. BIBLIOGRAFIA	69
APENDICES	
I. Medios de Cultivo para Epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y Células J-774, L-9292 y THP-1	75
II. Diagrama de Flujo para la Purificación de la Cruzipaína	78
III. Disoluciones Amortiguadoras de pH	79
IV. Electroforesis en Gel de Acrilamida/Bisacrilamida	80
V. Electroforesis en Gel de Acrilamida/Bisacrilamida Copolimerizado con Gelatina	82
VI. Western blot	84
VII. Producción de anticuerpos monoclonales	85

LISTA DE ABREVIATURAS

CI: complejos inmunes

CII-crz: complejos inmunes insolubles de cruzipaína

CII-alb: complejos inmunes insolubles de albúmina

crz: cruzipaína

DTT: ditioneitol

E-64: L-trans -epoxisuccinil-leucilamido-(4-guanidino)-butano

EDTA: ácido etilendiamin tetraácetico

HCl: ácido clorhídrico

IFN- γ : interferón gama

IgG: inmunoglobulina G

IL-1: interleucina 1

IL-6: interleucina 6

LPS: lipopolisacárido

NaCl: cloruro de sodio

NBT: nitroazul de tetrazolium

PBS: solución balanceada de fosfatos

PMA: forbol miristato acetato

PMN: polimorfonucleares

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

rhIFN- γ : interferón gama humano recombinante

SFB: suero fetal de bovino

SDS/PAGE: dodecil sulfato de sodio/ gel de electroforesis de poliacrilamida

TGF- α : factor de crecimiento tumoral alfa

TGF- β : factor de crecimiento tumoral beta

TLCK: tosil lisil clorometil cetona

TNF: factor de necrosis tumoral

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, cuyo agente causal es el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, afecta a millones de personas desde Estados Unidos hasta Brasil. La cruzipaína es la principal proteasa de *Trypanosoma cruzi*. Actualmente no se conoce su papel en el desarrollo de la enfermedad de Chagas. Tampoco se sabe el papel que juegan en el desarrollo de la respuesta inmunológica los anticuerpos generados contra esta enzima, ya que éstos parecen no ayudar a bloquear el desarrollo de la enfermedad. Debido a que estos anticuerpos se encuentran de manera muy abundante en los sueros de las personas infectadas con *T. cruzi*, tal vez estos podrían estar promoviendo el daño inflamatorio al miocardio observado en la fase crónica de la infección. Probablemente los anticuerpos anti-cruzipaína al encontrarse con la cruzipaína en el miocardio, formen complejos inmunes que intervengan o favorezcan el desarrollo de la inflamación en este órgano durante la enfermedad de Chagas. Para probar esta hipótesis, se formaron complejos inmunes insolubles de cruzipaína y anticuerpos anti-cruzipaína (CII-crz), que se usaron para estimular macrófagos humanos a los cuales se les determinó la activación de estallido respiratorio y secreción de citocinas pro-inflamatorias como TNF, IL-1 e IL-6. También se probó todo lo anterior estimulando solamente con la cruzipaína o con los anticuerpos anti-cruzipaína por separado. Los resultados demuestran que solo cuando se estimula a los macrófagos con los CII-crz, se activan tanto el estallido respiratorio así como la secreción de TNF e IL-1, pero no así con la cruzipaína o los anticuerpos solos. Esto sugiere que los CII-crz podrían ser responsables de parte del daño observado en el miocardio, durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

I. INTRODUCCION

I. 1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiosis Americana, es una enfermedad infecciosa cuyo agente causal es el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* y es transmitida principalmente por una chinche del genero Triatoma. Cuando un humano ha sido infectado con *T. cruzi*, comienza la fase de la infección conocida como aguda, en la que el individuo puede manifestar ligeros síntomas como fiebre, edema, linfadenopatía, dolor de cabeza y cansancio. Esta fase es corta (de uno a dos meses) y por lo general pasa desapercibida. Durante la fase aguda el parásito se encuentra en la circulación sanguínea y puede invadir una amplia gama de estirpes celulares incluyendo macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y células musculares. En esta fase la enfermedad puede ser diagnosticada con relativa facilidad, siempre y cuando se lleve a cabo el diagnóstico adecuado. El diagnóstico se hace generalmente por xenodiagnosis, hemocultivo o bien por detección de anticuerpos contra el parásito por métodos serológicos.

Al final de la fase aguda el parásito desaparece de la circulación sanguínea y los individuos infectados se encuentran generalmente asintomáticos. Esta fase de la infección se conoce como crónica asintomática ó “indeterminada” y su duración puede llegar a ser de 10 a 30 años aproximadamente. Transcurrido el periodo asintomático, aparece la fase que se conoce como crónica sintomática. La principal característica de esta fase, en los individuos infectados, es la ausencia del parásito en la circulación sanguínea y la generación de crecimiento anormal y degenerativo de algunos organos en el huésped, principalmente el esófago, el colon y el corazón (OMS, 1991). El daño al corazón se genera aproximadamente en un 25 al 30 % de los individuos infectados con *T. cruzi*. Este daño está generalmente acompañado de un infiltrado celular rico en

linfocitos T (Cunha-Neto et al., 1995; Cunha-Neto et al., 1994). El restante 60-70 % de los individuos infectados crónicamente permanecen asintomáticos o desarrollan inflamación de esófago y colon (Rezende, 1984).

Uno de los principales problemas que enfrentan los países donde existe la enfermedad de Chagas, es el diagnóstico de la enfermedad, pues no existe una prueba completamente efectiva que detecte la infección en cualquier fase de la enfermedad. Debido a que en la fase aguda la sintomatología de la infección no es muy grave, la gente no acude al servicio médico para que se le diagnostique la enfermedad o bien la gente acude hasta que los síntomas más graves de la enfermedad se manifiestan (durante la fase crónica). En este momento la enfermedad se encuentra ya muy avanzada y prácticamente no se puede ayudar al paciente.

I. 1. 1. Distribución Geográfica de la Enfermedad de Chagas

La distribución geográfica de esta enfermedad está limitada principalmente al continente Americano (figura 1), debido a que el vector transmisor de la enfermedad se encuentra sólo en este continente. Los vectores, insectos hematófagos de la familia de los Reduvidae (también llamados chinches), se encuentra desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina. Algunos factores que favorecen la cohabitación de la chinche con los humanos son: que las personas viven en chozas con paredes de adobe, pisos de tierra, techos de palma, etc. Estas condiciones favorecen una prevalencia alta de la infección por *T. cruzi* (OMS, 1991).

Esta enfermedad representa un problema de salud grave en 17 países latinoamericanos, con un total estimado de 100 millones de personas expuestas a la enfermedad y de 16 a 18 millones de personas infectadas en toda América Latina (OMS, 1991). En México, en los últimos años se han descrito alrededor de 300 casos de infección por *T. cruzi*. Los estados donde el problema es

más serio son: Oaxaca, Chiapas, Jalisco, Yucatán, Morelos y Zacatecas (Lozano et al., 1995; Reyes, 1984; Reyes et al., 1983; Salazar et al., 1984; Trujillo et al., 1993a; Trujillo et al., 1993b; Velasco et al., 1992).



FIGURA 1. Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas en América.

Las zonas punteadas representan los lugares donde existe la enfermedad. Tomado de OMS, 1991

I. 1. 2. Tratamiento y Prognosis de la Enfermedad de Chagas

Existen algunos fármacos como el benznidazol que parecen ser efectivos para eliminar a *T. cruzi*, siempre y cuando se administre cuando el parásito aún se encuentra en circulación sanguínea, es decir, durante la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, por la naturaleza de los síntomas, la infección pasa desapercibida y por lo tanto no se administra ningún medicamento como tratamiento para detener el progreso de la infección por *T. cruzi*. En la fase crónica sintomática, que se manifiesta hasta que los organos afectados (esófago, colon o corazón) presentan distrofia y crecimiento anormal, el parásito ha desaparecido de la circulación sanguínea y por lo tanto ya no puede ser eliminado con los fármacos empleados para el tratamiento en la fase aguda. Este hecho, aunado al desconocimiento del mecanismo a través del cual se desarrolla el proceso degenerativo en el esófago, el colon o el corazón, hace que este padecimiento se convierta en un problema grave de salud pública, pues una vez que ha comenzado la fase crónica sintomática de la enfermedad, la calidad de vida del individuo infectado disminuye progresivamente hasta llegar a la muerte. Esto último, hace que el problema se extienda al sector económico, pues el individuo crónicamente infectado con *T. cruzi*, no podrá desarrollar su trabajo eficientemente o se encontrará imposibilitado para esa actividad, debido a la debilitación física y demás síntomas que se presentan en esta fase.

I. 1. 3. Patogénesis de la Enfermedad de Chagas

En la enfermedad de Chagas no se conoce completamente el mecanismo de patogénesis del daño observado en el esófago, colon y corazón. Debido a que el daño crónico observado en el esófago, colon o corazón es de tipo inflamatorio, se han postulado varias teorías para explicar esta patología. Una teoría postula que el daño es generado a través de un proceso de tipo

autoinmunológico (Theofilopoulos, 1995). Se tiene evidencia de que una vez que el parásito ha desaparecido de la circulación sanguínea, este no se encuentra frecuentemente en los sitios de inflamación, pero si se encuentran sus antígenos de secreción (De Titto et al., 1985; Higuchi et al., 1997). Parece ser que algunos de estos antígenos presentan mimetismo con las proteínas del huésped, por lo que el sistema inmunológico genera una respuesta contra el mismo huésped (Cunha-Neto et al., 1995; Melo et al., 1998; Tarleton et al., 1997).

Otra teoría postula que los antígenos del parásito por si mismos o formando complejos con otras proteínas, pueden activar a células que participan en los fenómenos de inflamación (Morrot et al., 1997). Se sabe que los complejos inmunes, formados por antígenos unidos a sus anticuerpos, son capaces de promover el proceso de inflamación a través de la activación de células proinflamatorias, como los macrófagos (Roitt et al., 1998). Debido a que algunos antígenos de *T. cruzi* generan una fuerte respuesta inmunológica humoral durante la fase crónica de la infección, ya que los antígenos se encuentran presentes en los sitios de inflamación (Higuchi et al., 1997; Morrot et al., 1997; Reis et al., 1997), es posible que se formen complejos inmunes que estén promoviendo el daño en el esófago, colon y corazón a través de la generación de un proceso inflamatorio crónico, que traiga como consecuencias el aumento del tamaño de estos organos y su distrofia.

I. 2. *Trypanosoma cruzi*.

I. 2. 1. Morfología de *Trypanosoma cruzi*.

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoario flagelado que pertenece al orden kinetoplastida, cuyos miembros se caracterizan por poseer un cinetoplasto. El cinetoplasto es un organelo que contiene una red fibrosa de DNA (Noble et al., 1989). Este parásito presenta tres diferentes estadios, cuya identificación se basa en un criterio morfológico que considera la forma

de la célula, la posición que guarda el cinetoplasto con respecto al núcleo y la región de donde emerge el flagelo. De acuerdo a estos criterios los tres diferentes estadios de *T. cruzi* son: tripomastigote, amastigote y epimastigote.

Tripomastigote: Presenta una forma alargada que mide aproximadamente 20 μm de longitud y 2 μm de ancho. Tiene el cinetoplasto localizado en la parte posterior al núcleo, un flagelo que emerge de la parte posterior al núcleo y una membrana ondulante que se extiende a lo largo del organismo. La fase de tripomastigote se encuentra en el huésped extracelularmente, en la circulación sanguínea y para poder replicarse invade las células del huésped y se transforma en amastigote. En la chinche, el tripomastigote se encuentra extracelularmente en la parte posterior del intestino del insecto. Para hacer una diferencia entre los tripomastigotes que se localizan en el huésped y los que se localizan en la chinche, a estos últimos se les llama tripomastigotes metacíclicos.

Amastigote: Presenta una forma circular que mide aproximadamente 2 a 4 μm de diámetro. Posee un flagelo corto y se multiplica por fisión binaria. Se localiza intracelularmente.

Epimastigote: Presenta una forma alargada que mide entre 20 μm y 40 μm de longitud. El epimastigote tiene un flagelo que emerge de la parte anterior al núcleo. El cinetoplasto está localizado también en la parte anterior al núcleo. El epimastigote crece en la parte media del intestino de la chinche, donde se multiplica, y eventualmente pasa a la parte posterior del intestino del insecto, donde se transforma en tripomastigote (Pereira, 1990).

I. 2. 2. Ciclo Biológico de *T. cruzi*.

El ciclo biológico de *T. cruzi* (figura 2), comienza cuando una chinche del género *Triatoma* (la cual es hematófaga), se alimenta de un humano u otro huésped mamífero (como el tlacuache,

el conejo, el armadillo, o el ratón, entre otros) infectado con *T. cruzi*. Cuando la chinche succiona la sangre para alimentarse, ingiere los tripomastigotes. Los tripomastigotes, al llegar al intestino de la chinche se transforman a epimastigotes para poder replicarse. A medida que el insecto va digiriendo la sangre infectada, los epimastigotes llegan a la parte posterior del intestino de la chinche y aquí se transforman a tripomastigotes metacíclicos. Cuando la chinche se vuelve a alimentar, al mismo tiempo que está succionando la sangre de otro huésped, defeca. En las heces se encuentran los tripomastigotes metacíclicos y como las heces quedan muy cerca de la herida que provocó la chinche para alimentarse, el huésped siente comezón y se rasca, introduciendo a los tripomastigotes en la misma herida. Esto hace que los tripomastigotes alcancen rápidamente la circulación sanguínea. Si el huésped se rasca los ojos con los mismos dedos con los que introdujo a los tripomastigotes en la herida de picadura, el parásito también puede penetrar a la circulación sanguínea a través de la mucosa ocular. En este caso se produce una inflamación de los párpados que se conoce como Chagoma o signo de Romaña. Cuando los tripomastigotes se encuentran en la circulación sanguínea, invaden las células del huésped (al parecer no hay una célula blanco en especial). Una vez dentro de las células, los tripomastigotes se transforman a amastigotes y se replican por fisión binaria. Cuando los amastigotes repletan la célula huésped, se vuelven a transformar en tripomastigotes. En este momento la célula se rompe y libera a los nuevos tripomastigotes, los cuales se dirigen a otras células para continuar con la infección. El ciclo se cierra cuando otra chinche vuelve a picar al huésped infectado y recoge a nuevos tripomastigotes en la sangre que succiona (figura 2), (Katz et al., 1988).

Si los tripomastigotes en el huésped invaden células musculares de esófago, colon o corazón, se genera en estos tejidos un daño crónico de tipo inflamatorio que hace que estos organos aumenten de tamaño y presenten distrofia.

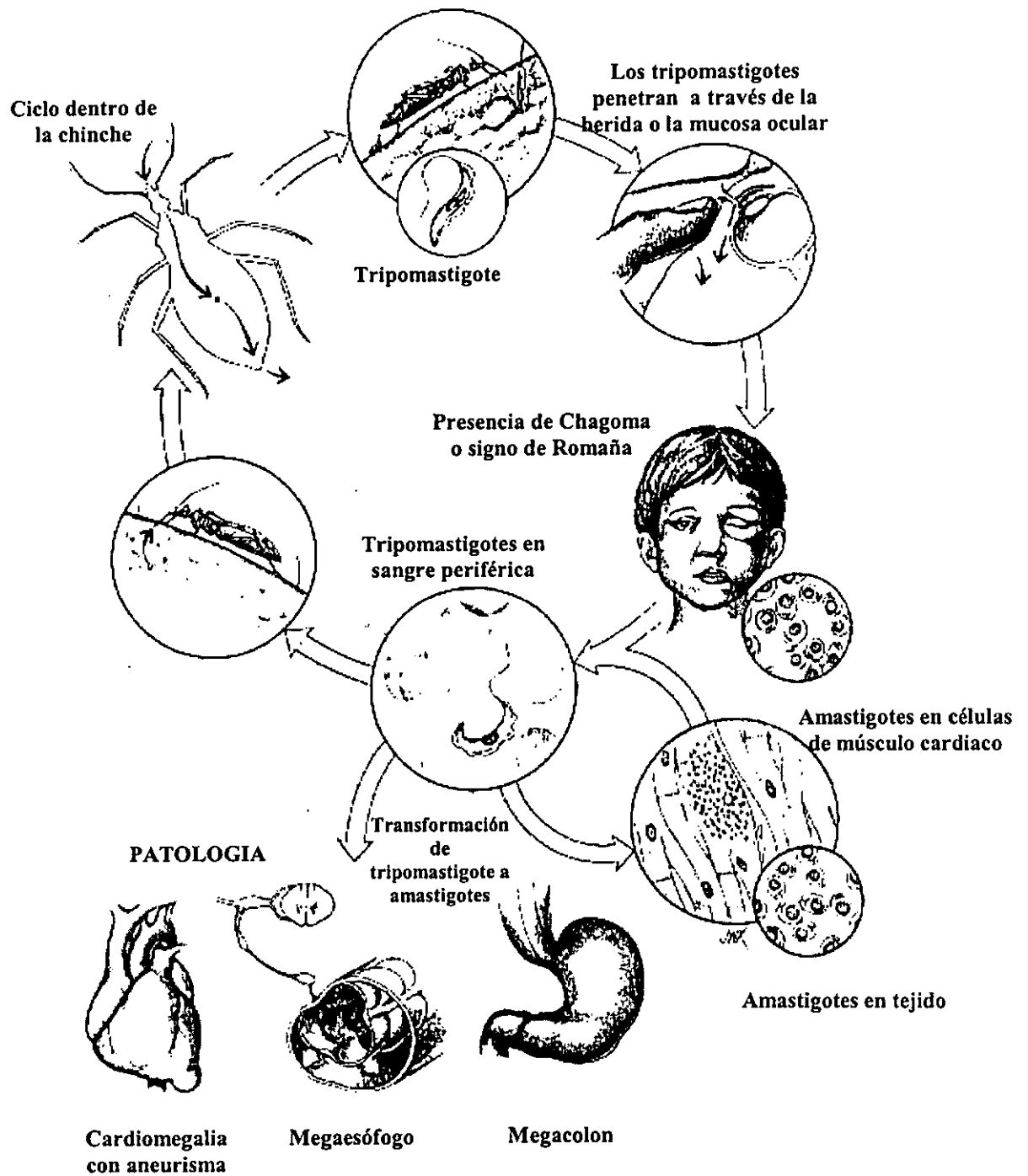


FIGURA 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. (Tomado de Katz, 1988)

I. 3. Cruzipaina, Principal Proteasa de *T. cruzi* y Blanco de la Respuesta Inmunológica

La cruzipaina es la principal proteasa de *T. cruzi*. Es una proteasa de cisteína, cuya actividad enzimática es inhibida completamente por E-64 (un inhibidor específico de proteasas de cisteína) (Murta et al., 1990). Esta enzima presenta homología en su extremo amino terminal con la papaína y la catepsina L, de donde se deriva el nombre de cruzipaina (Cazzulo et al., 1989). Esta enzima es clave para el parásito, ya que cuando su actividad se inhibe, se ven afectados procesos como: la digestión del parásito, la invasión de la célula huésped por el parásito y la degradación del citoesqueleto para la transformación de una fase a otra del parásito (Bontempi et al., 1984; Bontempi et al., 1989; McKerrow, 1989; McKerrow, 1993; Meirelles et al., 1992).

El descubrimiento de la cruzipaina se relaciona al estudio del antígeno gp25, una glicoproteína de *T. cruzi*, usada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Scharfstein et al., 1985). Esta glicoproteína es un producto de degradación del antígeno gp57/51, que es una proteasa expresada por los epimastigotes y tripomastigotes sanguíneos (Hellman et al., 1991; Scharfstein et al., 1986). La proteasa gp57/51 es una molécula altamente inmunogénica, y blanco de la respuesta inmune del huésped (Murta et al., 1990), motivo por el cual ha sido empleada en las pruebas serológicas de diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Actualmente se sabe que el antígeno gp57/51 es la cruzipaina y que a través de su autólisis genera el antígeno gp25.

En estudios de caracterización de las proteasas de extractos y sobrenadantes de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, se encontró que tanto en los extractos como en los sobrenadantes, existe una proteasa de 45-60 kDa que es inhibida por E-64, leupeptina y TLCK (inhibidores de proteasas de cisteína). Esto confirma que se trata de una proteasa de cisteína (Nieto, 1997). Por medio del uso de un suero policlonal anti-cruzipaina, se encontró que esta proteasa de extractos y

sobrenadantes de epimastigotes corresponde a la cruzipaína (Nava, 1997). Lo que indica que la cruzipaína se encuentra formando parte del parásito y además es secretada por el mismo.

Siendo la cruzipaína tan importante para el metabolismo del parásito y para la invasión a la célula huésped, resulta paradójico el hecho de que sea un blanco principal de la respuesta inmunológica humoral. Sin embargo, los anticuerpos generados contra ella, no parecen dar protección al huésped. Existe la posibilidad de que puedan formarse complejos inmunes (antígeno/anticuepo) en los sitios de inflamación, ya que en esos sitios se encuentran los antígenos de secreción del parásito (Higuchi et al., 1997). Si los anticuerpos contra estos antígenos llegan a los sitios de inflamación a través de la circulación sanguínea o bien porque células plasmáticas secreten éstos anticuerpos en los propios sitios de inflamación, entonces se forman complejos inmunes que pueden favorecer un fenómeno de inflamación crónico.

I. 4. Respuesta Inflamatoria y Complejos Inmunes.

La respuesta inflamatoria tiene como objetivo principal llevar leucocitos y moléculas plasmáticas a los sitios donde se encuentra un proceso infeccioso o daño tisular. El desarrollo de una reacción inflamatoria está controlado por la secreción de citocinas y de mediadores vasoactivos (Roitt et al., 1998). La respuesta inflamatoria puede ser de tipo aguda o crónica.

La respuesta inflamatoria aguda es inmediata y se genera cuando algún tejido se expone a elementos dañinos como: toxinas bacterianas, componentes activadores del complemento, alérgenos, radiaciones ultravioleta; o bien cuando se sufre daño traumático. En la respuesta inflamatoria aguda existe principalmente una reacción exudativa, en la que se encuentran proteínas plasmáticas y leucocitos polimorfonucleares (PMN) provenientes de la circulación sanguínea. Al dañarse el tejido, los mastocitos que se encuentran en la proximidad de la zona

dañada, liberan sustancias vasodilatadoras como histamina y serotonina. Estas sustancias inducen vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Esto da por resultado la salida de plasma a los tejidos. La acumulación de plasma en los tejidos se conoce como edema. Posteriormente se observa la migración de PMN desde la circulación sanguínea hacia el tejido dañado. Estas células tienen la tarea de eliminar el agente causal del daño tisular.

La respuesta inflamatoria crónica se desarrolla cuando el agente que desencadenó la respuesta persiste por tiempos largos. En particular las toxinas o los antígenos microbianos son potentes inductores de inflamación crónica. Este tipo de inflamación se caracteriza por la infiltración de macrófagos y linfocitos. Si el estímulo que generó el daño tisular no ha podido ser eliminado por los PMN, éstos comienzan a liberar citocinas y mediadores solubles, que activan a otras células como los macrófagos y linfocitos. Los macrófagos una vez activados, al llegar al tejido dañado, tienen la capacidad de destruir más eficientemente que los PMN, a los agentes que generaron la inflamación (principalmente microorganismos patógenos) (Trowbridge and Emling, 1997). Si el estímulo no puede ser eliminado, la inflamación progresa hasta formar granulomas, donde los linfocitos proliferan y liberan citocinas que activan a otras células como los macrófagos.

Una de las principales funciones de los macrófagos y PMN en el sitio de inflamación, es la eliminación de agentes infecciosos. Pero primero, los leucocitos son atraídos al agente patógeno por los agentes que forman las quimiocinas. Esta atracción se da debido a sustancias que son depositadas sobre el agente patógeno, para alertar al sistema inmunológico. Las principales sustancias que realizan esta función son el complemento y los anticuerpos. Ambos son también llamados opsoninas, porque inducen una mayor actividad fagocítica en los macrófagos y los PMN. El reconocimiento del complemento y de los anticuerpos por los macrófagos y los PMN, se lleva a cabo a través de receptores específicos que se encuentran en la superficie de los

leucocitos. De esta forma, las opsoninas sirven de puente entre el agente patógeno y las células fagocíticas encargadas de destruirlo.

El reconocimiento de los anticuerpos se lleva a cabo a través de una clase de receptores presente en la membrana de los macrófagos y los PMN, llamada receptores Fc. Cuando los anticuerpos unidos a su antígeno (agente patógeno) son reconocidos por los receptores Fc, se induce el entrecruzamiento de estos receptores en la membrana del leucocito, favoreciendo con esto la fagocitosis y la producción de sustancias contra el agente patógeno (Sánchez-Mejorada and Rosales, 1998).

En ocasiones, sustancias provenientes de los microorganismos patógenos son liberadas a la circulación sanguínea, ya sea por secreción activa, o bien por la destrucción del microorganismo. Cuando estas sustancias (antígenos) son reconocidas por el sistema inmunológico, dan lugar a la producción de anticuerpos. La unión de los antígenos con sus respectivos anticuerpos da lugar a la formación de complejos inmunes (CI), en la circulación sanguínea. Si el antígeno secretado se encuentra en grandes cantidades o persiste por mucho tiempo los CI formados, se pueden depositar en la superficie de células de algún tejido sano. Si estos complejos inmunes son reconocidos por macrófagos y por PMN, a través de receptores Fc, estas células tratan de fagocitar los tejidos como si fueran microorganismos. Al ser el tejido mucho más grande que un microorganismo, el leucocito no lo puede fagocitar. En este caso los macrófagos y los PMN se ven "impedidos" en su intento de fagocitosis y por lo tanto liberan sustancias para destruir a las células donde se depositaron los CI. Estas sustancias incluyen a los radicales libres, a los iones superóxido, a óxido nítrico y a enzimas. Todas estas sustancias generan un daño tisular grave (Roitt et al., 1998).

Se piensa que una situación similar a la descrita arriba, es la que ocurre durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas. En los tejidos dañados de pacientes chagásicos se ha encontrado persistencia de antígenos de *T. cruzi*. Esta persistencia de antígenos correlaciona con un abundante infiltrado de leucocitos (Higuchi et al., 1997; Zhang and Tarleton, 1999). Muy probablemente la formación de CI con antígenos de *T. cruzi* sea en parte, responsable de la activación de células fagocíticas que resulta en la destrucción observada en los tejidos inflamados.

I. 5. Respuesta Inmunológica durante la Miocarditis Crónica de la Enfermedad de Chagas

No existe una teoría clara que explique el mecanismo por el cual se desarrolla la inflamación del corazón en la fase crónica de la infección por *T. cruzi*. Se han postulado múltiples mecanismos, que van desde aquellos que proponen que el daño cardíaco es resultado de procesos de tipo autoinmune, hasta aquellos que proponen que la miocarditis es resultado de una fuerte activación de células inflamatorias. El hallazgo que favorece la idea de un mecanismo autoinmune es que algunos antígenos parasitarios (como las proteínas ribosomales P1 y P2) presentan mimetismo con proteínas del huésped (Motrán et al., 2000). La activación de células proinflamatorias, se da a través de la secreción de interleucinas; las cuales pueden modular la progresión de daño al corazón o bien de restablecimiento. Parece ser que un patrón de secreción de interleucinas favorece el daño al corazón, mientras que otro patrón diferente favorece la eliminación del daño. En este sentido no hay nada concluyente e incluso la evidencia encontrada hasta ahora, en muchos casos parece ser contradictoria (Kierszenbaum, 1999).

Sin embargo, en aquellos modelos donde se ha estudiado el daño inflamatorio en el corazón durante la fase crónica de la infección por *T. cruzi*, se sabe que existe un gran infiltrado de células inflamatorias entre las que destacan: linfocitos T CD4+ y CD8+, macrófagos y linfocitos B. El papel que desempeñan cada una de estas células en el proceso inflamatorio en el corazón no es claro. Es posible que la predisposición del huésped a la infección y el tipo cepa de *T. cruzi*, influyan en el papel que puedan jugar estas células, ya sea promoviendo o evitando la inflamación cardiaca en la enfermedad de Chagas (Caballero-García, 1996).

La inflamación crónica en el corazón se ha estudiado generalmente en modelos de infección por *T. cruzi* en ratones y conejos; algunas veces se han logrado hacer estudios en corazones humanos provenientes de necropsias de pacientes infectados con *T. cruzi*. En estos modelos, se ha encontrado que en los sitios de inflamación hay concentraciones variables de interleucinas tales como IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TGF- β , TNF- α e IFN- γ (Abrahamsohn, 1998; Morato et al., 1998; Silva et al., 1998; Sunnemark et al., 1998; Chaussabel et al., 1999; Huang et al., 1999). El papel que desempeñan cada una de estas interleucinas, depende del modelo de infección por *T. cruzi* donde hayan sido analizadas. Parece ser que en huéspedes susceptibles a la infección, e infectados con una cepa virulenta de *T. cruzi*, citocinas como la IL-12 promueven el daño al corazón a través de la activación de una respuesta citotóxica. Pero si se infectan huéspedes no susceptibles con una cepa no virulenta de *T. cruzi*, entonces la IL-12 promueve la eliminación del parásito y el restablecimiento del tejido dañado.

En algunos modelos donde se ha observado el desarrollo de un proceso inflamatorio crónico en el corazón, las interleucinas secretadas por células del sistema inmunológico, promueven mecanismos que causan daño al miocardio en la fase crónica de la enfermedad de Chagas (Morato et al., 1998; Silva et al., 1998; Sunnemark et al., 1998). Este proceso puede llevarse a

cabo a través del favorecimiento de infiltración y activación celular en los sitios de inflamación donde no se encuentra el agente patógeno. En este caso, las células activadas tienen la capacidad de destruir al tejido sano y generar un daño inflamatorio de tipo crónico.

Es posible suponer que si existen depósitos extracelulares de cruzipaina entre los infiltrados celulares (Morrot et al., 1997), esta proteína pueda formar CI con los anticuerpos anticruzipaina. De ser así, los CI serían capaces de activar a células que participan directamente en la promoción de la inflamación crónica en el corazón. Se sabe que la activación de macrófagos, vía su estimulación por entrecruzamiento de sus receptores Fc por CI, hace que los macrófagos puedan estimular a otras células inflamatorias a través de la secreción de interleucinas como IL-1, IL-6 y TNF, promoviendo continuamente la infiltración celular en el tejido dañado. Aparentemente esto también ocurre en el corazón de individuos crónicamente infectados con *T. cruzi*. Por lo cual, el estudio de la activación de macrófagos, generada por CI formados por un antígeno inmunodominante de *T. cruzi*, como lo es la cruzipaina es importante para intentar explicar el proceso a través del cual se genera el daño al corazón en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

II. OBJETIVOS

II. 1. Objetivo General

- Estudiar la activación de macrófagos generada por complejos inmunes insolubles (cruzipaína-IgG anticruzipaína), como posible evento que favorezca la inflamación crónica.

II. 2. Objetivos Particulares.

- Purificar cruzipaína a partir de extracto de epimastigotes
- Establecer las condiciones óptimas para la formación de complejos inmunes insolubles entre la cruzipaína y los anticuerpos anticruzipaína.
- Determinar si los complejos inmunes insolubles de cruzipaína-IgG anticruzipaína, activan funciones fisiológicas celulares como el estallido en células monocíticas humanas (THP-1), diferenciadas a macrófagos.
- Estudiar la secreción de citocinas proinflamatorias (TNF, IL-1 e IL-6) al estimular células monocíticas humanas (THP-1), diferenciadas a macrófagos con complejos inmunes insolubles (cruzipaína-IgG anticruzipaína).

III. HIPOTESIS.

- La hipótesis en que se basa este trabajo es que los complejos inmunes de cruzipaina y anticuerpos anticruzipaina depositados en los tejidos son capaces de activar a células, como macrófagos, y esto favorece entonces un estado de inflamación crónica que causa el daño tisular.

IV. METODOLOGIA.

IV. 1. Cultivo de *Trypanosoma cruzi*.

Los epimastigotes (cepa Y), se cultivan a 28 °C en medio LIT (Liver Infusion Tryptose), suplementado con 10 % de suero fetal bovino, SFB (GIBCO), inactivado a 56 °C durante 30 minutos, y con 25 µg/ml de hemina (SIGMA) a pH 7.2 (ver apéndice I). Los epimastigotes (aproximadamente 5×10^6) se incuban a 27 °C en un volumen final de 5 ml de LIT al 10% de SFB, en botellas de plástico de 25 cm² (COSTAR). A los ocho días de incubación, el cultivo se expande pasando los 5 ml de las botellas de 25 cm² a botellas de 75 cm² con un volumen final de 50 ml de LIT al 10 % de SFB. A los 15 días se repite el procedimiento pasando los 50 ml de las botellas de 75 cm² a botellas giratorias y ajustando a un volumen final de 150 ml de medio. El cultivo se incuba a 27 °C en agitación por rotación durante ocho días, al cabo de los cuales se agregan otros 150 ml de medio fresco y se incuba durante ocho días más. Al final se separan los parásitos del medio de cultivo, por medio de centrifugación (1 500 x g durante 10 minutos) y los parásitos se lavan tres veces con PBS (López-Olmos et al., 1998).

IV. 2. Purificación de Cruzipaína.

La purificación de cruzipaína se lleva a cabo de acuerdo al protocolo para obtención de cruzipaína a partir de extracto de epimastigotes del Dr. J. Scharfstein (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Fulho-UFRJ, Brasil, comunicación personal). Los parásitos obtenidos, como se describe arriba, se pesan para obtener el peso húmedo y se resuspenden en una disolución de H₂O, EDTA 2 mM y PMSF 1 mM a pH 6. Para 84 g de peso húmedo de parásitos se ajusta el volumen a 200 ml con la disolución anterior. Los parásitos en esta suspensión son lisados por sonicación, usando pulsaciones de 3.5 segundos a 80 watts durante tres ciclos de 5 minutos cada

uno. Después el lisado de parásitos se resuspende en un volumen final de 1000 ml con la misma disolución y se centrifuga a 7 000 x g durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante obtenido se acidifica a pH 4.2 con HCl diluido, agitando lentamente en baño de hielo durante 30 minutos. Esta suspensión se centrifuga a 7,000 x g durante 1 hora a 4 °C. El nuevo sobrenadante obtenido se ajusta a pH 4.7 y se precipita con sulfato de amonio al 60 % de saturación, manteniendo en todo momento el sobrenadante en baño de hielo con agitación lenta y constante. Esta suspensión se deja agitando toda la noche a 4 °C y después se centrifuga a 12,000 x g durante 1 hora a 4 °C. El precipitado obtenido se redisuelve en 45 ml de PBS, EDTA 2 mM y se dializa contra 3 litros de amortiguador de acetato de sodio 10 mM, EDTA 2 mM y NaCl 15 mM, pH 5. La fracción obtenida después de la diálisis corresponde a la cruzipaina purificada, que se almacena en alícuotas a -20 °C (ver apéndice II).

IV. 3. Electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida.

La separación de proteínas por medio de electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida con duodecilsulfato de sodio (SDS/PAGE), se realiza en una cámara Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad) en condiciones no reductoras a 200 volts (ver apéndice IV).

IV .4. Actividad Proteolítica.

La actividad proteolítica de la cruzipaina se determina en geles de acrilamida al 11 % copolimerizados con gelatina al 2 % como sustrato enzimático (ver apéndice V). La electroforesis se corre a 130 volts a 4 °C durante 45 minutos. Al final de la electroforesis, el gel se incuba con agitación, en una disolución de Tritón 100X al 2.5 % durante 1 hora a temperatura ambiente. La disolución anterior se retira y el gel se incuba en una disolución amortiguadora de

acetatos con ditioneitol (DTT) (ver apéndice III), durante 18 horas a 37 °C. Posteriormente el gel se tiñe durante 15 minutos, con 0.1 % de negro amido, disuelto en una disolución de 30 % de metanol y 10 % ácido acético. Finalmente el gel se destiñe en una disolución de 30 % de metanol y 10 % ácido acético. Esta disolución se cambia varias veces hasta que las bandas de actividad proteolítica sean visibles. La actividad proteolítica se observa como bandas claras en el fondo oscuro del gel (Helssen and Dowdle, 1980).

IV. 4. 1. Caracterización de la Actividad Proteolítica.

La caracterización de la actividad proteolítica, se realiza incubando los geles de acrilamida copolimerizados con gelatina (ver sección anterior), en una disolución amortiguadora de acetatos-DTT pH 5.6, que contiene el inhibidor de proteasas correspondiente según la tabla siguiente:

INHIBIDOR	Tipo de Proteasa	Concentración del stock (mM)	Concentración Final (µM)
Bestatina	Metalo	1	10
E-64	Cisteina	1	10
Leupeptina	Serina/Cisteina	10	10
Pepstatina	Acido Aspártico	1	1
1,10-Fenantrolina	Metalo	200	10
PMSF	Serina (también Cisteina)	200	1
TLCK	Serina	10	100
EDTA	Metalo	500	10

IV. 4. 2. Cuantificación de la Inhibición de la Actividad Proteolítica de la Cruzipaína.

La cuantificación de la inhibición de la actividad proteolítica se realizó midiendo por densitometría la intensidad de las bandas en los geles de acrilamida copolimerizados con gelatina, con ayuda del programa RALF para Windows, versión 2.1 (Scanalitics).

IV. 5. Identificación de la Cruzipaína por Western Blot.

Las muestras de cruzipaína se corren en un gel de acrilamida al 12 % a 200 volts y posteriormente se transfieren a una membrana de nitrocelulosa a 100 volts durante 1 hora (ver apéndice VI) (Gershoni and Palade, 1983). La membrana se bloquea con una disolución de leche descremada al 10 % disuelta en PBS, durante 2 horas a 37 °C ó durante toda la noche a 4 °C, en agitación constante. En seguida se agrega el primer anticuerpo (suero policlonal de conejo anticruzipaína, o suero de ratón anticruzipaína, o suero de cobayo anticruzipaína o suero de humano infectado con *T. cruzi*, según sea el caso) diluido en la misma disolución de bloqueo. La membrana se incuba con el primer anticuerpo durante 2 horas a temperatura ambiente, ó bien toda la noche a 4 °C en agitación constante. La membrana se lava entonces tres veces durante 10 minutos cada vez con una disolución de PBS-tween-20 al 0.1 %. Después se agrega el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (anti-IgG de ratón, o anti-IgG de conejo, o anti-IgG de cobayo, o anti-IgG de humano, según sea el caso correspondiente), diluido 1/2000 en la disolución de PBS-tween-20. La membrana se incuba con el segundo anticuerpo durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante y posteriormente se lava con PBS-tween-20 igual que antes. Finalmente la membrana se revela con el sustrato de la peroxidasa (0.5 mg de diaminobenzidina y 16.5 µl de H₂O₂ al 30 % diluidos en 1 ml de PBS). La reacción se detiene, cuando aparecen bandas cafés, retirando el sustrato y lavando la membrana con abundante agua destilada.

IV. 6. Repurificación de Cruzipaína.

En algunos casos fue necesario hacer una repurificación de la cruzipaína debido a que ésta contenía rastros de otras proteínas. Esto se lleva a cabo por medio de electroelusión de la siguiente manera: entre 9 y 15 mg de proteína total se colocan en un gel preparativo (14 cm x 12 cm) de acrilamida al 12 % y se corre la electroforesis a 50 volts durante toda la noche a 4 °C. Al gel de acrilamida se le corta una tira vertical y ésta se tiñe con azul de Coomasie para visualizar la banda de cruzipaína. Del resto del gel, se corta entonces, la banda correspondiente a la cruzipaína (45 kDa aproximadamente). La tira de gel que contiene a la cruzipaína se corta en pedazos finos y se coloca en la trampa de electroelusión del equipo para electroelusión Little Blue Tank (Isco). La electroelusión se realiza a 5 mA durante 4 horas a 4 °C. La fracción colectada después de la electroelusión contiene la cruzipaína pura. La pureza de la enzima se verifica por electroforesis, Western blot y actividad proteolítica.

IV. 7. Producción de Anticuerpos Anticruzipaína.

Cobayos hembra adultos (10 semanas de edad) se inmunizan con 20 µg de cruzipaína pura emulsionada 1:1 con adyuvante de Freund (completo para la primera inyección e incompleto para las subsecuentes inmunizaciones). Los cobayos se inyectan por vía subcutánea cada 10 días. Diez días después de la tercera inmunización se obtienen 2 ml de sangre por punción cardíaca, para obtener el suero, y verificar la presencia de anticuerpos anticruzipaína en el suero. En caso positivo, los animales se sangran a blanco, de lo contrario se vuelven a inmunizar.

También se inmunizan ratones hembra de la cepa BALB/c (6 semanas de edad), con 5 µg de cruzipaína pura emulsionada 1:1 con adyuvante de Freund (completo para la primera inyección e incompleto para las subsecuentes inmunizaciones). Los ratones se inmunizan por vía

intraperitoneal cada 10 días. Diez días después de la tercera inmunización se obtienen unas gotas de sangre por la cola del ratón, y se separa el suero para verificar la presencia de anticuerpos anticruzipaína. Si los sueros de los animales aun no tienen anticuerpos anticruzipaína, los animales se vuelven a inmunizar.

IV. 7. 1. Purificación de IgG de Suero de Cobayo Anticruzipaína.

Se usa una columna de proteína A acoplada a sefarosa (GIBCO) de aproximadamente 1 ml. Antes de usarla, la columna se lava con 100 ml de amortiguador de fosfatos 0.14 M, pH 8.0. Después se agregan 2 ml de suero de cobayo anticruzipaína a la columna, y se deja incubando toda la noche a 4 °C en agitación constante. Después la columna se vuelve a lavar con 100 ml de amortiguador de fosfatos 0.14 M, pH 8.0 ó hasta que la absorbancia del lavado a 280 nm sea de cero. Enseguida la columna se eluye con 10 ml de glicina 0.2 M, pH 2.8, colectando fracciones de aproximadamente 800 µl en tubos eppendorf que contienen 200 µl de Tris 1 M, pH 8.0 para neutralizar. La absorbancia a 280 nm de cada fracción se determina en un espectrofotómetro para obtener la curva de elución. Al final de la elución, la columna se vuelve a lavar con 150 ml de amortiguador de fosfatos y se guarda en 1 ml de amortiguador de fosfatos con azida de sodio al 0.02 %. Una muestra de las fracciones obtenidas de la elución se corre en un gel de acrilamida al 12 % durante 1 hora a 200 volts y se tiñe con azul de Coomasie para verificar la pureza de las IgG obtenidas (ver apéndice IV).

La concentración de proteína en cada fracción se calcula usando la ecuación de Lambert-Beer (Harlow and Lane, 1988; Peterson, 1983):

$$\text{Concentración} = A_{280\text{nm}} \times \epsilon$$

Donde A_{280nm} representa la absorbancia de la proteína a 280 nm y ϵ representa el coeficiente de extinción de la proteína. Para los anticuerpos (IgG) la ecuación queda:

$$\text{mg de IgG/ml} = \text{Absorbancia de la muestra a 280 nm} \times 1.35$$

IV. 8. Producción de Anticuerpos Monoclonales Anticruzipaina.

Durante la segunda semana de inmunización de los ratones (ver sección III. 7), se comienzan a cultivar células de mieloma Sp2/0 en medio D-MEM suplementado con SFB al 10 % y 8-azaguanina al 2 %.

Diez días después de de la última inmunización, los sueros de los ratones se prueban por Western-blot, empleando como antígeno un extracto total de epimastigotes de *T. cruzi*. Los ratones que presentan anticuerpos anticruzipaina se reinmunizan intraperitonealmente cinco y cuatro días antes de la fusión, con 2 μg de cruzipaina. Un día antes de la fusión los cultivos de células Sp2/0 se ajustan a 5×10^5 células/ml y en la mañana del día de la fusión, estos cultivos celulares se diluyen 1/2 con medio fresco. La fusión y selección de hibridomas se llevó a cabo usando técnicas ya descritas (ver apéndice VII) (Harlow and Lane, 1988).

IV. 9. Producción de Complejos Inmunes Insolubles (CII).

Cuando se mezclan cantidades equivalentes de anticuerpos y antígenos de elevado peso molecular, como una proteína, se favorece la formación de complejos tan grandes que se vuelven insolubles. Estos complejos inmunes insolubles (CII) se depositan sobre los tejidos y provocan, al ser reconocidos por los receptores Fc en las células, la activación de éstas. Este tipo de complejos es el que se piensa se forma en los tejidos dañados durante la enfermedad de Chagas.

Por lo tanto se prepararon complejos inmunes insolubles de cruzipaina con anticuerpos anticruzipaina para probar su capacidad de estimular macrófagos.

IV. 9. 1. Complejos Inmunes Insolubles de cruzipaina (CII-crz).

Se preparan cuatro diferentes tipos de complejos inmunes insolubles de cruzipaina (CII-crz) mezclando 15 μg de cruzipaina con 100, 200, 300 ó 400 μg de IgG anticruzipaina. Cada complejo expresado en moles equivale a una relación de antígeno/anticuerpo de: 1/2, 1/4, 1/6, y 1/16 respectivamente. Cada mezcla se incuba a 37 °C durante 1 hora y después en hielo por 2 horas más (o toda la noche a 4 °C). Los CII que precipitan se separan por centrifugación a 5 000 x g durante 1 minuto y son lavados dos veces con PBS estéril centrifugando a 5 000 x g por 1 minuto entre cada lavado. Finalmente los CII-crz se resuspenden en 40 μl de PBS estéril.

IV. 9. 2. Complejos Inmunes Insolubles de albúmina (CII-alb).

Alternativamente se forman complejos inmunes insolubles de albúmina (CII-alb), mezclando 50 μg de albúmina sérica bovina, BSA (SIGMA) con 390 μg de IgG de conejo anti-BSA (SIGMA), equivalentes a una relación molar de antígeno/anticuerpo de 1/3, e incubando la mezcla a 37 °C durante 1 hora y después en hielo por 2 horas más (o toda la noche a 4 °C). La mezcla se centrifuga entonces a 5 000 x g por 1 minuto y los CII se lavan tres veces con PBS, centrifugando a 5 000 x g por 1 minuto entre cada lavado. Finalmente los CII-alb se resuspenden en 130 μl de PBS y se guardan en alícuotas a 4 °C (Sánchez-Mejorada and Rosales, 1998).

IV. 10. Cultivo de Células J-774.

Las células J-774 (macrófagos de ratón) se cultivan en medio D-MEM con 10 % de suero fetal bovino inactivado (SFB), a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa en cajas de cultivo de 75 cm² (COSTAR). Para transferir estas células, que crecen adheridas al plástico de cultivo, se retira el medio de cultivo cuando las células están confluentes, esto es cuando han cubierto la superficie de una caja de 75 cm². Las células se cubren con 5 ml de EDTA 5 mM durante 5 minutos. Posteriormente, se retira el EDTA y se agrega 1 ml de tripsina (1 mg/ml) durante dos minutos. Para ayudar a que las células se despeguen completamente se dan golpes firmes a la caja de cultivo con la palma de la mano.

IV. 11. Cultivo y Diferenciación de Células THP-1.

Para llevar a cabo el estudio de activación de macrófagos también se emplean células THP-1 (leucemia aguda monocítica humana, ATCC # TIB-202). Las células THP-1 se cultivaron en medio RPMI con 10 % de suero fetal bovino (SFB), a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa. La diferenciación de los monocitos THP-1 a macrófagos se induce, incubando 1X10⁶ células por 1 ml de medio RPMI con 10 % de SFB y con ácido retinóico 1 μM durante 48 ó 72 horas. Las células diferenciadas de esta manera son usadas únicamente para los ensayos de reducción de NBT.

Para los estudios de secreción de TNF, IL-1 e IL-6, las células THP-1 tratadas con ácido retinoico durante 48 horas, se cambian a RPMI al 5 % de SFB y se ajustan las células a 1 X 10⁶ células / ml. Posteriormente se agregan a las células 500 U/ml de interferón gama recombinante humano, rhINF-γ (GELBE). Después se colocan en las placas de 24 pozos, donde se lleva a cabo la estimulación. El cultivo se continúa en estas condiciones durante 24 horas más.

IV. 12. Cuantificación de la Activación de Estallido Respiratorio (Reducción de NBT)

Las células J-774 ó THP-1 diferenciadas se centrifugan a 400 x g durante 5 minutos, se lavan 2 veces con PBS y se resuspenden a 1.2×10^6 células/ml en solución salina balanceada de Hanks con albúmina al 1 % (HBSS). 100 μ l de esta suspensión (120,000 células) se añaden a cada pozo de una placa de 96 pozos. A cada pozo se agregan 20 μ l de una disolución acuosa de NBT (10 mg/ml) y enseguida se agregan las sustancias estimuladoras.

Para estandarizar la técnica de reducción de NBT, solo se agregaron 10 μ M de forbol miristato acetato (PMA) (control positivo). Una vez estandarizada la técnica se agregan además los siguientes estímulos: complejos inmunes insolubles de cruzipaina (CII-crz), IgG (anticruzipaina), cruzipaina pura y complejos inmunes insolubles de albúmina (CII-alb). En seguida se completa el volumen de cada pozo a 200 μ l con HBSS. Las placas se incuban durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Al finalizar el tiempo de incubación, se obtiene el índice de activación celular cuantificando el NBT reducido (de color azul) en las células. Esto se hace en un lector de placas para ELISA, leyendo la absorbancia a 550 nm. Alternativamente, el grado de reducción del NBT se puede estimar contando al microscopio las células activadas (citoplasma azul). Para esto se cuentan mínimo 100 células por campo, en tres campos diferentes por cada pozo, con un microscopio invertido (ZEISS) usando el objetivo de 40X.

IV. 13. Determinación de la Secreción de Factor de Necrosis Tumoral.

Para determinar la secreción de TNF se usa un ensayo de actividad citotóxica del TNF sobre fibroblastos.

Estimulación. Las células THP-1 diferenciadas (1×10^6) se colocan en cada pozo de una placa de 24 pozos en un volumen de 1 ml. Las células se incuban con las siguientes sustancias estimuladoras: lipopolisacarido $1 \mu\text{M}$ (LPS) (serotipo 055:B5, SIGMA), complejos inmunes insolubles de cruzipaina (CII-crz), IgG (anti-cruzipaina), cruzipaina pura y complejos inmunes insolubles de albúmina (CII-alb); durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO_2 y 95 % de humedad. Al final de esta incubación las placas se centrifugan a $400 \times g$ durante 5 minutos y los sobrenadantes se colectan para probar en ellos la presencia de TNF. En caso de no ser usados de inmediato, los sobrenadantes se congelan a -70°C .

Detección de TNF. Fibroblastos de ratón (células L929) se resuspenden a 4×10^5 células/ml en medio D-MEM suplementado con 5 % de SFB. De esta suspensión se agregan $100 \mu\text{l}$ a cada pozo de una placa de 96 pozos y las placas se incuban toda la noche a 37°C , en una atmósfera de 5 % CO_2 y 95 % de humedad relativa. Posteriormente se elimina todo el medio de cultivo y se añaden $50 \mu\text{l}$ de medio D-MEM suplementado con 5 % de SFB a cada pozo. Al primer pozo de cada hilera de la placa (controles negativos) se le agregan otros $50 \mu\text{l}$ de medio fresco. Al segundo pozo de cada hilera (columna 2) se le agregan $50 \mu\text{l}$ de los sobrenadantes provenientes de las células THP-1 estimuladas. Partiendo del segundo pozo se hacen diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ de los sobrenadantes, transfiriendo $50 \mu\text{l}$ del contenido del pozo 2 al pozo 3, mezclando y transfiriendo $50 \mu\text{l}$ al pozo 4. Se continúa sucesivamente hasta el pozo 12. Enseguida se agregan $50 \mu\text{l}$ de actinomicina D ($1 \mu\text{g/ml}$) a cada pozo. Las placas se incuban a continuación durante 18 horas a 37°C en una atmósfera de 5 % CO_2 y 95 % de humedad relativa. Al final de esta incubación se elimina todo el medio y las células L929 se lavan una vez con PBS. Las células se tiñen, agregando a cada pozo $50 \mu\text{l}$ de cristal violeta al 0.05 % disuelto en etanol al 20 % en agua,

durante 10 minutos a temperatura ambiente. El colorante se retira agregando 200 μ l de agua fría y después sacudiendo la placa al aire para quitar el exceso de líquido. Las placas se colocan boca abajo sobre papel absorbente y se dejan secando toda la noche. Para eluir el cristal violeta de las células, se agregan 100 μ l de metanol al 100 % a cada pozo. Finalmente las placas se leen inmediatamente a 595 nm.

La columna 1 donde las células no reciben TNF debe exhibir el máximo de incorporación de cristal violeta. Para obtener la concentración de TNF en las muestras, la cantidad de TNF de la máxima dilución del TNF estándar que todavía da lisis celular, se multiplica por el recíproco de la dilución de la muestra donde todavía da lisis celular.

IV. 13. 1 Cultivo de Fibroblastos L929.

Las células L929 (fibroblastos de ratón) se cultivan en medio D-MEM con 5 % SFB (ver apéndice I), en cajas de cultivo de 75 cm² (COSTAR). Para transferir estas células, que crecen adheridas al plástico de cultivo, se retira el medio de cultivo cuando las células están confluentes, esto es cuando han cubierto la superficie de una caja de 75 cm². Las células se cubren con 5 ml de EDTA 5 mM durante 5 minutos y posteriormente, después de retirar el EDTA, con 1 ml de tripsina (1 mg/ml) durante dos minutos. Para ayudar a que las células se despeguen completamente se dan golpes firmes a la caja de cultivo con la palma de la mano. Se agregan a continuación 25 ml de medio D-MEM con 5 % SFB. La suspensión celular se transfiere a un tubo de 50 ml y se centrifuga a 400 x g durante 5 minutos. Finalmente las células se resuspenden en el volumen necesario de medio D-MEM con 5 % SFB para tener una concentración de 4 X 10⁵ células/ml.

IV. 14. Cuantificación de Interleucina 1 e Interleucina 6.

Para hacer la cuantificación de interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) humanas, se toman los sobrenadantes de las células THP-1 estimuladas y se prueban en kits comerciales (ENDOGENE) para medir estas citocinas por ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

IV. 15. Análisis Estadístico.

Para comparar el efecto entre dos estímulos, los datos se analizaron usando la prueba de T de Student pareada. Para comparar el efecto de más de dos estímulos se utilizó la prueba de análisis de varianza. Las diferencias entre estímulos se consideraron significativas a valores de $p < 0.01$). Todos los cálculos se hicieron con el programa de computadora StatWorks, para Macintosh, versión 1.1 (Cricket Software, Inc.).

V. RESULTADOS.

En este trabajo se trata de explicar el mecanismo que genera el daño inflamatorio en el corazón, observado en personas y animales crónicamente infectados con *T. cruzi*. La hipótesis de este trabajo se basa en la evidencia que existe sobre la persistencia de antígenos de *T. cruzi*, en el tejido de corazón de mamíferos en fase crónica de la infección, entre los cuales destaca la cruzipaina. Se sabe que muchos de estos antígenos generan una fuerte respuesta inmune humoral, por lo cual estos antígenos podrían formar complejos inmunes con sus anticuerpos en los propios sitios donde se desarrolla la inflamación. El miocardio en esta fase, presenta un grave daño de tipo inflamatorio (Higuchi et al., 1997; Zhang and Tarleton, 1999). Debido a que en los órganos inflamados en la fase crónica de la infección por *T. cruzi*, existe un gran infiltrado celular, entre los que destacan macrófagos y linfocitos (Ravelli et al., 1998; Sunnemark et al., 1998), se propone que los complejos inmunes, se depositan en los tejidos favoreciendo ahí un estado inflamatorio crónico, el cual exacerba el desarrollo del daño tisular. Para probar esta idea se llevó a cabo este estudio de activación de macrófagos con complejos inmunes insolubles de cruzipaina (CII-crz). Como primer paso fue necesario purificar la cruzipaina y preparar anticuerpos anticruzipaina. Con estos reactivos entonces se prepararon los CII-crz que se usaron para activar a macrófagos.

V. 1. Purificación de Cruzipaina.

A partir de epimastigotes de *T. cruzi* se realizó la purificación de la enzima cruzipaina siguiendo el protocolo mostrado en el apéndice II. A cada paso de la purificación se tomaron muestras para determinar la concentración de proteína total y el grado de pureza de la cruzipaina.

La tabla I muestra la cantidad de proteína obtenida en cada paso de la purificación y el porcentaje que esto representa del material inicial. A partir de 120 mg de lisado inicial de epimastigotes se obtuvieron 1.75 mg de cruzipaina pura. Esto representa el 1.5 % de la proteína total inicial.

V. 1. 1. Pureza de la Cruzipaina.

Para probar la pureza e identidad de la cruzipaina obtenida durante la purificación, se utilizaron varios criterios: aparición de una sola banda en geles de acrilamida, con tinción de Coomassie; actividad enzimática de proteasa; especificidad de esta actividad al tipo de proteasa de cisteína; y reacción positiva en Western blots con anticuerpos específicos contra cruzipaina.

TABLA I. Cantidad de proteína total durante la purificación de cruzipaina.

FRACCION ^a	CANTIDAD TOTAL DE PROTEINA	PORCENTAJE DEL TOTAL (%)
Extracto total	120. mg	100
Extracto libre de células	85.86 mg	72
SUPA1	67.2 mg	56
PA2	12.2 mg	10
SU-SAS-60	43.7 mg	36
SUPA2	12.89 mg	10
SAS-60	2.11 mg	1.7
crz	1.75 mg	1.5
SU-R	26.7 µg	0.002

^a Las claves corresponden a las fracciones indicada en el diagrama de flujo de la purificación de cruzipaina (apéndice II).

La proteína purificada (fracción crz; ver apéndice II), se encontraba muy diluida y no podía ser detectada en geles de acrilamida por tinción de Coomasie. Para poder detectar la enzima purificada en geles de acrilamida, una alícuota de la disolución que contenía la enzima pura fue liofilizada. Al final se resuspendió en una disolución de PBS-EDTA y una muestra se corrió en un gel de electroforesis. El gel se tiñó con azul de Coomasie y se observó una sola banda de aproximadamente en 45 kDa (figura 3). Esta banda tiene el peso molecular reportado para la cruzipaína.

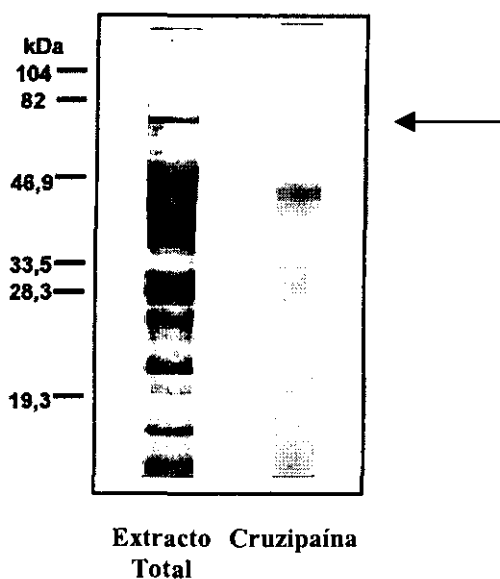


FIGURA 3. Tinción de Coomasie de la cruzipaína purificada. El extracto inicial de epimastigotes de *T. cruzi* y aproximadamente 1.0 μ g de proteína de cruzipaína purificada se corrieron en un gel de acrilamida al 12% y se tiñeron con azul de Coomasie. La flecha indica la banda de cruzipaína con un peso molecular aproximado de 45 kDa. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda.

Para verificar que la proteína purificada era una proteasa se realizaron ensayos de actividad proteolítica en geles de acrilamida copolimerizados con gelatina. La proteína purificada efectivamente tiene actividad de proteasa ya que fue capaz de digerir a la gelatina de los geles,

dando como resultado una banda clara en la zona de 45 kDa (figura 4). Además para confirmar que esta enzima era una proteasa de cisteína, se llevó a cabo un ensayo de inhibición de la actividad proteolítica con una batería de inhibidores específicos de proteasas. Los inhibidores PMSF y E-64 inhibieron completamente la actividad proteolítica de la banda de aproximadamente 45 kDa (figura 4). Salvo el TLCK, que inhibe de manera parcial a la enzima, ninguno de los demás inhibidores de proteasas tuvo ningún efecto sobre la enzima purificada (figura 4). Estos resultados indican que la banda observada en la figura 3 corresponde a una proteasa de cisteína, del mismo tipo que la cruzipaina.

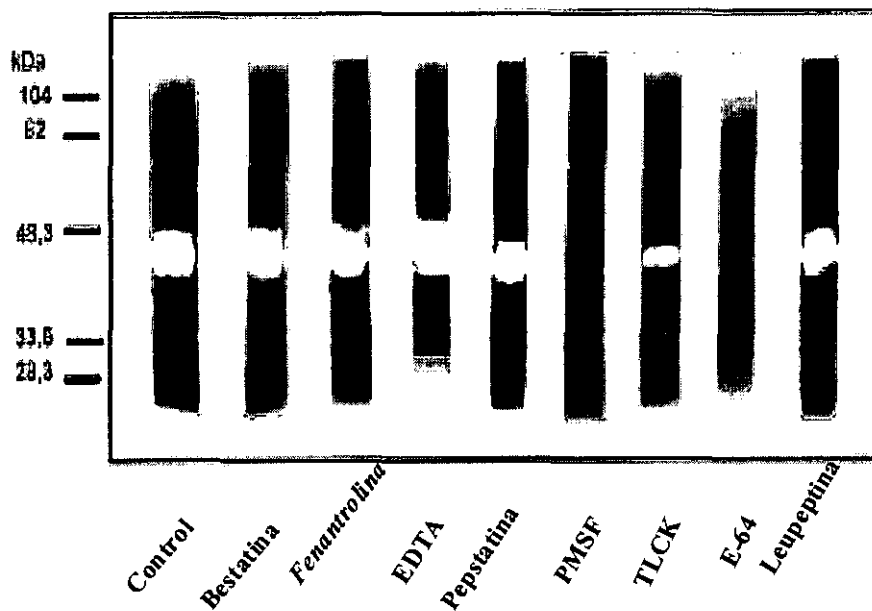


FIGURA 4. Caracterización de la actividad proteolítica la cruzipaina purificada. 0.5 μ g de enzima purificada se corrieron en cada carril de en un gel de acrilamida copolimerizado con gelatina. El gel se incubó en la disolución de tritón durante 1 hora y se cortó en tiras, las cuales se incubaron por separado durante toda la noche a 37°C, en amortiguador de acetatos-DTT 1 mM conteniendo el inhibidor de proteasa correspondiente. Finalmente cada tira se tiñó con negro amido. Las bandas claras en el fondo oscuro representan la actividad proteolítica. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda.

El grado de inhibición generado por cada uno de los inhibidores fue cuantificado midiendo la intensidad de las bandas de actividad proteolítica en los geles de acrilamida con gelatina con ayuda del programa RALF-Scanalytics para Windows. Solamente PMSF y E-64 inhibieron completamente la actividad de la banda de actividad proteolítica (aproximadamente 45 kDa) (tabla II). Salvo el TLCK, que inhibe de manera parcial la enzima, ninguno de los demás inhibidores de proteasas tuvo algún efecto sobre la enzima purificada, lo cual indica que la banda observada en la figura 3 corresponde a una proteasa de cisteína, del mismo tipo que la cruzipaina.

TABLA II. Cuantificación de la inhibición de la actividad proteolítica.

INHIBIDOR	ESPECIFICIDAD	DENSIDAD DE BANDA*	INHIBICIÓN (%)
—	—	449.667	—
E-64	Cistein-Proteasas	0	100
PMSF	Serin-proteasas (capaz de interaccionar también con proteasas de cisteína)	0	100
TLCK	Serin-Proteasas	430.396	5
Bestatina	Metaloproteasas	487.375	0
EDTA	Metaloproteasas	469.271	0
Fenantrolina	Metaloproteasas	458.75	0
Pepstatina	Proteasas de ácido aspártico	445.125	0
Leupeptina	Serin/Cistein-Proteasas	501.104	0

* Los valores son unidades relativas de densidad calculadas con el programa RALF-Scanalytics para Windows

Para confirmar la identidad de la enzima purificada se realizaron Western blots con anticuerpos específicos para la cruzipaina. Utilizando un suero de conejo anticruzipaina (producido en el laboratorio del Dr. Juan José Cazzulo, Fundación Campomar, Facultad de

Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Bs.As., Argentina), se detectó una sola banda inmunoreactiva tanto en el extracto total de *T. cruzi* como en la proteína purificada (figura 5). Este resultado confirmó que la proteína purificada efectivamente es la enzima cruzipáina.

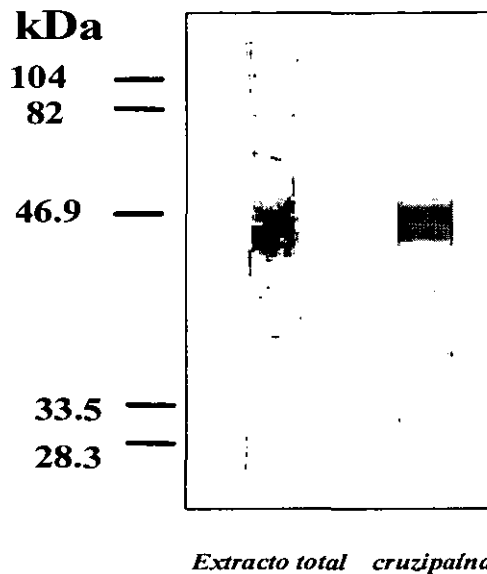


FIGURA 5. Detección de cruzipáina por Western-blot. Las proteínas del extracto total de *T. cruzi* y la enzima purificada se corrieron en un gel de electroforesis al 12 % de acrilamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se hizo entonces un Western blot con el suero policlonal de conejo anticruzipáina diluido 1/1000 (como primer anticuerpo). Como segundo anticuerpo se usó un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa diluido 1/2000. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda.

Se sabe que la cruzipáina representa uno de los antígenos inmunodominantes en la respuesta inmunológica humana contra *T. cruzi*. Por ello como prueba adicional de caracterización de cruzipáina, se probó el reconocimiento de la cruzipáina purificada por sueros de individuos

infectados con *T. cruzi* (en fase crónica asintomática y sintomática), provenientes del Estado de Morelos, México y de Brasil. Para ello se corrieron 6 µg de enzima purificada en un gel preparativo de acrilamida al 12 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se cortó en tiras para probar si los sueros de pacientes reconocían a la cruzipaína. Todos los sueros de los individuos Brasileños en fase crónica asintomática de la infección reconocieron a la cruzipaína (figura 6a), en tanto que los sueros de los individuos Mexicanos en la misma fase de la infección no la reconocieron (figura 6a). Por otro lado, el 80 % de los sueros de los individuos en fase crónica sintomática, tanto Brasileños como Mexicanos, reconocieron la cruzipaína (figura 6b). Cabe destacar que el reconocimiento de la cruzipaína por los sueros de los Mexicanos es más débil que el de los sueros de los Brasileños. A través de esta prueba no sólo se reconfirmó la identidad de cruzipaína para la enzima purificada, sino que además se encontró un reconocimiento diferente de esta enzima por los anticuerpos presentes en los sueros de individuos infectados con *T. cruzi*, dependiendo del origen geográfico y de la sintomatología de estos individuos.

V. 2. Producción de Anticuerpos Anticruzipaína.

Para poder producir los complejos inmunes cruzipaína/anticuerpos anticruzipaína se requería, además de la enzima purificada, de anticuerpos anticruzipaína. Para obtener estos anticuerpos se inmunizaron ratones y cobayos con la cruzipaína purificada. Diez días después de la última inyección (ver sección III. 7.), se obtuvo un poco de suero de cada animal y se verificó la presencia de anticuerpos anticruzipaína por Western-blot, usando como antígeno extracto total de *T. cruzi* cepa QRO, (200 µg por membrana). Los animales de ambas especies generaron eficientemente anticuerpos anticruzipaína (figura 7).

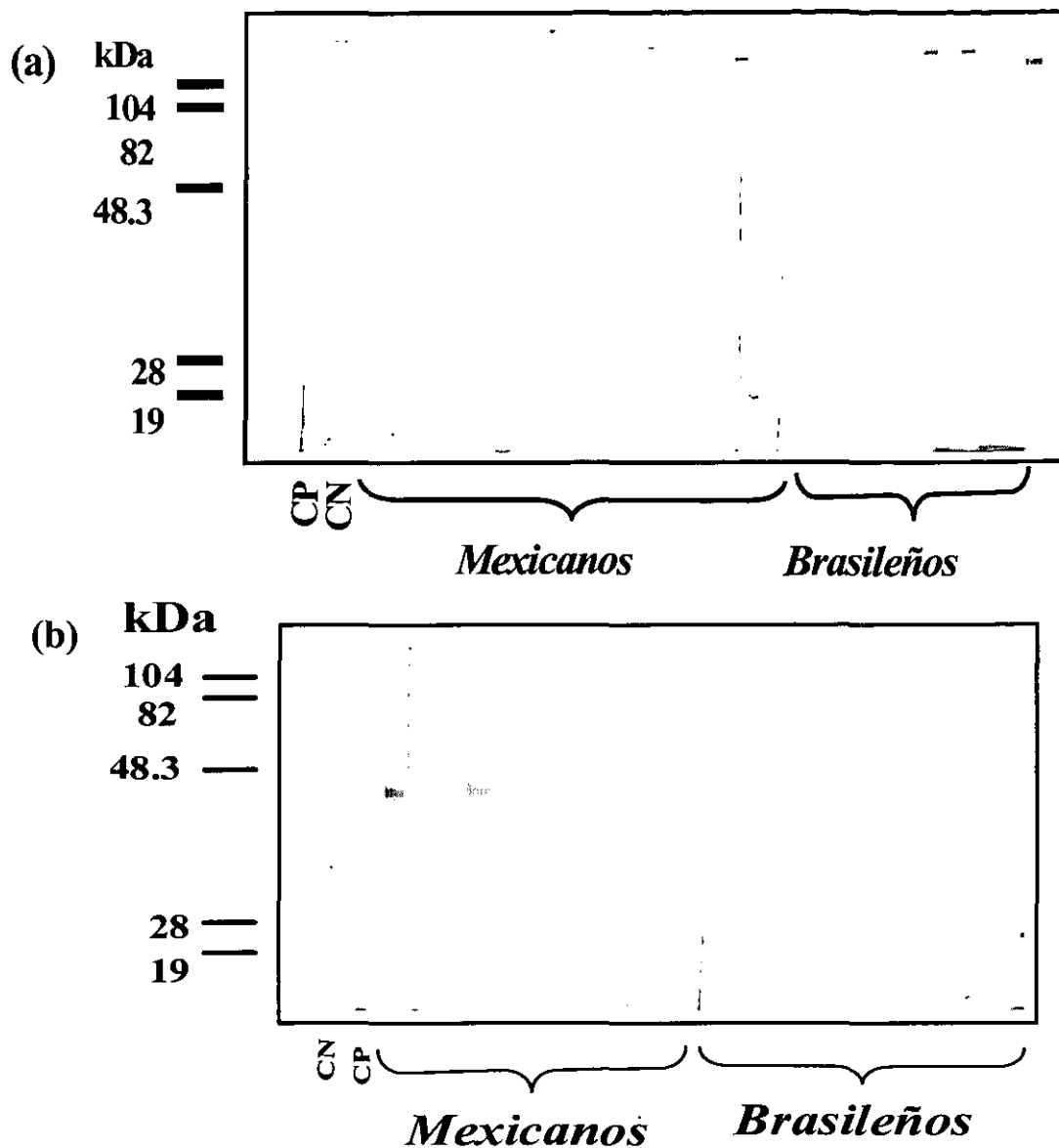
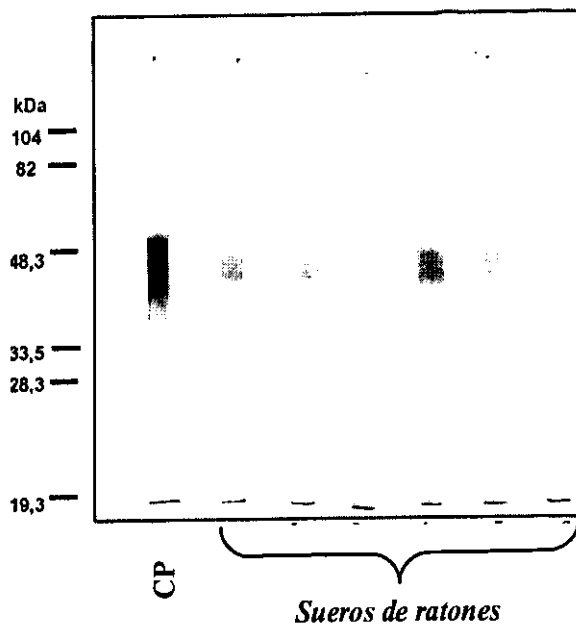


FIGURA 6. Detección de cruzipaina por anticuerpos anticruzipaina de sueros de individuos infectados con *T. cruzi*, provenientes México y de Brasil. Seis μg de cruzipaina pura se corrieron en un gel preparativo de acrilamida al 12 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se corto en tiras para probar por Western blot los sueros de individuos en fase crónica asintomática (a) diluidos 1/500 y los sueros de individuos en la fase sintomática (b) diluidos 1/1000. CP, representa el control positivo, que es suero de conejo anticruzipaina. CN, representa el control negativo, que es suero humano de una persona no infectada con *T. cruzi*. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda.

(a)



(b)

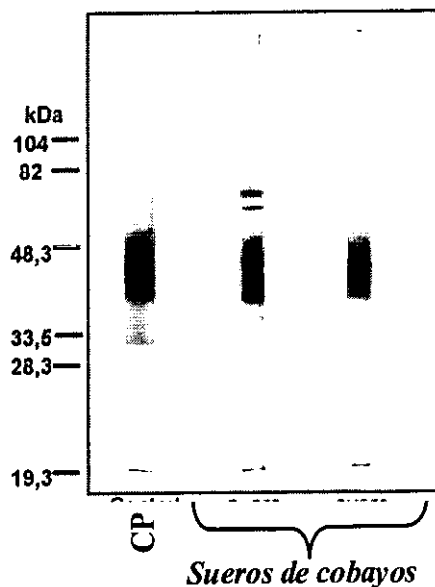


FIGURA 7. Detección de anticuerpos anticruzipaína por Western-blot. Sueros inmunes anticruzipaína de cobayos (a) diluidos 1/40 y de ratones (b) diluidos 1/10, se probaron en un Western blot contra un extracto total de *T. cruzi* cepa QRO, (200 µg de proteína/gel preparativo). El control positivo es suero de conejo anticruzipaína. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda.

Para poder formar los complejos inmunes de cruzipaína/anticuerpo anticruzipaína en cantidades suficientes para los experimentos de estimulación de macrófagos, se necesita mucho anticuerpo. Debido a que la cantidad de suero que se obtiene de cada ratón es muy pequeña, se decidió utilizar a los ratones inmunizados con cruzipaína para producir anticuerpos monoclonales anticruzipaína. Se llevaron a cabo tres fusiones para la obtención de hibridomas productores de anticuerpos anticruzipaína. En los tres casos se obtuvieron hibridomas productores de anticuerpos anticruzipaína. Sin embargo durante la selección de estos hibridomas, las clonas productoras de anticuerpos anticruzipaína se revirtieron y dejaron de producir dichos anticuerpos. Por lo cual se abandonó la producción de anticuerpos monoclonales anticruzipaína.

La otra posibilidad para obtener suficientes anticuerpos anticruzipaína y poder producir los complejos inmunes, fue usar los sueros anticruzipaína de los cobayos inmunizados con cruzipaína, ya que por cada cobayo se obtienen 5 ml de suero aproximadamente. Antes de formar los complejos inmunes, las inmunoglobulinas IgG se purificaron a partir de los sueros de los cobayos inmunizados. Esto es importante debido a que la cruzipaína puede formar complejos con $\alpha 2$ -macroglobulina (Morrot et al., 1997). Para asegurar entonces que los complejos formados sólo serían de tipo antígeno/anticuerpo y no cruzipaína/ $\alpha 2$ -macroglobulina, se utilizaron solamente las IgG purificadas.

La purificación de IgG anticruzipaína se realizó por cromatografía de afinidad usando proteína A acoplada a sefarosa (figura 8). Cada una de las fracciones de elución obtenidas de esta purificación fueron probadas por Western-blot para verificar que las IgG purificadas reconocían a la cruzipaína (figura 9). Todas las IgGs de cada una de las fracciones de elución, reconocen solamente una proteína con un peso molecular aproximado de 45 kDa en el extracto total de *T. cruzi* (figura 9). La reactividad con una proteína de este peso molecular prueba el reconocimiento

de la cruzipaina. Todas las fracciones eluidas de la columna de proteína A que fueron positivas para el reconocimiento de la cruzipaina se reunieron en una sola preparación.

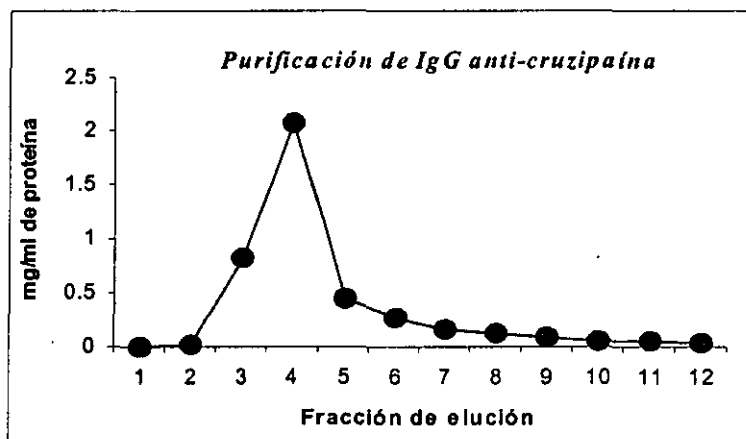


FIGURA 8. Purificación de IgG anticruzipaina. El suero de cobayo anticruzipaina se incubó en una columna de proteína A acoplada a sefarosa durante toda la noche a 4 °C. La elución de la columna se hizo con glicina 0.2 M, pH 2.8 y las fracciones se neutralizaron con Tris 1 M, pH 8.0. La cuantificación de proteína total se hizo midiendo la absorbancia de cada fracción a 280 nm como se describe en la metodología (ver sección III. 7.).

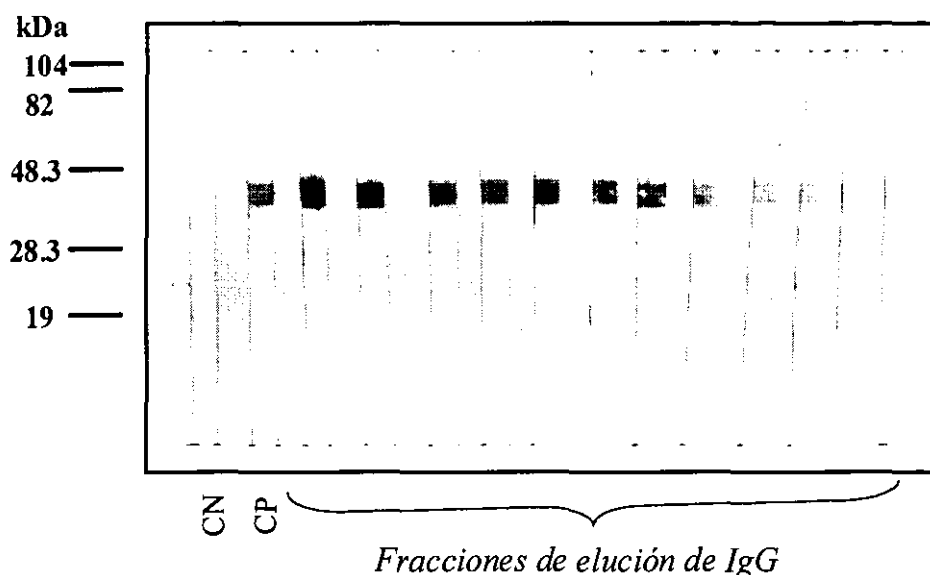


FIGURA 9. Reconocimiento de cruzipaina por IgG anticruzipaina. Se hizo un western-blot probando cada una de las fracciones de elución de la purificación de IgG anticruzipaina de los sueros de los cobayos inmunizados con cruzipaina. Como antígeno se usó extracto total de *T. cruzi* (QRO). CP, control positivo, que es un suero de cobayo anticruzipaina. CN, control negativo, que es un suero de cobayo preinmune. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda

V. 3. Formación de Complejos Inmunes Insolubles de Cruzipaina.

Debido a que las IgG anticruzipaina purificadas del suero de cobayo, son una mezcla policlonal de anticuerpos anticruzipaina, estas IgG poseen la capacidad de reconocer a diferentes epitopes de la cruzipaina. El reconocimiento de estos anticuerpos policlonales por su antígeno, da lugar a la formación de complejos inmunes de muy elevado peso molecular. Los complejos inmunes de elevado peso molecular son insolubles, por lo cual al ser formados, pueden ser purificados por un método simple de centrifugación

Los complejos inmunes insolubles de cruzipaina (CII-crz) se formaron mezclando la cruzipaina pura con las IgG de cobayo purificadas, como se describe en la metodología (ver sección III. 9.). Para comprobar la formación de los CII-crz, se corrió una muestra de estos complejos en un gel de acrilamida al 12 % y se hizo un Western-blot. El western-blot se hizo por duplicado, para detectar tanto la presencia de las IgG anti cruzipaina, como la de cruzipaina. En el Western blot para la detección de las IgG de cobayo anti cruzipaina, se observaron dos bandas, que corresponden a la cadena pesada (50 kDa) y a la cadena ligera (25 kDa) de las IgGs anticruzipaina (figura 10a). En tanto que en el Western blot para la detección de la cruzipaina se observó una banda de 45 kDa (figura 10b). También se verificó si la cruzipaina continuaba activa cuando se formaban los complejos inmunes, para lo cual se hizo un ensayo de actividad proteolítica con los CII-crz. La cruzipaina aún conserva su actividad de proteasa después de formar los CII-crz (figura 10c).

V. 4. Activación de Estallido Respiratorio en Células J-774

Para estandarizar la técnica de reducción de NBT como medida directa de la activación de estallido respiratorio en macrófagos, primero se eligió una línea de macrófagos murinos, J-774. Se comenzó probando un estímulo positivo para la activación del estallido respiratorio, forbol miristato acetato (PMA), para estandarizar las condiciones de activación de estallido respiratorio en las células J-774. Los niveles de activación del estallido respiratorio a 2 y 4 horas de estimulación, en esta línea celular eran los mismos en las células estimuladas y en las células sin

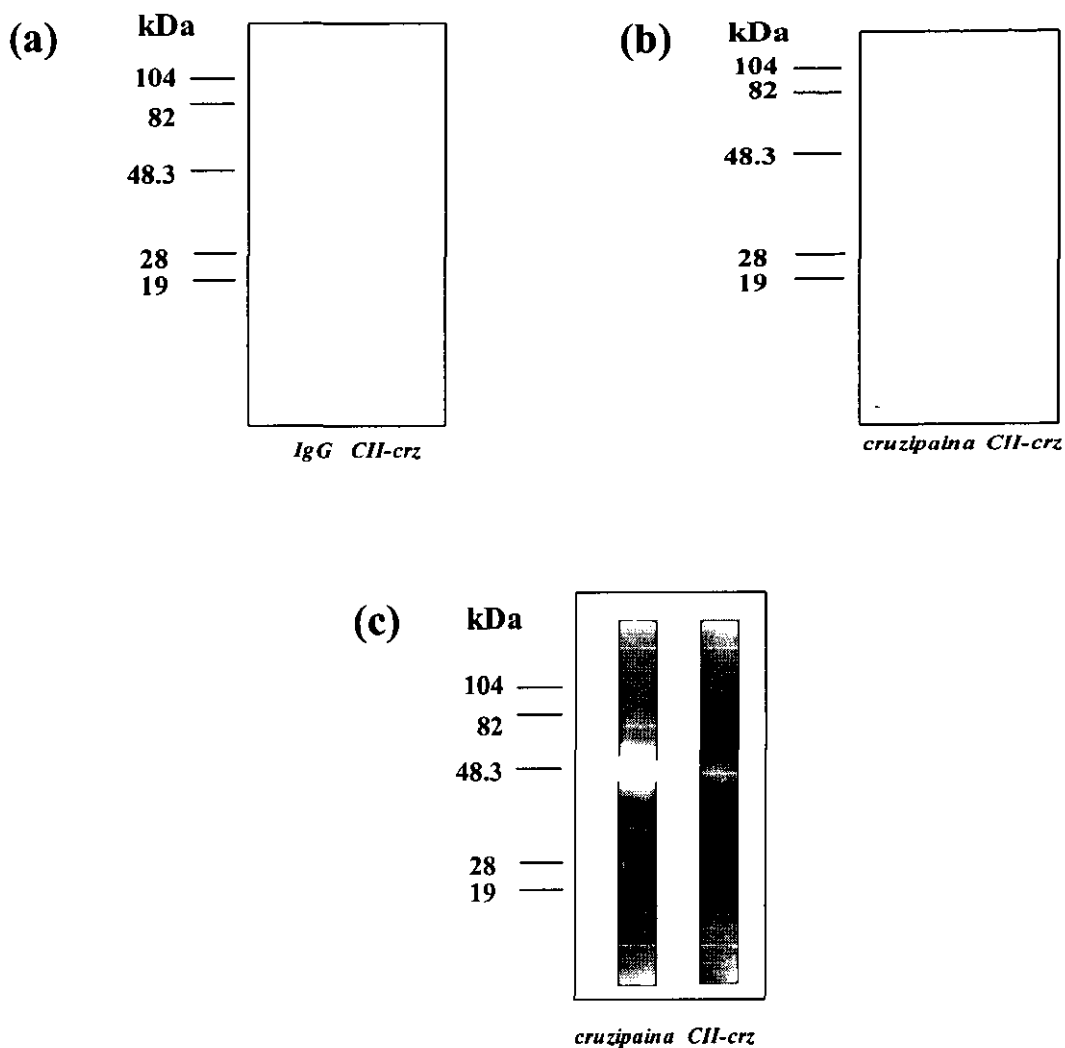


FIGURA 10. Comprobación de la formación de CII-crz. Se corrieron 10 μ l de CII-crz por carril en un gel de acrilamida al 12 % y se hizo una transferencia a una membrana de nitrocelulosa. En (a) se muestra el reconocimiento de las IgG anticruzipaína en los CII-crz, usando un anticuerpo anti-IgG de cobayo acoplado a peroxidasa (diluido 1/2000). En (b) se muestra el reconocimiento de la cruzipaina en los CII-crz, usando el suero de conejo anticruzipaína (diluido 1/1000) y un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (diluido 1/2000). En (c) se muestra la actividad proteolítica de la cruzipaina en los CII-crz (10 μ l por carril) en un gel de acrilamida copolimerizado con gelatina. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda de cada panel.

estimular (figura 11). A tiempos más cortos de 2 horas o más largos de 4 horas se observó lo mismo. Este ensayo fue repetido al menos 4 veces y nunca se detectaron diferencias en los niveles de activación del estallido respiratorio entre las células estimuladas y las no estimuladas. Por lo tanto, se decidió cambiar de línea celular, para continuar con el estudio de activación de macrófagos.

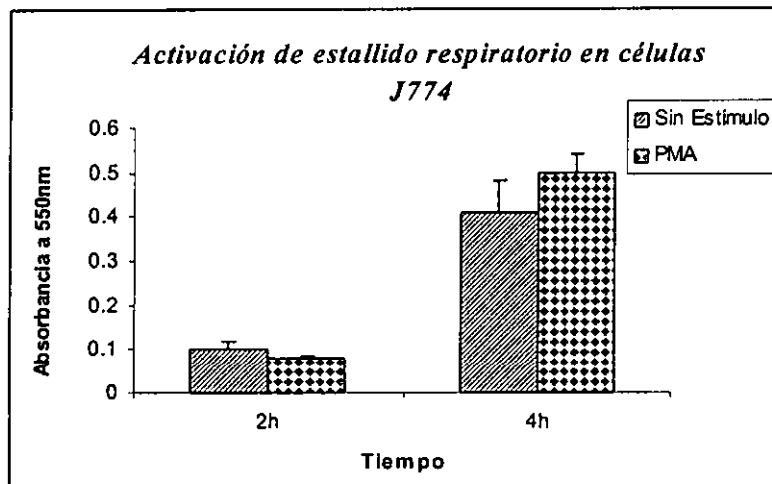


FIGURA 11. Activación de estallido respiratorio en células J-774. Se llevó a cabo el ensayo de reducción de NBT para medir activación de estallido respiratorio a las 2 y 4 h de estimulación. El ensayo se hizo en placas de 96 pozos, usando 120,000 células J-774 por pozo. Como control positivo de la activación de estallido respiratorio se usó 10 μ M de PMA por pozo. El índice de activación de estallido respiratorio a 550 nm para cuantificar la cantidad de NBT reducido.

V. 5. Activación de Estallido Respiratorio en Células THP-1.

Debido a que los macrófagos y los monocitos poseen funciones celulares similares, la línea celular que se eligió para cuantificar la activación de estallido respiratorio por los complejos inmunes de cruzipaína (CII-crz) fue la THP-1. Ésta es una línea celular humana de monocitos. La activación por CII-crz del estallido respiratorio en las células THP-1 se midió con el ensayo de reducción de NBT. La activación del estallido respiratorio aumentó ligeramente en el lapso de 24 horas que duró el experimento. Este pequeño aumento no representa una diferencia significativa con los niveles iniciales del estallido respiratorio (figura 12). Al estimular las células con con esteres de forbol (PMA), se provocó una pequeña activación del estallido respiratorio a tiempos iniciales (2-7 horas). Sin embargo este pequeño incremento no es significativo entre las células tratadas con PMA y las células no estimuladas (figura 12).

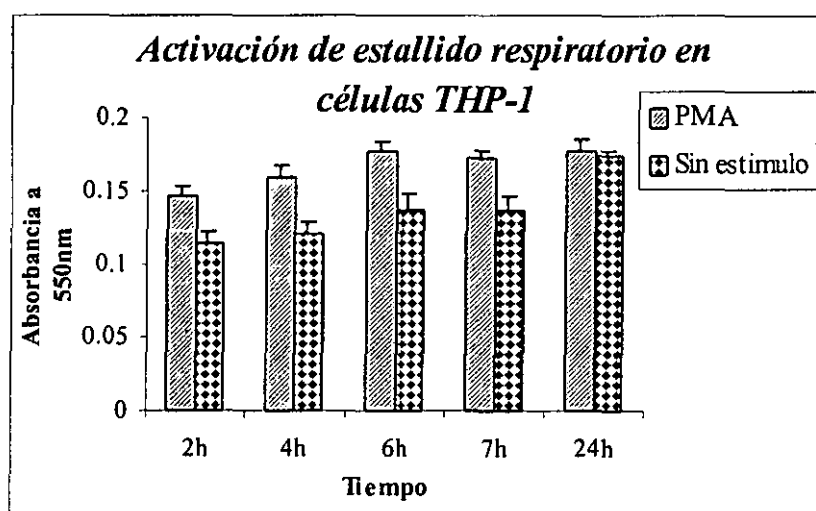


FIGURA 12. Cinética de activación de estallido respiratorio en células THP-1. 120,000 células THP-1 se estimularon con 10 μ M de PMA durante diferentes tiempos a 37 °C. El índice de activación de estallido respiratorio celular se determinó por el ensayo de reducción de NBT, como se describe en la metodología (ver sección III. 12.).

Las células THP-1 son una línea celular monocítica y este tipo de células no tienen exactamente las mismas funciones que los macrófagos. Los monocitos son los precursores de los macrófagos. En la circulación sanguínea los monocitos son relativamente inactivos, mientras que los macrófagos, en los tejidos, son células primordialmente fagocíticas que liberan muchas sustancias antimicrobianas y proinflamatorias. Era probable entonces que los niveles de activación del estallido respiratorio de los monocitos fueran más bajos que los de los macrófagos porque los monocitos no son tan eficientes como los macrófagos para destruir microorganismos. Por lo tanto se decidió diferenciar los monocitos a macrófagos, a través de un tratamiento con ácido retinóico durante 72 horas para ver si presentaban un estallido respiratorio mayor que el de los monocitos. En la figura 13 se muestran los niveles de activación de estallido respiratorio en células THP-1 diferenciadas con ácido retinóico durante 72 horas y estimuladas durante 4 horas con PMA. Cuando las células no estaban diferenciadas no se observaron diferencias entre los niveles de estallido respiratorio de las células estimuladas con PMA y las células no estimuladas (figura 13). Sin embargo, las células diferenciadas mostraron al ser estimuladas con PMA niveles de activación del estallido respiratorio dos veces superiores a los de células no estimuladas (figura 13).

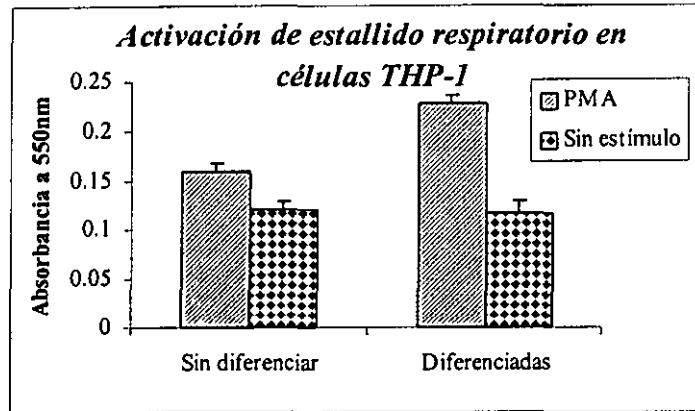


FIGURA 13. Activación de estallido respiratorio en células THP-1 diferenciadas a macrófagos. Células THP-1 sin diferenciar o diferenciadas a macrófagos por tratamiento con ácido retinoico durante 72 horas, se estimularon con 10 μ M PMA durante 4 horas a 37 °C. Los niveles del estallido respiratorio se midieron por reducción de NBT como se describe en la metodología (sección III. 12.).

Debido a que 72 horas de diferenciación es un tiempo largo para mantener a las células en cultivo sin cambiarles el medio, se probó si empleando tiempos menores de diferenciación con ácido retinóico, también se obtenían células diferenciadas que respondieran con niveles de activación de estallido respiratorio comparables a los de las células diferenciadas por 72 horas. Células THP-1 tratadas con ácido retinóico durante 48 ó 72 horas fueron estimuladas con PMA durante 4 horas a 37°C y su respuesta de estallido respiratorio detectada por el ensayo de reducción de NBT. Los niveles de activación de estallido respiratorio en respuesta a PMA fueron mayores en las células que se diferencian con ácido retinóico solamente durante 48 horas (figura 14a).

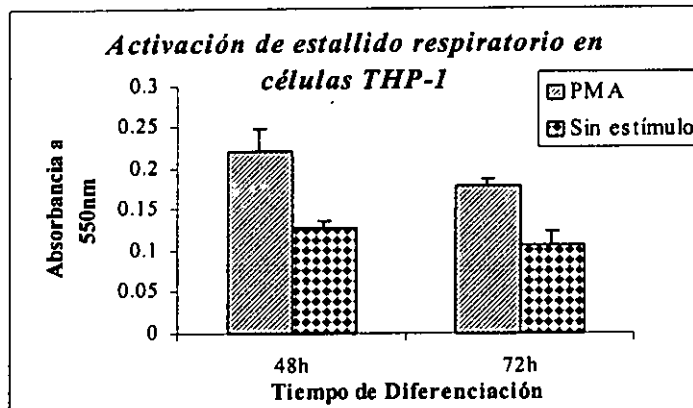
Esta respuesta a PMA, aunque muy clara, era solamente el doble del nivel de activación basal (células no estimuladas). Sin embargo, al examinar las células al microscopio prácticamente no

se observaban células activadas con estallido respiratorio (citoplasma azul) en ausencia de estímulo. Entre las células tratadas con PMA se observaban muchas células activadas con estallido respiratorio (citoplasma azul). Estas diferencias no se reflejaba en las lecturas de activación celular hechas espectrofotométricamente a 550 nm. Por este motivo se decidió obtener el índice de activación del estallido respiratorio directamente contando las células al microscopio. Esta cuantificación fue llevada a cabo en las mismas placas leídas a 550 nm. Al obtener el índice de activación de estallido respiratorio leyendo al microscopio se encontró que las células tratadas con PMA aumentan esta respuesta aproximadamente 10 veces (figura 14b). El nivel de activación fue igual tanto para las células diferenciadas durante 48 horas como para las diferenciadas durante 72 horas. Además aquí se observó que los niveles basales de activación de estallido respiratorio en las células THP-1 diferenciadas, eran prácticamente de cero. Por lo cual, para los experimentos siguientes, se decidió obtener el índice de activación de estallido respiratorio cuantificando las células microscópicamente y usando células THP-1 diferenciadas sólo durante 48 horas.

V. 6. Activación de Células THP-1 con Complejos Inmunes Insolubles de Cruzipaina (CII-crz)

Una vez obtenidas las mejores condiciones para el estudio de activación del estallido respiratorio en macrófagos, se decidió probar la estimulación celular usando los complejos inmunes de cruzipaina.

(a)



(b)

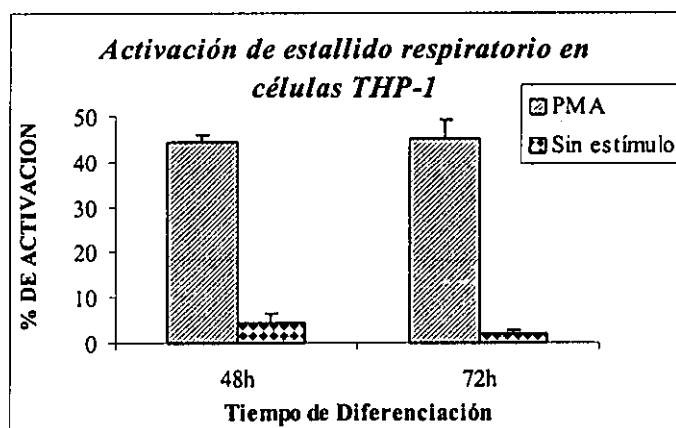


FIGURA 14. Activación de estallido respiratorio en células THP-1 diferenciadas a macrófagos. Las células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos con ácido retinoico durante 48 ó 72 horas. Posteriormente, las células se dejaron sin estímulo o se estimularon con 10 μ M de PMA durante 4 horas a 37 °C. El índice de activación se obtuvo, leyendo las placas a 550 nm (a) o contando contando al microscopio el número de células positivas (citoplasma azul) por 100 células; contando tres campos por pozo (b).

Los CII-crz fueron producidos usando la misma concentración de cruzipaína y diferentes concentraciones de IgG (15 μ g de cruzipaína con 100, 200, 300 ó 400 μ g de IgG anticruzipaína, para CII-1, CII-2, CII-3 y CII-4 respectivamente). En la figura 15, se muestra la inducción de la activación de estallido respiratorio en las células THP-1 con los cuatro diferentes CII-crz. El CII-crz que mejor indujo la activación de estallido respiratorio en las células THP-1 fue el CII-4 (15 μ g de cruzipaína con 400 μ g de IgG anticruzipaína). De aquí en adelante los CII-4 serán referidos simplemente como CII-crz.

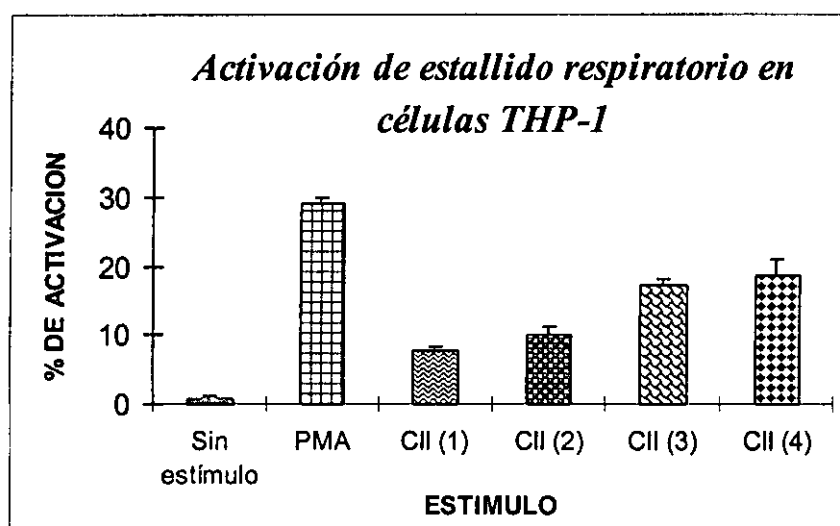


FIGURA 15. Activación de estallido respiratorio con diferentes complejos insolubles inmunes de cruzipaína anticruzipaína. La activación del estallido respiratorio se midió en células THP-1 diferenciadas y estimuladas con complejos insolubles inmunes de cruzipaína (CII-crz). CII (1), (2), (3) y (4), representan las diferentes proporciones de antígeno-anticuerpo usadas para formar los CII-crz. Como control positivo de la activación del estallido respiratorio se usó 10 μ M de PMA. El índice de activación celular se obtuvo, contando al microscopio el número de células positivas (citoplasma azul) por 100 células; contando tres campos por pozo. Todos los estímulos fueron probados por triplicado.

Después de encontrar los CII-crz óptimos para estimular las células THP-1, se hizo una curva dosis-respuesta, para saber si el estallido respiratorio se inducía de manera proporcional a la cantidad de CII-crz que se administraba a las células THP-1. La inducción de estallido respiratorio en las células THP-1 estimuladas con CII-crz, en efecto resultó ser directamente proporcional a la cantidad de CII-crz empleados para estimular a las células (figura 16). Así, cuando se usaron 40 μ l de CII-crz, se obtuvo el máximo índice de activación celular, comparado con las otras cantidades de CII-crz empleadas.

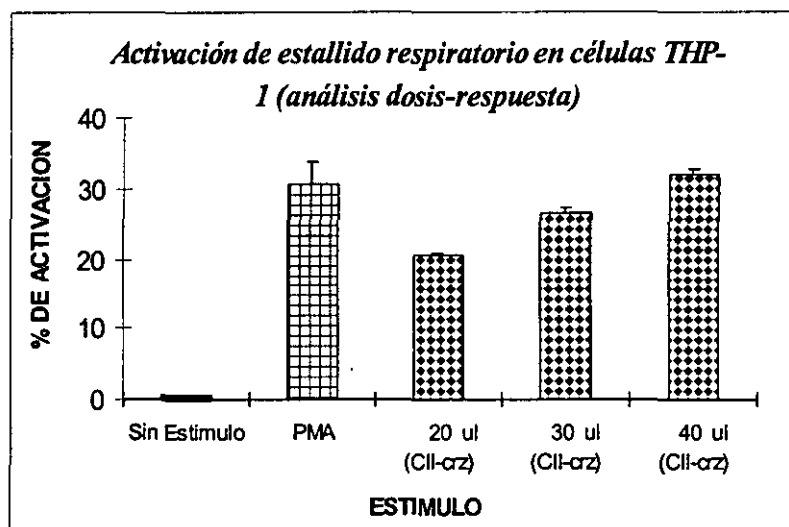


FIGURA 16. Análisis dosis respuesta de la activación de estallido respiratorio en células THP-1. El índice de activación del estallido respiratorio se midió en células THP-1 estimuladas con cantidades diferentes de CII-crz. Como control positivo de la activación del estallido respiratorio se usó 10 μ M de PMA. El porcentaje de activación se obtuvo, contando al microscopio el número de células positivas (citoplasma azul) por cada 100 células; contando tres campos por pozo. Todos los estímulos fueron probados por triplicado.

También, para estimular a las células THP-1 con CII no relacionados a *T. cruzi*, se prepararon complejos inmunes insolubles de albúmina sérica bovina (CII-alb). Además se utilizaron la cruzipaina pura y los anticuerpos anticruzipaina solos, para ver si éstos también podían activar a las células. Los CII-crz indujeron una activación de estallido respiratorio en aproximadamente 32 % de las células, mientras que la cruzipaina sola y las IgG anticruzipaina no indujeron la activación del estallido respiratorio en las células THP-1 (figura 17). Por otro lado los CII-alb indujeron la activación del estallido respiratorio en las células THP-1, aproximadamente 3 veces menos que los CII-crz. Cabe señalar que para hacer comparable la activación del estallido respiratorio en las células THP-1 estimuladas con los CII de cruzipaina y los CII de albúmina, se emplearon concentraciones equivalentes de proteína total para ambos tipos de CII.

V. 7. Secreción de TNF, IL-1 e IL-6 por Células THP-1 Estimuladas con CII-crz.

Una vez encontrada la proporción adecuada de antígeno y anticuerpo para preparar los CII-crz que daban la mejor respuesta celular, y conociendo que a mayor cantidad de CII-crz, la respuesta celular es mayor, se decidió probar la capacidad de estos CII-crz para inducir la secreción de TNF, IL-1 e IL-6 en las células THP-1 diferenciadas.

Para analizar la secreción de TNF por las células THP-1, se utilizó la técnica de citotoxicidad de células L-929 mediada por TNF (ver sección III. 12.). Los CII-crz indujeron la secreción de TNF, mientras que la cruzipaina y las IgG anticruzipaina no indujeron la secreción de TNF por las células THP-1 (figura 18). Cabe señalar que para los casos de la estimulación de células THP-1 con cruzipaina e IgG solas, se llevaron a cabo curvas dosis respuesta, pero bajo ninguna dosis empleada tanto de cruzipaina como de IgG, se observó activación de células THP-1. Las cantidades de cruzipaina y de IgG señaladas en los pies de figura corresponden a las cantidades

de antígeno y anticuerpo que quedarían en los 40 μ l de CII-crz empleados para estimular células THP-1, si todas las moléculas de cruzipaina e IgG que se mezclaron para formar los CII se hubieran complejoado. Por otro lado los CII-alb también indujeron la secreción de TNF por las células THP-1 pero a niveles inferiores a los que producían los CII-crz.

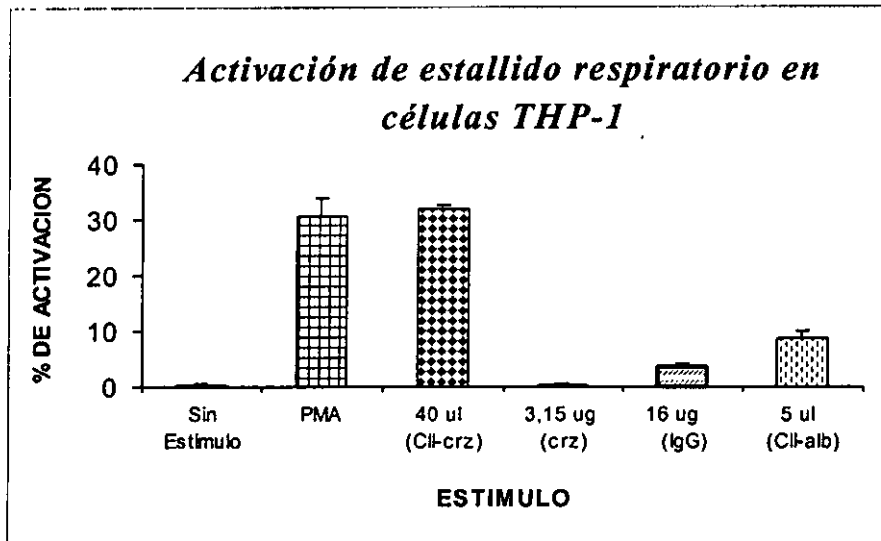


FIGURA 17. Activación de estallido respiratorio en células THP-1 por complejos inmunes insolubles. La activación de estallido respiratorio (reducción de NBT) se midió en células THP-1 estimuladas con: complejos inmunes insolubles de cruzipaina, CII-crz (40 μ l); cruzipaina pura, crz (3.15 μ g), IgG anticruzipaina, IgG (16 μ g); complejos inmunes insolubles de albúmina, CII-alb (5 μ l) y 10 μ M de PMA. El porcentaje de activación se obtuvo, contando al microscopio el número de células positivas (citoplasma azul) por cada 100 células; contando tres campos por pozo. Todos los estímulos fueron probados por triplicado.

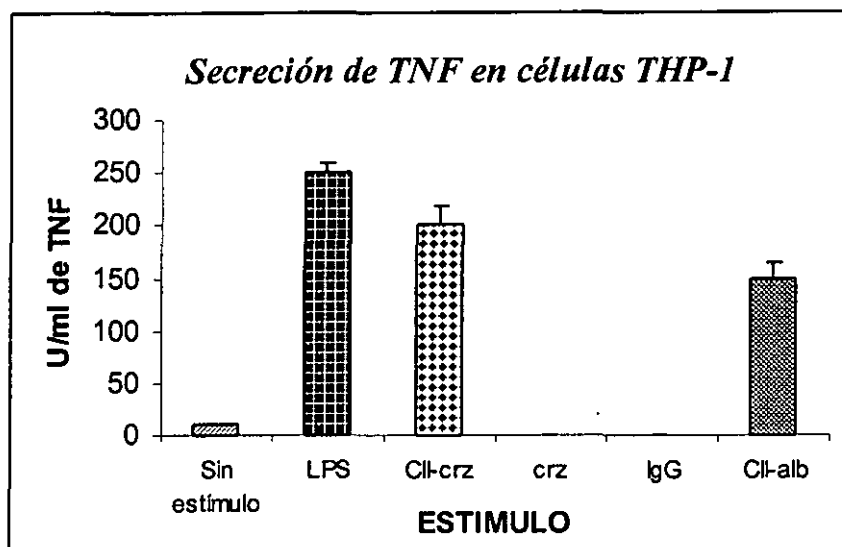


FIGURA 18. Secreción de TNF en células THP-1. La secreción de TNF se midió a través del efecto citotóxico del TNF sobre células L-929, usando los sobrenadantes de células THP-1 estimuladas durante 24 horas con: complejos inmunes insolubles de cruzipaina, CII-crz (40 μ l); cruzipaina pura, crz (3.15 μ g); IgG anticruzipaina, IgG (16 μ g); complejos inmunes insolubles de albúmina, CII-alb (5 μ l) y LPS (0.5 μ g/ml). Todos los estímulos fueron probados por triplicado.

Para analizar la secreción de IL-1 por las células THP-1, se utilizó un kit comercial para cuantificar IL-1 por la técnica de ELISA. Los CII-crz indujeron la secreción de IL-1, mientras que la cruzipaina y las IgG anticruzipaina no indujeron la secreción de IL-1 en las células THP-1 (figura 19). Por otro lado los CII-alb indujeron la secreción de IL-1 en las células THP-1 aproximadamente 25 % más que los CII-crz (figura 19).

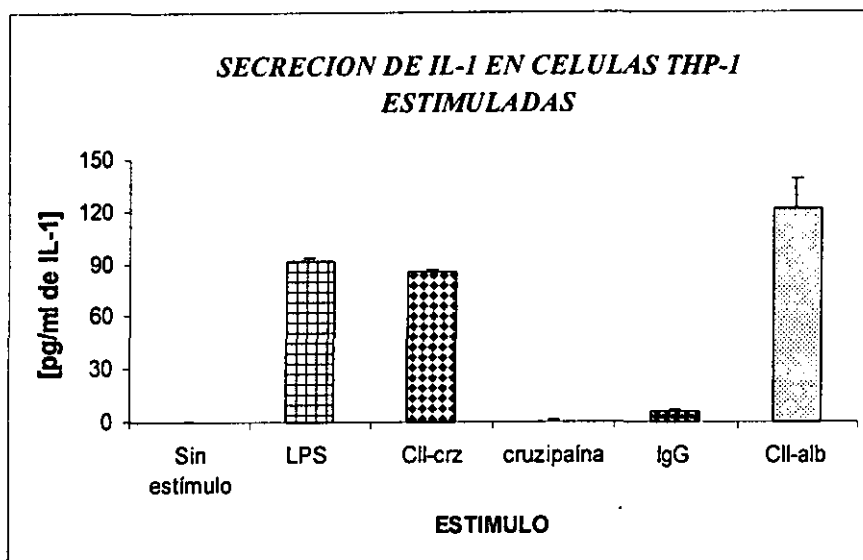


FIGURA 19. Secreción de IL-1 por células THP-1. La secreción de IL-1 se midió a través un kit comercial de ELISA para IL-1 humana, usando los sobrenadantes de células THP-1 estimuladas durante 24 horas con: complejos inmunes insolubles de cruzipaína, CII-crz (40 μ l); cruzipaína pura, crz (3.15 μ g); IgG anticruzipaína, IgG (16 μ g); complejos inmunes insolubles de albúmina, CII-alb (5 μ l) y LPS (0.5 μ g/ml). Todos los estímulos fueron probados por triplicado.

Para analizar la secreción de IL-6 en las células THP-1, se utilizó un kit comercial para cuantificar IL-6 por la técnica de ELISA. Los CII-crz indujeron la secreción de IL-6 en las células THP-1, mientras que la cruzipaína y las IgG anticruzipaína no lo hicieron (figura 20). Por otro lado, los CII-alb indujeron niveles ligeramente mayores de IL-6 en las células THP-1 que los CII-crz (figura 20).

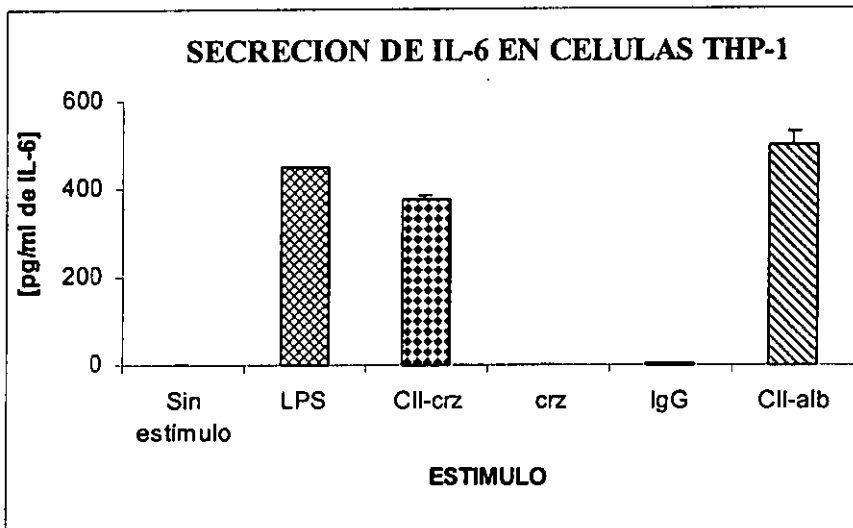


FIGURA 20. Secreción de IL-6 por células THP-1. La secreción de IL-6 se midió a través un kit comercial de ELISA para IL-6 humana, usando los sobrenadantes de células THP-1 estimuladas durante 24 horas con: complejos inmunes insolubles de cruzipaina, CII-crz (40 μ l); cruzipaina pura, crz (3.15 μ g); IgG anticruzipaina, IgG (16 μ g); complejos inmunes insolubles de albúmina, CII-alb (5 μ l) y LPS (0.5 μ g/ml). Todos los estímulos fueron probados por triplicado.

VI. DISCUSION

El fenómeno de inflamación en el miocardio en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, no está bien documentado. Los mecanismos bajo los cuales se desarrolla este daño continúan aún sin ser esclarecidos. Se cree que la presencia de antígenos de secreción de *T. cruzi* (como la cruzipaína) en los sitios de inflamación, podrían intervenir en el desarrollo del daño al miocardio observado en la fase crónica de la enfermedad.

En este trabajo se planteo una hipótesis para explicar el mecanismo que genera el daño inflamatorio en el corazón, observado en personas y animales crónicamente infectados con *T. cruzi*. La hipótesis de este trabajo se basa en la evidencia que existe sobre la persistencia de antígenos de *T. cruzi*, en el tejido de corazón de mamíferos en fase crónica de la infección, el cual en esta fase, presenta un grave daño de tipo inflamatorio (Higuchi et al., 1997; Zhang and Tarleton, 1999). Uno de los más importantes antígenos de *T. cruzi*, es la cruzipaína. La cruzipaína es la principal proteasa de *T. cruzi*. Es una proteasa de cisteína, cuya actividad enzimática es inhibida completamente por E-64 (un inhibidor específico de proteasas de cisteína) (Murta et al., 1990). Esta enzima es clave para el parásito, ya que cuando su actividad se inhibe, se ven afectados procesos como: la digestión del parásito, la invasión de la célula huésped por el parásito y la degradación del citoesqueleto para la transformación de una fase a otra del parásito (Bontempi et al., 1984; Bontempi et al., 1989; McKerrow, 1989; McKerrow, 1993; Meirelles et al., 1992).

Además, también se sabe que muchos de estos antígenos, generan una fuerte respuesta inmune humoral. Estos antígenos pueden formar complejos inmunes con sus anticuerpos en los propios sitios donde se desarrolla la inflamación. Debido a que en los órganos inflamados en la

fase crónica de la infección por *T. cruzi*, existe un gran infiltrado celular, entre los que destacan macrófagos y linfocitos (Ravelli et al., 1998; Sunnemark et al., 1998), se propone que los complejos inmunes, se depositan en los tejidos provocando ahí un estado inflamatorio crónico, el cual interviene en el desarrollo del daño tisular. Para probar esta idea se prepararon complejos inmunes con una enzima inmuno dominante de *T. cruzi* (la cruzipaína) y se analizó si estos complejos inmunes promueven la activación del estallido respiratorio y la secreción de mediadores proinflamatorios (como TNF, IL-1 e IL-6) en macrófagos. Estos mediadores promueven la infiltración y activación de células que participan en el desarrollo de un estado de inflamación crónico, esto podría exacerbar el daño en el órgano donde se formen los complejos inmunes.

Para poder obtener los complejos inmunes de cruzipaína, tanto la cruzipaína como los anticuerpos anticruzipaína fueron purificados de manera exitosa. Aunque, al probar el reconocimiento de la cruzipaína por los anticuerpos presentes en los sueros de personas infectadas con *T. cruzi*, se observó que existían rastros de otras proteínas contaminando la cruzipaína purificada. Interesantemente, se observó que existe un reconocimiento diferente de la cruzipaína por los anticuerpos de los sueros de las personas infectadas, que parece depender del estado de la infección (sintomático o asintomático) y del origen geográfico de los pacientes. Esto puede estar relacionado al hecho de la circulación de diferentes cepas de *T. cruzi* en los sitios donde existe la enfermedad de Chagas. Parece ser que ciertas cepas son más virulentas que otras y dependiendo de esto también varía la respuesta inmunológica, siendo más fuerte para las cepas no-virulentas y más débil para las virulentas (Caballero-García, 1996).

El diferente reconocimiento de la cruzipaína por los anticuerpos de los sueros de los pacientes de diferentes zonas geográficas, también podría explicarse en términos de la expresión

de diferentes isoformas de la cruzipaina en las cepas de *T. cruzi* que se encuentran circulando en cada zona geográfica. Probablemente la isoforma de cruzipaina de la cepa Y (que fue la empleada en este trabajo), no es la misma que la cruzipaina de las cepas de *T. cruzi* que se encuentran en México, y por ello tal vez los anticuerpos de los sueros Brasileños reconocen mejor a la cruzipaina que los Mexicanos.

Por otro lado, en este trabajo se ha observado que la elección de líneas celulares para el estudio de activación de macrófagos, es importante. Aquí se demostró que la línea celular J-774, no funcionaba para nuestros propósitos, ya que al analizar la activación del estallido respiratorio en estas células, no se observaron diferencias entre los niveles de activación de las células con y sin estímulo. Probablemente analizando otras funciones celulares se hubieran podido encontrar diferencias al estimular estas células.

Por otro lado, se observó que el uso de una línea monocítica diferenciada, resolvió el problema entre los niveles de activación de estallido respiratorio. Al analizar los índices de activación celular en células THP-1 estimuladas y sin estímulo, se observó que existen diferencias significativas (casi nueve veces) en este ensayo. Además, por tratarse de una línea celular humana, el estudio resulta más parecido a lo que ocurriría en los humanos afectados con la enfermedad de Chagas. Si bien es cierto que la mayor parte de los estudios de la enfermedad de Chagas han sido hechos en modelos murinos, por la facilidad de su manejo, llevar a cabo estudios en líneas celulares humanas es probablemente una mejor aproximación.

El principal daño generado en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, es el daño inflamatorio en el corazón. Para saber si parte de éste daño al corazón podría ser generado por la cruzipaina al encontrarse en forma de complejos inmunes, en este trabajo se probó la activación de macrófagos generada por complejos inmunes insolubles de cruzipaina (CII-crz). La

estimulación con estos CII-crz activa el estallido respiratorio en las células THP-1 diferenciadas (macrófagos). Si bien la activación del estallido respiratorio en macrófagos está relacionada a la eliminación de patógenos intracelulares, aquí jugaría un papel diferente, ya que en la fase crónica de la enfermedad de Chagas (donde se presenta el daño inflamatorio en el corazón), el parásito no se localiza con facilidad en los sitios de inflamación.

En los tejidos dañados de pacientes chagásicos se ha encontrado una persistencia de antígenos de *T. cruzi* que correlaciona con un abundante infiltrado de leucocitos (Higuchi et al., 1997; Zhang and Tarleton, 1999). Muy probablemente la formación de CI con estos antígenos sea en parte, responsable de la activación de células fagocíticas que resulta en la destrucción observada en los tejidos inflamados. En aquellos modelos donde se ha estudiado el daño inflamatorio en el corazón durante la fase crónica de la infección por *T. cruzi*, se sabe que existe un gran infiltrado de células inflamatorias entre las que destacan: linfocitos T CD4+ y CD8+, macrófagos y linfocitos B. El papel que desempeñan cada una de estas células en el proceso inflamatorio en el corazón no es claro. Es posible que la predisposición del huésped a la infección y el tipo cepa de *T. cruzi*, influyan en el papel que puedan jugar estas células, ya sea promoviendo o evitando la inflamación cardíaca en la enfermedad de Chagas (Caballero-García, 1996).

Por lo tanto, si complejos inmunes de cruzipaina estimularan el estallido respiratorio en macrófagos, como se ha observado *in vitro*, este fenómeno podría promover la sobreestimulación de los macrófagos que se encuentran en los infiltrados celulares de especímenes de miocardio de animales infectados crónicamente con *T. cruzi* (Ravelli et al., 1998; Sunnemark et al., 1998). Esta sobreestimulación de macrófagos, como mecanismo en contra de un parásito que no se encuentra en el lugar mismo de la activación, podría favorecer el daño ocasionado al corazón en la

inflamación crónica de la enfermedad de Chagas. Los macrófagos podrían estar destruyendo las fibras musculares del miocardio, a través de la liberación de radicales libres, durante la activación del estallido respiratorio, causando un daño grave en este órgano.

La estimulación de células THP-1 en este estudio, demostró también que los CII-crz son capaces de inducir la activación de secreción de mediadores proinflamatorios tales como el TNF, IL-1 e IL-6. Debido a que en los sitios de inflamación, además de macrófagos, se encuentra un gran cúmulo de linfocitos T (tanto CD4+ como CD8+) y linfocitos B (Ravelli et al., 1998; Sunnemark et al., 1998); el reconocimiento de complejos inmunes podría activar a estas estirpes celulares. Dicha activación promueve la estimulación de la secreción de moléculas quimiotácticas (como TNF, IL-1 e IL-6) para células proinflamatorias, lo cual favorece no solo un fuerte infiltración de éstas células, sino además su activación. Es decir, en el caso de los linfocitos T, estas células son capaces de establecer un mecanismo inmunológico de protección en el huésped, cuando existe la presencia de algún patógeno (como una bacteria o un protozoario). Sin embargo en un sitio donde sólo hay antígenos de secreción parasitarios, anticuerpos contra estos antígenos (Ravelli et al., 1998; Reis et al., 1997) y probablemente complejos inmunes, la activación de linfocitos T no pueden funcionar de manera protectora, ya que si se genera una respuesta citotóxica, no hay patógeno que destruir y muy probablemente sean las células del tejido dañado (donde están depositados los antígenos parasitarios), las que sean destruidas por los linfocitos T.

En el caso de los linfocitos B, la activación de esta estirpe celular podría explicar la presencia de anticuerpos contra los antígenos parasitarios presentes en los sitios de inflamación.

Cuando los leucocitos fagocíticos reconocen complejos inmunes depositados en tejidos, se genera un daño inflamatorio conocido como hipersensibilidad de tipo III (Roitt et al., 1998;

Trowbridge and Emling, 1997). La hipersensibilidad de tipo III, es muchas veces un padecimiento autoinmunológico en el que se forman complejos inmunes por la presencia de anticuerpos contra proteínas del propio organismo. Las células de la respuesta inmunológica (como los macrófagos y linfocitos), al encontrarse con los complejos inmunes depositados sobre los tejidos, los reconocen y provocan el daño a los tejidos. Este también podría ser otro mecanismo de daño tisular en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, ya que ciertos antígenos parasitarios presentan mimetismo con proteínas del huésped (como las de las fibras musculares del miocardio) (Motrán et al. 2000). Los anticuerpos generados contra estos antígenos parasitarios tendrían entonces la capacidad de no solo formar complejos inmunes con los antígenos del parásito, sino además con los del propio huésped. Esto de nuevo ayudaría a promover el daño tisular, por el mismo mecanismo que ya hemos propuesto con anterioridad.

Con respecto a la activación observada con los CII-alb, no es sorprendente que activen a los macrófagos de manera similar que los CII-crz. Si bien es cierto que tal vez cualquier complejo inmune podría activar al menos el estallido respiratorio y la secreción de TNF, IL-1 e IL-6, hay que dejar claro que los niveles de activación de la secreción de cada una de estas citocinas, son diferentes con cada CII empleado.

En este trabajo se ha empleado complejos que en principio, poseen una concentración y conformación diferentes, ya que los CII-crz fueron producidos a partir de IgG de cobayo anticruzipaina y cruzipaina puros, mientras que los CII-alb fueron producidos a partir de un suero de conejo anti-albúmina sérica bovina y albúmina sérica bovina. Además, las relaciones de antígeno y anticuerpo empleadas en cada caso para la formación de cada CII, también son diferentes. Por lo cual no se conoce la cantidad exacta de antígeno y anticuerpo que quedó al final de la formación de cada complejo. Para conocerlas, se necesitarían emplear métodos de

cromatografía, por lo cual sólo se puede decir que ambos complejos son diferentes. Aún así, la concentración de antígeno y anticuerpo que queda al final de la formación de los CII-crz es menor que la obtenida para los CII-alb, y a pesar de ello los CII-crz fueron mejores activadores, de al menos el estallido respiratorio y la secreción de TNF en los macrófagos.

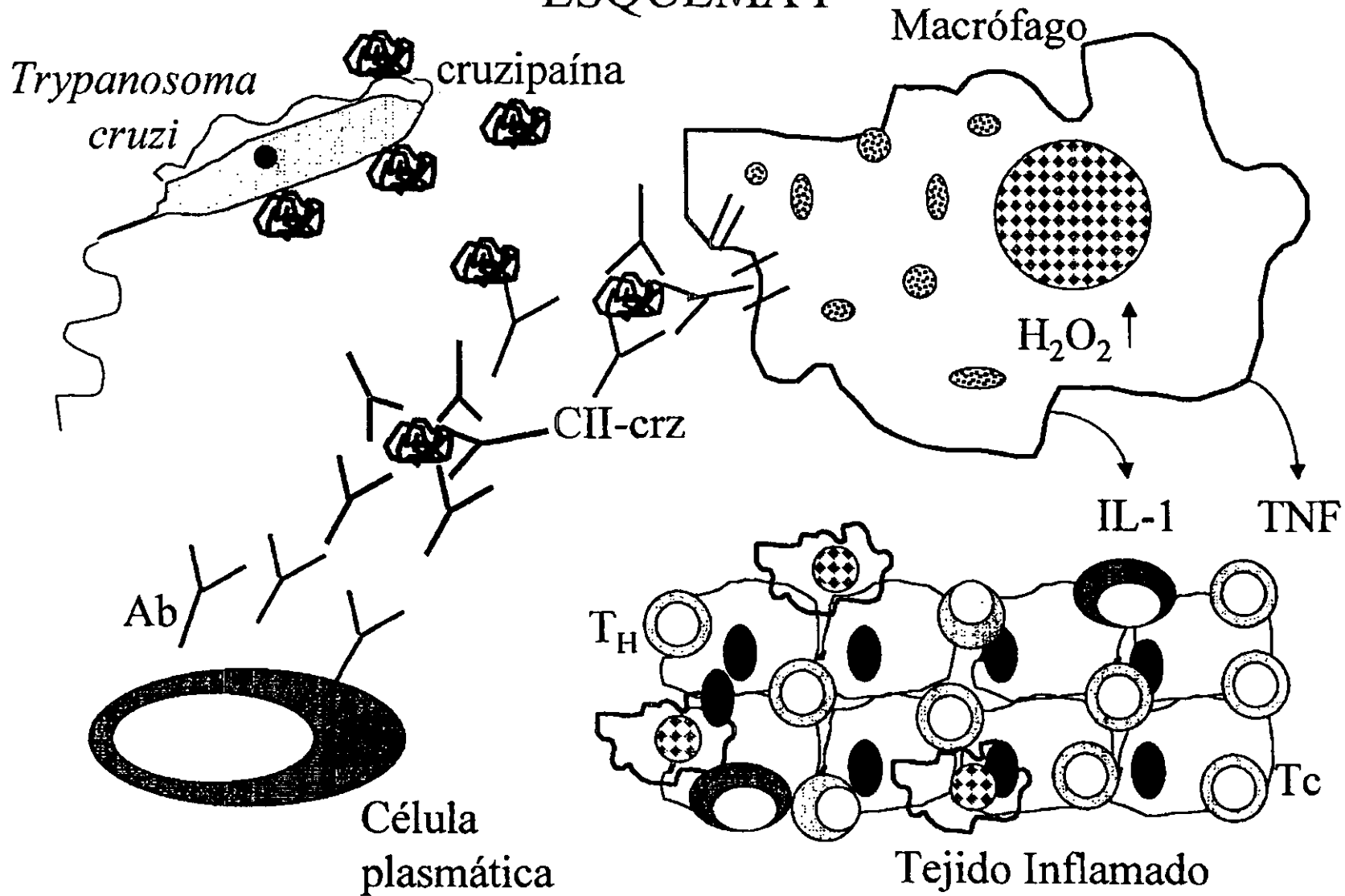
En el caso de la activación de la secreción de IL-1 e IL-6, se observó que los CII-alb activan igual que los CII-crz (IL-1) o incluso más que los CII-crz (IL-6) en las células THP-1. Sin embargo, podría ser cierto que la estimulación de todas las funciones analizadas en los macrófagos durante el presente estudio, puedan ser validas para cualquier complejo inmune. Para generalizar el efecto de los complejos inmunes sobre la activación de macrófagos que podría contribuir en el desarrollo de la inflamación, habría que estudiar la activación de otros eventos involucrados en la promoción de la inflamación (como secreción de IL-8, liberación de histamina, etc.), así como analizar si la conformación de diferentes complejos inmunes empleados para estimular células, es crucial para la activación de otros mecanismos inmunológicos, que conlleven al final al desencadenamiento de un proceso crónico inflamatorio.

Por otro lado, hemos observado que ni la cruzipaina sola, ni los anticuerpos anticruzipaina solos, son capaces de activar el estallido respiratorio, ni la secreción de TNF, de IL-1 y de IL-6 por las células THP-1 diferenciadas. Esto apoya la idea de que al menos para estos eventos, es necesario que la cruzipaina y sus anticuerpos se encuentren formando complejos inmunes. Cabe señalar que se conocen otros mecanismos de activación celular *in vitro* en los que participa la cruzipaina, aunque en estos también se encuentra formando complejos, pero no del tipo inmune, sino con α -macroglobulina (Morrot et al., 1997). También se sabe que la cruzipaina es capaz de generar daño al corazón por si misma, valiéndose de su actividad de proteasa (Del Nery et al., 1997, Scharfstein et al., 2000).

En este trabajo se propone entonces, que durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, el parásito secreta antígenos como al cruzipaina, la cual es un potente inmunógeno. Cuando la cruzipaina se deposita en tejidos como los de el corazón, si en el mismo sitio se encuentran anticuerpos anticruzipaina, entonces se forman complejos inmunes. Si los complejos inmunes quedan depositados en el tejido cardiaco, se activan los macrófagos. Estos a su vez secretan mediadores proinflamatorios y radicales libres en el tejido. Todo esto en conjunto, promovería una fuerte infiltración celular, así como un daño tisular crónico, que causarían la fuerte inflamación crónica observada durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas (ver esquema D).

La importancia biológica que tiene la cruzipaina durante la invasión de la célula huésped, durante la degradación del citoesqueleto, para la transformación de una fase a otra del parásito y como clave del metabolismo del parásito, ha sido demostrada (Bontempi et al., 1984; Bontempi et al., 1989; McKerrow, 1989; McKerrow, 1993; Meirelles et al., 1992). También se ha demostrado que es un antígeno inmunodominante, pues induce una elevada producción de anticuerpos en pacientes infectados. Lo anterior resulta paradójico, pues si la cruzipaina es reconocida por anticuerpos, los procesos celulares en los que ésta está involucrada se verían afectados. Sin embargo, esto no es lo que sucede en la enfermedad de Chagas, pues incluso los sueros de pacientes en fase crónica sintomática, presentan una abundante producción de anticuerpos anticruzipaina. Esto sugiere la existencia de sofisticados mecanismos empleados por *T. cruzi* para evadir el sistema inmunológico. Cuando estos mecanismos no están perfectamente regulados, se puede dar una respuesta que exacerbe el daño en los tejidos del huésped, generando un proceso inflamatorio crónico como el observado en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

ESQUEMA I



VII. CONCLUSIONES

- Se purificó la cruzipaina exitosamente y se produjeron anticuerpos policlonales anti-cruzipaina de manera eficiente para la preparación de CII-crz.
- El uso de las células J-774 no fue adecuado, ya que los niveles de activación celular basal eran comparables a los observados con un estímulo fuerte de estallido respiratorio, como lo es el PMA.
- Las células THP-1 pueden ser empleadas para el estudio de activación de macrófagos con CII, siempre y cuando se diferencien a macrófagos.
- Los CII-crz son potentes activadores de respuestas celulares como son la activación de estallido respiratorio y la secreción de citocinas TNF, IL-1 e IL-6.
- La cruzipaina por sí misma o los anticuerpos anti-cruzipaina no promueven la activación de estallido respiratorio, ni la secreción de citocinas TNF, IL-1 e IL-6.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

- Bontempi, E., Franke, B., Ruiz, A., & Cazzulo, J. (1984). Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B, 599-604.
- Bontempi, E., Martínez, J., & Cazzulo, J. (1989). Subcellular localization of a cystein proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 43-48.
- Caballero-García, M.L. (1996). Estudio de la respuesta inmune humoral inducida por cuatro aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi* en modelo murino, Tesis de la Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cazzulo, J., Couso, R., Raimondi, A., Wernstedt, C., & Hellman, U. (1989). Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 33-42.
- Cunha-Neto, E., Duranti, M., & Gruber, A. (1995). Autoimmunity in Chagas' disease cardiopathy. Biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3541-3545.
- Cunha-Neto, E., Moliterno, R., & Coelho, V. (1994). Restricted heterogeneity of T cell receptor variable alpha chain transcripts in heart of Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Parasite Imm.* 16, 171-179.
- De Titto, E., Brun, M., Lazzari, J., & Segura, E. (1985). Cell mediated reactivity against human an *Trypanosoma cruzi* antigens according to clinical status in Chagas' disease patients. *Imm. Lett.* 9, 249-254.

- Del Nery, E., Juliano, M., Scharfstein, J., & Juliano, L. (1997). Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* *272*, 25713-25718.
- Gershoni, J., & Palade, G. (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* *131*, 1-15.
- Harlow, E., & Lane, D. (1988). *Antibodies. A laboratory manual*. U.S.A., Ed. 726 pp. pp.
- Hellman, U., Wernstedt, C., & Cazzulo, J. (1991). Self-proteolysis of the cysteinase, cruzipain, from *Trypanosoma cruzi* gives a major fragment corresponding to its carboxy-terminal domain. *Mol. Biochem. Parasitol.* *44*, 15-22.
- Helssen, C., & Dowdle, E. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* *102*, 196-202.
- Higuchi, M., Reis, M., Aiello, V., Benvenuti, L., Gutierrez, P., Bellotti, G., & Pileggi, F. (1997). Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg* *56*, 485-489.
- Katz, M., Despommier, D., & Gwadz, R. (1988). *Parasite diseases*. New York, USA, Ed. 301 pp.
- Kierszenbaum, F. (1999). Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin. Microbiol. Rev.* *12*, 210-223.
- Laemmli, O. (1970). Cleavage of structural proteins the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *128*, 680-685.

- López-Olmos, V., Pérez-Nasser, N., Piñero, D., Ortega, E., Hernandez, R., & Espinoza, B. (1994). Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 69, 239-254.
- Lozano, K., Hernández, G., Kasten, M., García, O., Lomelí, E., & Ramírez, A. (1995). Megaesófago por enfermedad de Chagas en la infancia. Un caso en el estado de Jalisco, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales. Universidad de Guadalajara, México.
- McKerrow, J. (1989). Parasites proteases. *Exp. Parasitol.* 68, 111-115.
- McKerrow, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 821-853.
- Meirelles, M., Juliano, L., Carmona, E., Silva, S., Costa, E., Murta, A., & Scharfstein, J. (1992). Inhibitors of major cysteinyl proteinase (GP57/51), impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52, 175-184.
- Melo, C., Cavalcanti, G., Bonaldo, M., Mortensen, R., & Araujo-Jorge, T. (1998). *Trypanosoma cruzi*: detection of a surface antigen cross-reactive to human C-reactive protein. *Exp. Parasitol.* 90, 143-153.
- Morrot, A., Strickland, D., Higuchi, M., Reis, M., Pedrosa, R., & Scharfstein, J. (1997). Human T cell responses against the major cysteinase (cruzipain) of *Trypanosoma cruzi*: role of the multifunctional alpha 2-macroglobulin receptor in antigen presentation by monocytes. *Int. Immunol.* 9, 825-834.
- Motrán, C., Fretes, R., Cerbán, F., Rivarola, H., & Vottero de Cima, E. (2000). Immunization with the C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* ribosomal P1 and P2 proteins induces long-

- term duration cross-reactive antibodies with heart functional and structural alterations in young and aged mice. *Clin. Immunol.* 97, 89-94.
- Murta, A., Persechini, P., Souto-Padron, T., de Souza, W., Guimaraes, J., & Scharfstein, J. (1990). Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43, 27-38.
- Nava, C. (1997). Caracterización de proteasas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, Tesis de la Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Nieto, G. (1997). Caracterización de proteasas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Querétaro, Tesis de la Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Noble, E., Noble, S., Schand, G., & McInnes, A. (1989). *Parasitology, the biology of animal parasites*. Febiser, L.a. Londres, UK, Lea and Febiser. 28-34.
- OMS (1991). Control de la enfermedad de Chagas. Informe de un comité de expertos de la OMS. Serie de informes técnicos. Ginebra, OMS.
- Pereira, M. (1990). Cellular, Immunological and Molecular Aspects. En "Modern Parasite Biology". Ed. Wyler, D.J. USA, Freeman and Co. 64-78.
- Peterson, G. (1983). Determination of total protein. *Methods Enzymol.* 91, 369-372.
- Ravelli, S., Didoli, G., Roggero, E., Moreno, H., Bernabo, J., Wietzerbin, J., & Bottasso, O. (1998). Macrophage activity, IL-6 levels, antibody response and heart histology in rats undergoing an attenuated *Trypanosoma cruzi* acute infection upon treatment with recombinant interferon gamma. *Cytokines Cell. Mol. Ther.* 4, 153-159.
- Reis, M., Higuchi, M., Benvenuti, L., Aiello, V., Gutierrez, P., Bellotti, G., & Pileggi, F. (1997). An *in situ* quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic

- human chagasic myocarditis: correlation with presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. Clin. Immunol. Immunopathol. 83, 165-172.
- Reyes, P. (1984). Enfermedad de Chagas en México. Arch. Inst. Cardiol. Méx. 54, 1-2.
- Reyes, P., Mendoza, D., Marcuschmer, J., & García, D. (1983). Miocardiopatía congestiva y Tripanosomiasis americana. Sal. Púb. Méx. 25, 139-144.
- Rezende, J. (1984). The digestive tract in Chagas' disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79, 97-106.
- Roitt, I., Brostoff, J., & Male, D. (1998). *Immunology*. London, UK, Ed. Mosby. 423 pp.
- Salazar, P., Tay, J., Ruiz, H., De Haro, I., Bucio, M., Jiménez, J., García, Y., & Gutiérrez, Q. (1984). Seropositividad a *Trypanosoma cruzi* en cuatro grupos de una población del estado de Oaxaca. Sal. Pub. Méx. 26, 589.
- Sánchez-Mejorada, G., & Rosales, C. (1998). Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. J. Leukoc. Biol. 63, 521-533.
- Scharfstein, J., Luquetti, A., Murta, A., Senna, M., Rezende, M., Rassi, A., & Mendoça-Previato, L. (1985). Chagas' disease serodiagnosis with purified GP25 antigen. Am. J. Trop. Med Hyg. 34, 1153-1160.
- Scharfstein, J., Schechte, M., Senn, M., Peralta, J., Mendoça-Previato, L., & Miles, M. (1986). *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of a 57/51,000 MW surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. J. Immunol. 137, 1336-1341.
- Scharfstein, J., Schmitz, V., Morandi, V., Capella, M., Lima, A., Morrot, A., Juliano, L., & Müller-Ester, W. (2000). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. J. Exp. Med. 192, 1289-1299.

- Sunnemark, D., Frostegard, J., Orn, A., & Harris, R. (1998). Cellular and cytokine characterization of vascular inflammation in CBA/J mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Scand. J. Immunol.* 48, 480-484.
- Tarleton, R., Zhang, L., & Downs, M. (1997). "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas' disease is a parasite-specific response to infected host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3932-3937.
- Theofilopoulos, A. (1995). The basis of autoimmunity: Part I Mechanism aberrant self-recognition. *Immunol. Today* 16, 90-98.
- Trowbridge, H., & Emling, R. (1997). *Inflammation. A review of the process*. Illinois, USA, Ed. 236 pp.
- Trujillo, C., Covarrubias, P., Ocampo, G., López, L., & Gálvez, G. (1993a). Megaesófago chagásico con serología y xenodiagnóstico positivos. *Rev. Gastroenterol. Méx.* 58, 36-38.
- Trujillo, C., Lozano, K., Soto, G., & Hernández, G. (1993b). Prevalencia de infección a *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre en el estado de Jalisco, México. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 26, 89-92.
- Velasco, C., Valdespino, J., Tapia, C., Salvarriera, B., Guzmán, B., Magos, C., Llausás, A., Gutiérrez, G., & Sepúlvera, J. (1992). Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en Santiago Yosotiche, Oaxaca, México. *Sal. Pub. Méx.* 27, 60-65.
- Zhang, L., & Tarleton, R. (1999). Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J. Infect. Dis* 180, 480-486.

APENDICE I

Medios de Cultivo para Epimastigotes de *T. cruzi* y Células J-774, L-9292 y THP-1

A) Medio LIT(Liver Infusion Triptose) para epimastigotes.

	Composición por litro:
Cloruro de sodio (NaCl)	4.0 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.4 g
Bifosfato de sodio (Na ₂ HPO ₄)	8.0 g
Glucosa	2.0 g
Triptosa (DIFCO, # cat. 0269-17-7)	5.0 g
Hemina* (SIGMA, # cat. H-2250)	25.0 mg
Suero fetal de bovino (SFB)** (GIBCO, # cat. 200-614J)	100 ml

Modo de preparación

Todas las sales se disuelven primero en 900 ml de agua bidestilada y se ajusta el pH a 7.2. La disolución se afora a 1000 ml y se esteriliza en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Después se hace una prueba de esterilidad de la disolución dejándola a temperatura ambiente durante tres días en la oscuridad. Finalmente, si no hay contaminación, se adicionan la hemina y el suero fetal bovino y se vuelve a realizar la prueba de esterilidad. El medio completo se guarda a 4 °C en la oscuridad.

*Se pesan 0.25 g de hemina y se disuelven en 5 ml de trietanolamina (SIGMA, # cat. T-1377). La disolución se esteriliza a través de una membrana de 0.22 µm y se almacena a 4 °C en la oscuridad.

** Para inactivar las proteínas del complemento, el suero se calienta a 65 °C durante 45 minutos.

B) Medio D-MEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) para células J-774 y L-929.

El medio D-MEM se encuentra disponible comercialmente. Para los experimentos se utilizó el de la marca GIBCO, # de cat. 430-2100EC. El medio en polvo de un sobre para un litro, se disuelve en 900 ml de agua bidestilada y se le añaden 3.7 g de NaHCO_3 . Se ajusta el pH del medio a 7.1-7.3 y se afora a 1000 ml. El medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.22 μm y se guarda a 4 °C. Antes de usarse, el medio se complementa con SFB al porcentaje deseado, glutamina, piruvato, vitaminas, aminoácidos no esenciales y antibióticos, todos al 1 % (ver nota más adelante).

C) Medio RPMI 1640 para células THP-1.

El medio RPMI 1640 se encuentra disponible comercialmente. Para los experimentos se utilizo el de la marca GIBCO, # de cat. 31800-022. El medio en polvo de un sobre para 1 litro se disuelve en 900 ml de agua bidestilada y se le añaden 2 g de NaHCO_3 . El pH del medio se ajusta a 7.1-7.3 y se afora a 1000 ml. El medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.22 μm y se guarda a 4 °C. Antes de usarse, el medio se complementa con SFB al porcentaje deseado, glutamina, piruvato, vitaminas, aminoácidos no esenciales y antibióticos, todos al 1 % (ver nota más adelante)..

NOTA: El piruvato, las vitaminas y los aminoácidos no esenciales, se encuentran disponibles comercialmente.

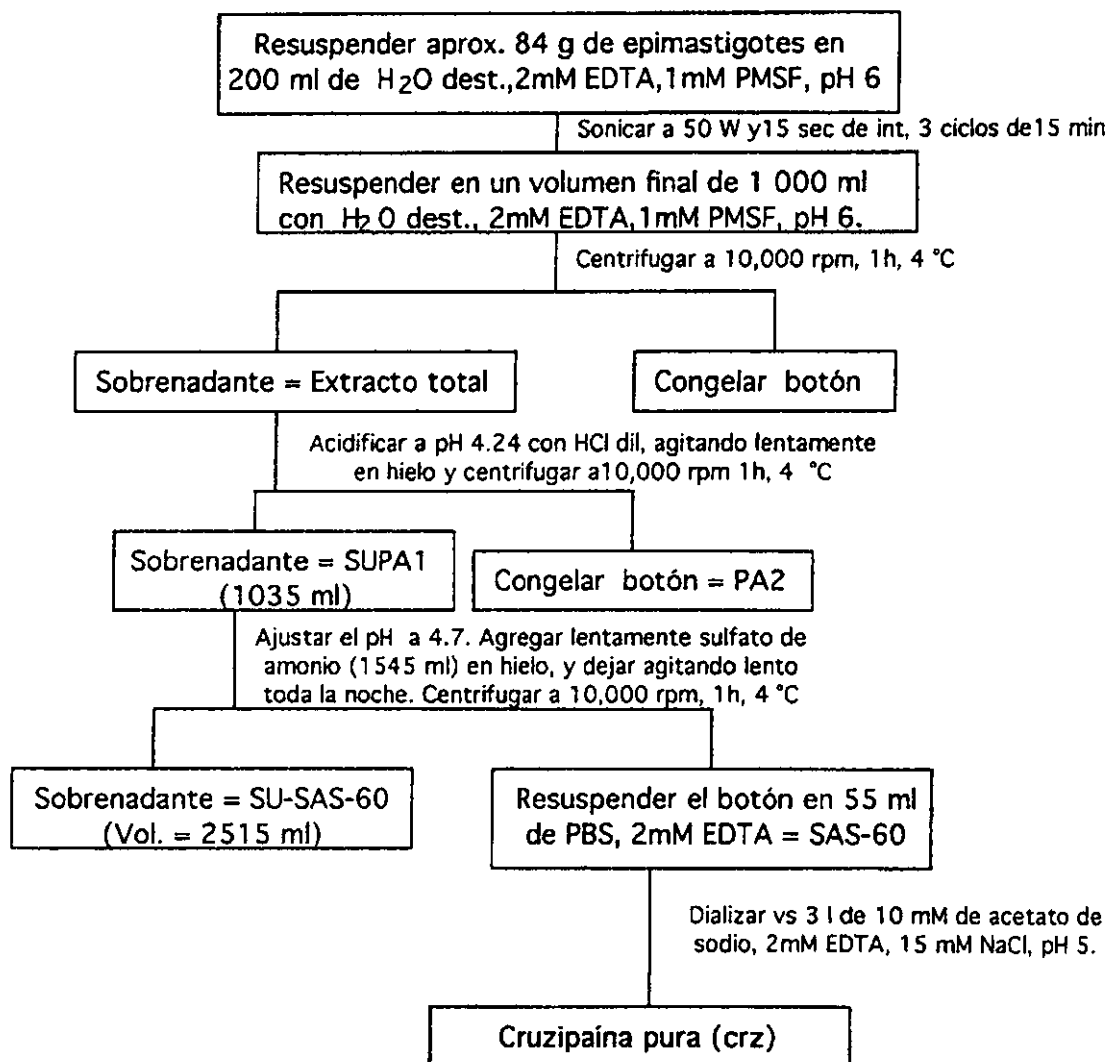
La disolución de glutamina 100 X se prepara disolviendo 2.92 g de glutamina en 100 ml de PBS 1X. Esta disolución se esteriliza a través de una membrana de 0.22 μm y se almacena en alícuotas de 40 ml a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La disolución de antibióticos 100 X se prepara disolviendo 1.5 g de penicilina (equivalente a 100,000 U) y 2.5 g de estreptomina (equivalente a 100,000 U) en 250 ml de PBS 1X. Esta disolución se esteriliza a través de una membrana de 0.22 μm y se almacena en alícuotas de 40 ml a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

APENDICE II

Diagrama de Flujo para la Purificación de la Cruzipaina

PURIFICACION DE CRUZIPAINA



APENDICE III

Disoluciones Amortiguadoras de pH

A) Disolución salina balanceada de Hank (HBSS) con 1 % de albúmina sérica bovina (BSA)-

Disolver 9.75 g de HBSS en polvo (GIBCO, # de cat. 450-1200) en 900 ml de agua bidestilada y adicionar 0.35 g de NaHCO_3 , 10 g de BSA. Ajustar el pH a 7.1 y aforar a 1000 ml.

La disolución final se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.22 μm .

B) Disolución amortiguador de acetatos pH 5.6

Ácido acético 0.2 M	48 ml
Acetato de sodio 0.2 M	45.2 ml
Completar con agua bidestilada a	100 ml

C) Disolución amortiguadora salina de fosfatos (PBS IX)

Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.36 g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	1.1 g
Cloruro de sodio (NaCl)	9.0 g
Completar con agua bidestilada a	1000 ml

ESTÁ
ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

APENDICE IV

Electroforesis en Gel de Acrilamida/Bisacrilamida.

Los geles de acrilamida/bisacrilamida se preparan en una cámara Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad).

Preparación de geles.

a) Gel separador al 10 %

Acrilamida-bisacrilamida* (30 %)	1.66 ml
4X Tris-HCl pH 8.8**	1.25 ml
Agua bidestilada	2.08 ml
TEMED	0.003 ml
Persulfato de amonio (100 mg/ml)	0.016 ml

b) Gel concentrador al 5 %

Acrilamida-bisacrilamida* (30 %)	0.27 ml
4X Tris-HCl pH 6.8***	0.417 ml
Agua bidestilada	1.017 ml
TEMED	0.002 ml
Persulfato de amonio (100 mg/ml)	0.008 ml

* Disolución de acrilamida/bisacrilamida al 30 %. Disolver 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida en 80 ml de agua bidestilada. Aforar la disolución a 100 ml y filtrar a través de una membrana de 0.22 μm . Guardar a 4 °C en un frasco protegido de la luz.

Preparación de la muestra y condiciones de corrida.

La cruzipaina, las IgGs y los CII, se mezclan en una proporción 1:1 con el amortiguador de muestra, se hierven durante 5 minutos y se depositan en los carriles respectivos de los geles de acrilamida. La corrida de electroforesis se realiza a 200 volts durante 45 minutos aproximadamente con el amortiguador de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1 %)

Amortiguador de muestra

Tris HCl pH 6.8	0.5 M
SDS	2 %
Azul de bromofenol	1 %
Glicerol	20 %
2-β -mercaptoetanol	2 %

APENDICE V

Electroforesis en gel de Acrilamida/Bisacrilamida Copolimerizado con Gelatina

Los geles de acrilamida para el análisis de la actividad proteolítica de la cruzipaina se preparan en una cámara Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad).

Preparación de geles.

a) Gel separador al 8.6 %

Acrilamida-bisacrilamida* (30 %)	1.15 ml
4X Tris-HCl pH 8.8**	1.25 ml
PBS 1X	0.05 ml
Gelatina (0.02 g/ml)	0.45 ml
Agua bidestilada	1.225 ml
TEMED	0.005 ml
Persulfato de amonio (100 mg/ml)	0.01 ml

b) Gel concentrador al 4 %

Acrilamida-bisacrilamida* (30 %)	0.21 ml
4X Tris-HCl pH 6.8***	0.417 ml
Agua bidestilada	1.017 ml
TEMED	0.0016 ml
Persulfato de amonio (100 mg/ml)	0.0083 ml

* Disolución de acrilamida/bisacrilamida al 30 %. Disolver 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida en 80 ml de agua bidestilada. Aforar la disolución a 100 ml y filtrar a través de una membrana con poros de 0.22 μ m. Guardar a 4 °C en un frasco protegido de la luz.

Preparación de la muestra y condiciones de corrida

La cruzipaina se mezcla en una proporción 1:1 con el amortiguador de muestra sin mercaptoetanol y se deposita en los carriles respectivos de los geles. La corrida de electroforesis se realiza a 130 volts a 4 °C durante 45 minutos aproximadamente en el amortiguador de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1 %)

APENDICE VI

Western blot

Para realizar la técnica de Western blot se usa la cámara Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad. Primero se corren las muestras en un gel de electroforesis al 12% de acrilamida, como se indica en el apéndice IV. Después las proteínas separadas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Schleier & Schuell # cat. 401396) usando un amortiguador de transferencia (Trizma base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20 %). Para esto se monta el cassette de la cámara de transferencia en forma de emparedado, colocando los siguientes elementos en el siguiente orden: un papel filtro, una esponja, el gel, la membrana de nitrocelulosa, otro papel filtro y finalmente otra esponja. Al montar el cassette hay que tener cuidado que no se formen burbujas dentro del mismo. El cassette se coloca dentro de la cámara de transferencia, asegurándose que la membrana de nitrocelulosa quede hacia el electrodo positivo. En seguida se introduce la unidad de enfriamiento con hielo y la transferencia se realiza a 100 volts durante 1 hora. Al termino de la transferencia la membrana se bloquea en una disolución de leche descremada (Sveltes) al 10 % disuelta en PBS, durante 1 hora a 37 °C. Después se agrega el primer anticuerpo diluido (según sea el caso), en la disolución bloqueadora y se incuba 2 horas con agitación a temperatura ambiente. La membrana se lava tres veces en una disolución de lavado (PBS-tween 20 al 0.1 %). Después se agrega el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa diluido 1/2000 en la disolución de lavado y se incuba 2 horas con agitación a temperatura ambiente. La membrana se lava de nuevo tres veces en la disolución de lavado y finalmente se añade el sustrato de peroxidasa para revelar.

El sustrato de la peroxidasa se prepara disolviendo 1 mg de diaminobenzidina con 33 µl de H₂O₂ al 30 % en 2 ml de PBS 1X. Este sustrato se usa inmediatamente.

APENDICE VII

Producción de anticuerpos monoclonales.

Fusión.

1. El mismo día de la fusión, se prepara una disolución de polietilenglicol 1550 (PEG) (Serva) al 41 % en medio D-MEM sin SFB. El PEG se funde en baño María a 56 °C y después se diluye en el medio. Esta disolución se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.22 µm. También se prepara el medio D-MEM-HAT, agregando al medio D-MEM: 150 µg/l de gentamicina (Schering-Plough), 13.6 µg/ml de hipoxantina, 8.8 µg/ml timidina, 1 µg/ml de aminopterina A y 20 % de SFB .
2. Las células de mieloma Sp2/0 se cuentan, se lavan 2 veces con medio D-MEM sin SFB, centrifugando a 400 x g durante 5 minutos entre lavados y se ajustan a 2.5×10^6 células/ml de medio D-MEM sin SFB.
3. Un ratón inmunizado con cruzipaina se sacrifica y se le extrae el bazo. El bazo se coloca en una caja petri estéril para quitarle tejidos extraños y grasa. Después el bazo se transfiere a otra caja petri con 7 ml de medio D-MEM sin SFB a 37 °C y se desgarran, con ayuda de unas pinzas estériles, para separar las células. Los 7 ml de medio con las células se pasan a un tubo de centrifuga estéril de 15 ml y se mantienen en hielo durante 5 minutos para que restos de tejido grandes vayan al fondo del tubo. El sobrenadante se transfiere a otro tubo limpio y estéril de 15 ml y se centrifuga a 400 x g durante 5 minutos. Las células se resuspenden en 10 ml de medio D-MEM sin SFB y se mezclan con 10 ml de la suspensión de células Sp2/0.

4. Esta mezcla celular se centrifuga a 400 x g durante 5 minutos y se retira el sobrenadante con una pipeta. El botón celular se hace menos compacto golpeando el tubo ligeramente con la palma de la mano.
5. A la mezcla de células se le adicionan 1.5 ml de la disolución de polietilenglicol (mantenida a 37 °C) escurriéndola gota a gota por las paredes del tubo y girando el tubo al mismo tiempo. La adición total se hace en 2 minutos y el tubo se continúa girando durante 1 minuto más.
6. Enseguida se adicionan lentamente 5 ml de medio D-MEM sin SFB (mantenido a 37 °C) escurriéndolo por las paredes del tubo, en un lapso de 5 minutos. A continuación se agregan de la misma forma 10 ml de medio D-MEM sin SFB durante 5 minutos y finalmente se añaden otros 15 ml de medio a lo largo de 5 minutos más.
7. La suspensión celular anterior se centrifuga durante 5 minutos a 400 x g y se desecha el sobrenadante. El botón celular se golpea suavemente para que se haga menos compacto y se resuspende en 45 ml de medio D-MEM-HAT.
8. Once ml de esta suspensión celular se toman con pipeta y se distribuyen en cajas para cultivo de 96 pozos (COSTAR), colocando (3 gotas en cada pozo).
9. Las células se incuban a 37 °C sin ser observadas durante 3 días.
10. Posteriormente, cada tercer día se retira el medio de cultivo de cada pozo, teniendo cuidado de no llevarse las células y se agrega medio D-MEM-HAT.

Selección de Hibridomas.

Para identificar los hibridomas productores de anticuerpos anticruzipáina, se llevaron a cabo varias selecciones a través de un ensayo de ELISA como se indica a continuación:

1. Placas de 96 pozos para ELISA se recubren con extracto total de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Querétaro), empleando 1 µg de proteína total por pozo en un volumen final de 100 µl de amortiguador de carbonatos pH 9.6. Las placas se dejan incubando con el extracto durante 2 horas a 37 °C o bien toda la noche a 4 °C.

2. La placa sensibilizada (cubierta de antígeno) se lava 3 veces con 200 µl /pozo de PBS-Tween-20 al 0.05 %.

3. La placa se bloquea con 250µl/pozo de gelatina al 0.5 %, disuelta en PBS y se incuba 1 hora a 37 °C o bien toda la noche a 4 °C.

4. A la placa sensibilizada, se agregan por duplicado 100 µl del sobrenadante de cada hibridoma. También se añaden, como control positivo, un suero de ratón infectado con *T. cruzi* en fase crónica de la infección (92 días post-infección) o un suero de ratón inmunizado con cruzipáina, ambos diluidos 1/100 en PBS-Tween al 0.05 %; y como control negativo, un suero de ratón preinmune. La placa se deja incubando 2 horas a 37 °C o bien toda la noche a 4 °C.

5. La placa se lava 3 veces con 200 µl/pozo de PBS-Tween-20 al 0.05 % durante 5 minutos cada lavado.

6. Se agregan 100 µl/pozo del segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa) diluido 1/1000 en PBS-Tween-20 al 0.05 %. La placa se incuba 2 horas a 37 °C y después se lava 3 veces con PBS-Tween-20.

7. La placa se revela agregando 100 µl de sustrato (4 µg de ortofenilendiamina y 4 µl de H₂O₂ en 5 ml de agua bidestilada más 5 ml de amortiguador de citratos-fosfatos pH 5.0) por

pozo. La reacción se deja correr el tiempo necesario (aproximadamente 7 minutos) para que aparezca color, teniendo cuidado de que el control negativo no comience a ponerse amarillo. La reacción se detiene agregando 50 μ l de ácido sulfúrico 2.5 N por pozo.

8. La placa se lee inmediatamente en un lector para placas de ELISA a 490 nm.