

EVALUACION DE LA POSIBLE REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS CONTRA LA HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA CON MOLECULAS DE INVASION DEL *TRIPANOSOMA CRUZI*.

Investigadores:

Hiller Correa Heinz Georg

Merino Jorge Andrés

Ortiz Tobón Juan Felipe

Vélez Jaramillo Santiago

Estudiantes de medicina IX semestre CES.

Asesora técnica: Diana Isaza

RESUMEN :

La enfermedad de Chagas, es una enfermedad parasitaria producida por el hemoflagelado *Trypanosoma Cruzi*, que goza de una importancia creciente en nuestro medio. Se calcula que hay unos 1.6 millones de colombianos afectados por la enfermedad. Es transmitida por artrópodos de la familia Reduviidae y en Colombia el más importante es el *Rhodnius prolixus*. La importancia en el estudio de esta patología radica en la gran morbimortalidad de la forma crónica de la enfermedad, que se manifiesta principalmente cómo una miocardiopatía dilatada, y con dilatación de diversos componentes del aparato digestivo. Actualmente no se posee vacuna efectiva contra el parásito. El presente estudio pretendía evaluar la posibilidad de una reacción cruzada entre anticuerpos contra la hemaglutinina del virus de la influenza y la transialidasa de *T. Cruzi*, basándonos en la aparente similitud entre ambas moléculas, que radica principalmente en la capacidad de reconocer moléculas de ácido siálico, ser trímeros con un tallo central, y la similitud entre diversas secuencias de aminoácidos principalmente en la zona catalítica. Para el estudio se utilizaron cinco ratones de la cepa Balb/c que se vacunaron con 3 μ gms de tres diferentes hemaglutininas del virus de la influenza. La evaluación se realizó por medio de las técnicas del Dot blot y la inmunofluorescencia indirecta, como antígenos se usaron parásitos de la cepa Tulahuen. Se obtuvieron conclusiones contradictorias entre ambos métodos, siendo positivos para reacción cruzada en el Dot blot, y negativos en la evaluación por inmunofluorescencia indirecta. Se recomiendan estudios con métodos más sensibles para evaluar los resultados.

PALABRAS CLAVES: Tripanosoma Cruzi, Chagas, Inmunización, Vacuna, Virus influenzal.

SUMMARY :

Chagas' disease, is a parasitic sickness caused by the hemoflagellate *Trypanosoma cruzi*, who is increasing in importance in our country. It is believed that about 1.6 million Colombians are affected buy this disease. It is transmitted by arthropods of the family Reduviidae and in Colombia, the most prevalent is *Rhodnius prolixus*. The importance of the present study relies in the great morbidity and mortality caused by the chronic pathologic process, which is principally manifested as dilated cardiomiopathy, and enlargement of diverse components of the digestive tract. At the present there is no effective vaccine for the disease. The present study intended to evaluate the possible cross-reaction between antibodies raised against viral influenza hemagglutinin and *T. cruzi*'s transialidase, based on apparent similarities of both molecules, which are principally, the capacity to recognize molecules of sialic acid, both are trimers, and the similarities in aminoacidic sequences located in the catalitic portions.

The study used five Balb/c mice, to be vaccinated with 3 μ gms of three different influenza virus hemagglutinins. Reactivity was measured with Dot-Blot and indirect immunofluorescence techniques, the parasites used were of the Tulahuen class. Results where contradictory for both methods, as being positive for Dot-Blot, but negative for the indirect immunofluorescence. We recommend further studies with more sensitive methods to analyze these results.

KEY WORDS: Tripanosoma Cruzi, Chagas disease, Inmunización, Influenzal vaccine.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis ampliamente distribuida en el continente americano, calculándose de 16 a 18 millones el número de infectados y en 90 millones la población expuesta al riesgo de contraer la enfermedad (1).

En Colombia la enfermedad de Chagas es un problema de salud pública en particular en la zona oriental del país en donde el índice de infestación de viviendas con triatomíneos es 100 veces mayor que en la región occidental (2,3). La infección de los vectores con *T. cruzi* o *T. rangeli* y la prevalencia de transmisión en humanos ocurre en áreas ubicadas por debajo de los 1700 metros con excepción de la costa Atlántica, Pacífica y el "Bosque tropical Húmedo" en el suroriente de Colombia. La tasa de transmisión más alta se ha encontrado en Arauca, Boyacá, Casanare, Cundinamarca, Guainía, Huila, Meta, Norte de Santander, Santander, Tolima y Vichada. Nuevos focos de vectores infectados se han encontrado en las laderas de la Sierra Nevada de Santa Marta y el sur del Putumayo.(4)

Aún en Colombia se considera la enfermedad de Chagas una patología exótica, a pesar de que en 1975 se estimó que aproximadamente 1.6 millones de personas se encontraban infectadas (4). La O.M.S. estima que en Colombia un total de 1.3 millones de individuos están infectados y que alrededor de 3.6 millones de pobladores están bajo riesgo de adquirir la infección, teniendo en cuenta la distribución de los vectores. Un estudio reciente mostró altos índices (2.3%) de seroprevalencia en donantes de sangre a nivel nacional. El ambiente más propicio para la transmisión del *T. cruzi* por parte del vector son las viviendas de adobe recubiertos parcialmente en su interior con cartón, papel y techo de palma y paja (4).

La morbimortalidad asociada a esta enfermedad es muy significativa. Durante la fase aguda puede haber extensa miocarditis y/o encefalitis que causan la muerte, especialmente en poblaciones infantiles (5). Mientras que la morbimortalidad asociada a la forma crónica de la enfermedad se asocia a alteraciones de la conducción eléctrica del corazón o cardiopatía hipertrófica dilatada, y a la patología dilatada de varias vísceras huecas principalmente el esófago y el colon (5,6).

Las medidas de control de la diseminación de la infección se han basado en el mejoramiento de las viviendas, el rociamiento de las mismas con insecticidas de acción residual y la monitorización serológica de la infección en donantes de sangre (7,8). Sin embargo, debido a la inmensidad del reservorio natural del parásito y las precarias condiciones socioeconómicas imperantes en algunas zonas endémicas, estas medidas no permitirán erradicar por completo la infección de poblaciones humanas, siendo necesario complementarlas con fármacos que se puedan usar en esquemas profilácticos.

A pesar , de estar tan ampliamente distribuida, aún no se ha encontrado una medida eficaz para contrarrestar esta enfermedad, y mucho menos, una vacuna para proteger a la población, en lo cual están implicados varios factores, entre ellos, la cantidad de mecanismos con los cuales este parásito logra evadir la respuesta inmune, por consiguiente es necesario un mayor conocimiento acerca de su estructura y de su interacción con el hospedero durante la fase aguda.

Una de las mayores dificultades para la realización de una vacuna, es que no hay claridad sobre cual o cuales de los antígenos presentes en el parásito participa(n) en el desarrollo de la autoinmunidad, característica de la fase crónica de la enfermedad, por lo tanto la creación de una vacuna lleva implícito el riesgo de iniciar *per se* el proceso autoinmune.

El presente estudio pretende ampliar los conocimientos básicos sobre la inmunología del parásito, y proporcionar una base sobre la cual trabajar para así desarrollar un activador inmune, que prevenga los efectos a largo plazo de la infección como son las alteraciones de la motilidad de vísceras huecas, la miocardiopatía y el aneurisma apical del ventrículo izquierdo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades.

2.1.1. Etiología.

La Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es producida por *Trypanosoma cruzi* un parásito protozooario hemoflagelado perteneciente a la familia *trypanosomatidae*, género *trypanosoma*, subgénero *schizotrypanum* y grupo Estercoraria, transmitida por insectos de la familia Reduviidae ; los parásitos infectantes salen de las deyecciones del vector y pueden introducirse en el organismo a través del orificio de la picadura, heridas, excoriaciones de la piel o atravesando directamente la mucosa ocular, nasal o bucal.(9,11)

2.1.2.Epidemiología.

La enfermedad de Chagas es una zoonosis de amplia distribución geográfica en América Latina. Constituye un problema de salud pública principalmente en Brasil, Venezuela, Chile, Argentina, Uruguay, Bolivia, Perú y en algunos países de Centro América. En Colombia la distribución de *T. Cruzi* y sus vectores, está localizada especialmente a lo largo de la cordillera oriental, Magdalena medio, Guajira, Llanos orientales y zonas selváticas del oriente Colombiano, en zonas endémicas entre el 27-80% de la población son positivos en estudios serológicos. Afecta por igual ambos sexos y a individuos de todas las razas.

Las especies de mayor importancia epidemiológica son el *Triatoma infestans* en Argentina, Bolivia, Brasil y Chile; *Pastronylus megistus* y *Triatoma sórdida* en Brasil; *Rhodnius prolixus* en Venezuela y Colombia; *Triatoma dimidata* en América Central y el complejo de especies de *Triatoma proctata* en los Estados Unidos de América(1).

El reservorio natural de *T. cruzi* es enorme, encontrándose en más de 100 especies de mamíferos pertenecientes a diferentes órdenes (marsupiales, endentata, chiroptera, carnivora, logomorpha rodentia y primate) (12). Los humanos son huéspedes ocasionales cuyo compromiso en el ciclo no es necesario para la perpetuación del parásito en la naturaleza, lo que la convierte en una zoonosis difícil de erradicar.

Además de la transmisión mediada por el insecto vector, la enfermedad puede también ser transmitida por medio de transfusiones sanguíneas, transplante de órganos, leche materna, infección transplacentaria, accidentes de laboratorio e ingestión por vía oral .

2.1.3 Ciclo Biológico de *T. Cruzi*.

El insecto contrae la infección al tomar sangre contaminada con tripomastigotos circulantes. En el intestino medio del vector, los parásitos se transforman en epimastigotos (formas replicativas en el invertebrado) y en el intestino posterior en tripomastigotos metacíclicos (formas infectantes). Los tripomastigotos metacíclicos depositados en las deyecciones de insecto infectan las células del huésped mamífero en donde se transforman en amastigotos (formas replicativas intracelulares) y posteriormente en tripomastigotos tisulares . Los

tripomastigotos que alcanzan la sangre periférica completan así el ciclo biológico infectando al insecto vector (7,13,14).

2.2. Respuesta inmune en contra del parásito :

2.2.1 Inmunobiología de la infección del hospedero invertebrado.

La infección del insecto vector por *T. cruzi* es una infección intestinal que no afecta la sobrevivencia del insecto. Esto contrasta con la infección del vector con otro tripanosomátido relacionado con *T. cruzi*, *T. rangeli*, un parásito que también infecta al hombre y que infecta al vector durante una toma de sangre. Este parásito penetra la pared intestinal del insecto y migra hacia las glándulas salivares causándole una significativa mortalidad.

2.2.2. Inmunobiología de la infección del hospedero vertebrado.

Dos características de *T. cruzi* lo convierten en un parásito notable: la capacidad de invadir múltiples tipos de células del huésped vertebrado y la capacidad de evadir los sistemas de citotoxicidad intracelular, escapando de la vacuola fagocítica para residir y multiplicarse en el citoplasma celular.

Las principales adaptaciones que ocurren durante la metacicloogénesis y que le permiten a los tripomastigotos metacíclicos sobrevivir en el huésped vertebrado, son la adquisición de una superficie celular menos activadora de la vía alterna del complemento, la adquisición de una molécula que acelera la disociación de la C3 convertasa del complemento y la adquisición de invasinas que le permite infectar células no fagocíticas y le permite escapar de las vacuolas endocíticas o fagocíticas para residir en el citoplasma celular (12,15).

El control temprano de la infección por *T. cruzi* parece ser independiente de anticuerpos ya que, aún cuando anticuerpos específicos de IgG e IgM son sintetizados durante la primera semana de infección, estos no matan al parásito, y los anticuerpos protectores solo aparecen a las 4 semanas de infección(12). De hecho es posible que exista en las fases iniciales una respuesta inmune humoral intensa dirigida contra un epítipo repetido en tandem presente en una enzima de superficie de los tripomastigotos tisulares. Esta respuesta se ha sugerido hace parte de un esquema de evasión inmune conocido como la "cortina de humo " que impediría la aparición de anticuerpos protectores durante las fases iniciales de la infección.

A pesar de la clara participación de los anticuerpos en la protección del hospedero, y que experimentos de transferencia celular han demostrado que el control de la parasitemia depende tanto de células T como de células B, la esplenectomía no afectó significativamente el curso de la infección cuando se realizó antes ó durante la infección (12).

No existe resistencia natural a *T. cruzi* en humanos, de manera que la existencia de individuos no infectados en zonas endémicas se debe a otras variables epidemiológicas (10). Se han reportado también anticuerpos

naturales en contra de un componente sacarídico de la membrana de los tripomastigotos, el epítotope α -Gal.

Aún cuando existe evidencia de respuesta inmune humoral y celular en individuos y animales infectados, no existe evidencia que estas respuestas curen la infección. Sin embargo esta respuesta mantiene un balance en la respuesta hospedero-parásito que puede durar toda la vida, previniendo una parasitemia aguda, ya que varios tipos celulares muestran ser efectivos contra los tripomastigotos cubiertos de anticuerpos, estos son lisados o inactivados por eosinófilos, neutrófilos, granulocitos, células mononucleares, y plaquetas (3).

2.3. Moléculas de invasión del *Tripanosoma cruzi*.

Los tripomastigotos de *T. cruzi* poseen una serie de proteínas de superficie, que tienen la misión de fijar el parásito a los tejidos del hospedero, y posteriormente, facilitar la entrada de este al citoplasma celular, entre estas moléculas proteicas se encuentran la transialidasa, la penetrina y una molécula reconocedora de fibronectina.

La transialidasa de *T. cruzi*, es una enzima encargada de catalizar la transferencia de residuos de ácido siálico de las glicoproteínas y glicolípidos del huésped a la superficie de los tripomastigotos tisulares (17), liberada al medio extracelular por medio de una fosfolipasa C. Es capaz de sialilar y desialilar moléculas en todo el organismo, cambiando la vida media y función de diversas moléculas y células (20,21) y exponiendo diversos criptoepítotos al sistema inmune(21). Los niveles de actividad de la transialidasa son altos en las formas infectantes (tripomastigotos celulares), bajos en las formas de diferenciación presentes en el insecto vector (tripomastigotos metacíclicos y epimastigotos) y no se detecta actividad biológica en las formas de replicación intracelular (amastigotos)(20). Los residuos de ácido siálico son transferidos activamente a partir de residuos exógenos sialilados a la superficie aceptora del parásito, por medio de la actividad de esta *trans*-glicosidasa y no utiliza ácido siálico-CMP o ácido siálico libre como donador.(24)

El papel de la transialidasa resulta paradójico, puesto que el uso de anticuerpos monoclonales contra dicha molécula incrementa la infectividad del tripomastigote in vitro, por otra parte, la adquisición de residuos de ácido siálico para la supervivencia del parásito es crítica, como sugieren los hallazgos de que tripomastigotes desialilados son lisados por la vía alterna del complemento y rápidamente son fagocitados por macrófagos, además, la actividad biológica del factor de virulencia de *T. cruzi* es dependiente del estado de sialización ejercido por dicha *trans*-glicosidasa y como sugieren los hallazgos de crecimiento en cultivos tisulares de tripomastigotes en ausencia de donadores de ácido siálico son incapaces de infectar células de mamíferos in vitro. (23,26)

La comparación estructural de la transialidasa del *T. cruzi*, con la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza muestra una significativa homología estructural, entre los residuos 271- 352 del parásito y el sitio de unión al a. siálico por parte de la hemaglutinina del virus de la influenza (10). Interesantemente, no se

detectan homologías significativas entre la neuraminidasa del virus de la influenza y la transialidasa del *Trypanosoma cruzi*.

Los estudios en cristalografía de la hemaglutinina en presencia del ligando y análisis comparativo de diferentes aislados naturales del virus han permitido identificar los residuos involucrados en la unión al a. siálico. El sitio de unión es un bolsillo localizado en el extremo distal de la molécula y compuesta de una cadena de aminoácidos (tyr 98, his 183, glu 190, trp 153, leu 194) que esta ampliamente conservada en las numerosas cepas del virus. Hay otros residuos conservados subyacentes, que estabilizan la arquitectura de la posición sin interactuar con el receptor. En contraste, el perímetro de la superficie del sitio de unión esta conformada por residuos aminoacídicos variables.(27)

Un análisis detallado del mapa inmunológico de dicha molécula revela que la mayoría de los epítopes que generan una respuesta inmune se encuentran cerca al sitio de unión del a. siálico, dificultándose dicha respuesta. (27)

La hemaglutinina del virus de la influenza es una molécula que esta sometida a un grado considerable de variabilidad antigénica sin perder su afinidad por residuos de a. siálico.

Ambas moléculas son trimeros, con un tallo central que permiten la accesibilidad a los residuos sacarídicos. La transialidasa de *T. cruzi* posee en este " tallo " una serie de péptidos repetidos en tandem que desviarían la respuesta inmune del sitio catalítico a esta zona donde la reacción es no protectora ; las hemaglutininas virales carecen de dichos péptidos. En el extremo se identifica una conformación globular, en donde se encuentra el sitio catalítico, hecho confirmado en el caso viral y supuesto en el del parásito ; las respuestas inmunes que bloquean la infección estarían radicadas en este punto ya que la inmunidad protectora inducida por inmunización con HA y/o NA del virus de la influenza esta relacionada con la inducción de anticuerpos capaces de neutralizar la interacción de estas moléculas con los residuos de a. siálico.

La transialidasa es un sistema enzimático polimórfico conformada por oligómeros constituidos por unidades de 200, 150 y 120 kDa.(28). Una de estas subunidades fue clonada a partir de una librería genómica con el anticuerpo monoclonal TCN-1 (18). Este gen codifica a una proteína de 1162 aminoácidos. Tres dominios se reconocen en la secuencia : un dominio amino-terminal (aminoácidos 1-588), un dominio formado por 44 péptidos repetidos en tandem (aminoácidos 589-1127) y un segmento carboxilo-terminal hidrofóbico cuya secuencia es compatible como parte de un sistema de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (aminoácidos 1128-1162).

Debido a esta afinidad estructural, es probable que anticuerpos dirigidos en contra de la porción catalítica de la hemaglutinina del virus de la influenza, reaccionen con la transialidasa de *T. cruzi*, pues es de esperarse una restricción conformacional evolutiva entre dichas moléculas reconocedoras de ácido siálico, hecho que estaría respaldado por la similitud en el dominio amino-terminal de la transialidasa, con las sialidasas bacterianas estudiadas hasta la fecha.(18, 25)

La penetrina es la principal invasina de *T. cruzi*, es una lectina de 60 kDa, restringida al estadio invasivo del tripomastigote, que tiene la propiedad de fijar heparina, heparán sulfato y además ácido siálico. El sistema existente entre la transaminidasa y la penetrina se puede relacionar al mecanismo de invasión hemaglutinina - neuraminidasa del virus de la influenza, a tal punto de que ambas patologías se asemejan en aspectos del cuadro clínico en la fase aguda. Por su capacidad reconocedora de ácido siálico es otro posible candidato a reacción cruzada con moléculas afines a ácido siálico de otros organismos.

3. HIPÓTESIS.

Anticuerpos contra la hemaglutinina y/o la neuraminidasa del virus de la influenza, producidos mediante la inmunización con vacuna antigripal, en ratones, pueden reaccionar con estructuras de membrana de epimastigotes de *Tripanosoma Cruzi*, con capacidad de reconocer residuos de ácido siálico.

4. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la posible existencia de una reactividad inmunológica cruzada entre el virus de la influenza y parásitos de *T. cruzi*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Observar anticuerpos tipos IgM y/o IgG en contra de la hemaglutinina del virus de la Influenza adheridos a la membrana del epimastigote de *T. cruzi*, por medio de inmunofluorescencia indirecta.

6. METODOLOGÍA.

1. **Tipo de estudio:** Observacional.
2. **Población a estudiar:** Sueros de ratas pre y post-inmunización con la vacuna antigripal.
3. **Muestra:** Cinco ratones, los cuales se sangraron antes, y tres semanas después, de la inmunización con la vacuna antigripal.

6.4 .Técnicas y procedimientos :

6.5. 1. Parásitos :

Se obtuvieron epimastigotos a partir de cultivos bifásicos en sangre de conejo al 8%, en medio NNN.

6.4.2. Extractos de parásitos:

A partir de epimastigotos se cultivaron tripomastigotos tisulares en medio MEM.

Los parásitos fueron centrifugados a 3000 r.p.m. durante 3 min., lavados en amortiguador salino-fosfato, ph de 7.2 , resuspendidos en PBS, y sometidos a 3 ciclos de congelamiento- descongelamiento . El material fue centrifugado a 10000 r.p.m. por 5 minutos. El sobrenadante (cd), fue recolectado y el precipitado resuspendido en 1 ml de Tritón-X 100 al 1% en PBS, incubado durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 10000 r.p.m. por 5 minutos, el sobrenadante (Tx), se recolectó y el precipitado se resuspendió en 1ml de SDS al 1% en PBS, se incubó por 1 hora a temperatura ambiente.

Seguidamente se centrifugó, se guardó el sobrenadante (SDS) y se resuspendió el precipitado en 1 ml de 2 Mercaptoetanol al 5%, se incubó a 100° C por 10 minutos .Finalmente se recolectó el sobrenadante después de centrifugación (2me).

Cada una de las fracciones fue precipitada con tres volúmenes de acetona a - 20 C° durante 12 horas.

6. 4.3. Preparación de la hemaglutinina :

Se usó la preparación comercial del virus de la influenza humana Agrippal® S1 que contiene 15 μ gms de hemaglutinina de tres cepas distintas :

Cepa A /Wuhan/359/95 (H3/N2).

Cepa A /Bayern/7/95 (H1/N1).

Cepa B /Beijing/184/93.

Se vacunaron cinco ratones de la cepa Balb/c con 3 μ gms de la vacuna, dosis única por vía subcutánea previa aspiración para evitar inyección intravascular. Se comprobó la efectividad de la vacuna realizando Dot blot a las tres semanas post vacunación.

6.4.4. Preparación del plasma :

Se obtuvo sangre a partir de la cola de ratones tomada con micropipeta de 20 μ lts, y esta mezclada con 20 μ lts de EDTA. Posteriormente se procedió a centrifugar a 3000 r.p.m. durante 4 minutos y luego retirado el sobrenadante. Los plasmas fueron congelados hasta su posterior utilización.

6.4.5. Dot Blot

Se colocó en papel de nitrocelulosa 20 μ l de las preparaciones cd, tx, sds, 2me, trp, también se colocó a igual volumen preparado comercial de la hemaglutinina/neuraminidasa del virus de la influenza 30 μ g/mlt. Las tirillas se incubaron con 20 μ l de los siguientes sueros: Suero normal de ratón (SNR), suero preinmune de ratón, suero de ratón vacunado con el preparado del virus

de la influenza y suero de humano infectado con *T. cruzi* cepa Ns. Luego se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron las tirillas con 20 μ l de suero antiratón y suero anti humano (respectivamente) biotinilado por 1 hr a temperatura ambiente. y se reveló con el sistema peroxidasa Avidina -Biotina.

6.4.6. Inmunofluorescencia indirecta:

Se preparó antígeno de *T. cruzi* a razón de 40 parásitos por campo en doce pozos (cinco para suero pre inmune, cinco para suero post inmune, uno para el control positivo y otro para el control negativo del método). Se adicionaron sueros puros a razón de 5 μ lts por pozo y se incubaron en cámaras húmedas a 37 grados centígrados por 30 minutos. Posteriormente se realizó lavado en cajas de Coplin 2 veces con PBS pH 7.2 por 5 minutos y una vez con agua destilada.

Se realizó dilución del conjugado de anticuerpos (FITC conjugated goat Anti-mouse IgG γ -chain specific) 1 :64 según sugerencia del fabricante, en solución de trabajo de Azul de Evans. Se agregan 20 μ lts del conjugado a cada pozo y se incuban a 37 grados centígrados en cámara húmeda por treinta minutos, acto seguido se lavaron con PBS pH 7.2 en dos ocasiones en cámara de Coplin y luego con agua destilada.

Finalmente se montaron las placas con glicerol 9 ml en 1 ml de PBS, para ser observadas con lámpara y filtros para isotiocinato de fluoresceína.

7. RESULTADOS.

1. Dot blot.

La tirilla incubada con el suero anti humano (que se utilizó como control positivo) mostró una fuerte reacción a los extractos de tx, sds y 2-me de tripomastigotes. También hubo fuerte reacción hacia el extracto de HA/NA del virus de la influenza, hecho que está a favor de una reacción cruzada.

La tirilla incubada con suero preinmune de ratón, no mostró ninguna reacción hacia los extractos de parásito, pero sí una leve coloración de la muestra con el extracto de HA/NA. La tirilla incubada con suero normal de ratón, no mostró ninguna reacción a cualquiera de los extractos.

La tirilla incubada con suero de ratón vacunado con extracto de HA/NA mostró leve reacción a el extracto cd, con una mejor respuesta a los extractos sds, tx y 2-me. Como control de la adecuada vacunación del ratón, se observó una buena reacción hacia el extracto de HA/NA (ver tabla).

7.2 Inmunofluorescencia indirecta.

Bajo microscopio equipado con lámpara de filtro para isotiocinato de fluoresceína (FITC) se observaron los pozos preparados previamente según

especificaciones descritas antes. No se aprecia reacción cuantificable, a la dilución realizada (1:64), sobre los epimastigotes previamente fijados sobre pozos de inmunofluorescencia, determinada por la presencia de la coloración verde manzana alrededor del parásito. Se aprecian solamente parásitos de color rojizo. La prueba para determinar la validez del método resultó positiva (Suero de ratón inmunizado con antígeno de *T. cruzi*, más conjugado anti inmunoglobulina de ratón sobre parásitos en la placa).

8. CONCLUSIONES.

Los hallazgos obtenidos durante la realización de la inmunofluorescencia, nos indican que no se presenta reacción cruzada entre anticuerpos contra hemaglutinina o neuraminidasa del virus de la influenza, y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

La no reactividad pudo haber sido causada por :

1. Que no exista realmente reactividad cruzada entre moléculas de superficie de *T. cruzi* y del virus de la influenza.
2. Que la dosis de vacuna dada a los ratones no halla ocasionado el suficiente número de anticuerpos, a pesar de que los resultados del Dot blot sean positivos cualitativamente para ellos .
3. Que la dilución del conjugado halla sido excesiva para nuestro estudio (1 :64) a pesar de las recomendaciones técnicas del laboratorio.
4. Que el realizar el estudio con epimastigotes (con bajos niveles de trans-silalidasa) y no con tripomastigotes (con alto contenido de trans-silalidasa), halla dado falsos negativos.

Sin embargo los resultados del DOT-Blot, parecen indicar todo lo contrario. Las reacciones a los controles negativos, contrastan notablemente con las reacciones mostradas en la tirilla que fue incubada con el suero del ratón vacunado con el extracto HA/NA de virus de la influenza. Todo parece indicar que sí hubiera reacción cruzada entre las dos moléculas anteriormente descritas.

Hay que tener presente que los sueros pre-inmunes mostraron una leve reactividad ante el antígeno HA/NA del virus de la Influenza, lo que sugiere dos posibles explicaciones : la primera es que los ratones hallan tenido contacto previo con el virus o que existiese fijación inespecífica de las Igs del ratón con las moléculas de HA y/o NA del virus de la influenza pero es poco factible ya que el llamado ratón normal, también habría presentado la misma reacción inespecífica.

Por el momento, solamente podemos especular acerca de estos resultados, ya que los dos métodos de laboratorio parecen contradecirse. Nuestra recomendación es llevar a cabo posteriores estudios que incluyan inmunofluorescencia con tripomastigotos tisulares, y Dot -blot con extractos purificados por métodos más específicos.

BIBLIOGRAFIA.

1. GINEBRA, Informe de Comité de Expertos de la OMS. Control de la Enfermedad de Chagas. s.e. España, Organización Mundial de la Salud (OMS), 1991. (OMS, serie de Informes Técnicos, No. 811)
2. ALESSANDRO, A., BARRETO, P., SARAVIA, N. y BARRETO, M. Epidemiology of *Trypanosoma cruzi* in the Oriental plains of Colombia. The international collaboration in Infectious Diseases Research Program, Centro Internacional de Investigaciones Medicas, Tulane University-Colciencias, A.A. 5390, Cali, Colombia and Facultad de salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia. 1984. pp. 12
3. HUDSON, I., GUHL, F., SANCHEZ, N. de, BRIDGE, D. , JARAMILLO, C. A., YOUNG, A. Longitudinal studies of the immune response of Colombia patients infected with *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. Department of immunology, St George's Hospital Medical School, Cranmer Terrace, London SW17 oRE, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, D.E., Colombia. 1987. pp. 12
4. CORNELIS J. MARINKELLE. Enfermedad de Chagas en Colombia. Revista Colombia de cardiología. 1997 ; 5 :350-354
5. COUSA, JOSÈ RODRIGUEZ. American Trypanosomiasis (Chaga's Disease), IN : WARREN, Kenneth S. y MAHMOUD, Adel A.F. Tropical and Geographical Medicine. 2 Ed. E.E.U.U., Mac. Graw-Hill, 1990. pp. 281-294
6. TAKLE, GARRY B. y SNARY, DAVID. South American trypanosomiasis (Chaga's Disease). IN: WARREN, KENNETH S. Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infection. 3a Ed. Boston, Blackwell Scientific Publication, 1993. pp. 213-228
7. DURANTE DE ISOLA E. y GONZALEZ CAPPA S. Vectores transmisores: triatomíneos "vincuchas". En Enfermedad de Chagas. Ruben Storino y Jose Milei. Mosby, Doyma Argentina S.A. Argentina 1994, pp. 41-50
8. SEGURA E., ESQUIVEL M., SALOMON O., SOSA STANI S., GOMEZ A., IBARRA F. & CHUIT R. Alternativas de control de la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en enfermedad de Chagas. Rubén Storino y José Milei. Mosby, Doyma Argentina S.A. Argentina 1994 pp. 31-40.
9. DE SOUSA W. Components of the cell surface of the trypanosomatids. Progress in Parasitology. 1989 Vol. 3. pp.. 87.
10. KIRCHOFF L. V. Chagas disease. American trypanosomiasis. A tropical disease now in the United States. New England Journal of Medicine 1993 Vol. 329, pp. 639-644.
11. BOTERO D., RESTREPO M. Parásitosis humanas. Segunda edición. CIB, Medellín, Colombia. 1992. Pg 191.

12. BRENNER Z. y KRETTLI A. U. Immunology of Chagas disease. Modern parasite Biology. Cellular immunological and molecular aspects. De. D.J. Wiler 1990 pp. 247-261
13. PEREIRA M.E.A. Cell biology of *T. cruzi* .IN: Modern Parasite Biology, cellular, Immunological and molecular aspects. Wyler D.J. ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco 1990, pp. 64-78
14. GONZALEZ CAPPA S. y DURANTE DE ISOLA E. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*. En enfermedad de Chagas. Rubén Storino y José Milei. Mosby, Doyma Argentina S.A. Argentina 1994, pp. 31-40
15. ZINGALES B. y COLLI W. *T. cruzi*. Interaction with host cells. Current Topics in Microbiology. 1985 pp. 117-129.
16. FREILIJ H. & STORINO R. Diagnóstico de laboratorio en enfermedad de Chagas. Rubén Storino y José Milei. Mosby, Doyma Argentina S.A. Argentina 1994 pp. 343-358
17. ZINGALES B., CARNIOL C., DE LEDERKREMER R.M. & COLLI W. (1987) Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology 26, 135.
18. PEREIRA, M.E.A., MEJIA J.S., ORTEGA-BARRIA E., MATZILEVICH D. & PRIOLI R.P.(1991) The *Trypanosoma cruzi* neuraminidase contains sequences similar to bacterial neuraminidases, YWTD repeats of the low density lipoprotein receptor, and type III modules of fibronectin. Journal of Experimental Medicine 174,179-191.
19. SIMCHON, S., JAN K-M. & CHIEN. (1988) Studies on sequestration of neuraminidase-treated red blood cells. American Journal of Physiology 254, H1167.
20. YEE JR.H.F., WEISS, J.N. & LANGER G.A. (1989) Neuraminidase selectively enhances transient Ca²⁺ current in cardiac myocytes. American Journal of Physiology 256, C126.
21. TITO E.H. & ARAUJO F.G. (1988) Serum neuraminidase activity and hematological alterations in acute human Chagas' disease. Clinical immunology and immunopathology pg.46,157.
22. PEREIRA M.E.A. (1983) A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. Science (Washington D.C) 219,1444.
23. KIPNIS TL, DAVID JR, ALPER CA, SHER A, DIAS DA SILVA W. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *trypanosoma cruzi* into activation of alternativa complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 1981 ; 78 :602-5.
24. PREVIATO JO. ANDRADE AFB, PESSOLANI MCV, MENDONCA-PREVIATO L. Incorporations of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. Mol Biochem Parasitol 1985 ; 16 :85-96.
25. ROGGENTIN P., ROTHE B., LOTTSPEICH F. & SCHAUER R. (1988) Cloning and sequencing of a *Clostridium perfringens* sialidase gene. FEBS Letter 238,31.
26. 26.E.A. .EDUARDO ORTEGA-BARRIA & MIERCIO PEREIRA. Entry of *trypanosoma cruzi* into Eukariotic Cell. Review , (M.E.A. Pereira, unpublished observations.). Infectious Agents and Disease 1 :136-145. 1992

- 27.27.WILEY AND SKEHEL 1987, ann rev. biochem. 56:365-94. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus.
- 28.28.PRIOLI R.P., MEJIA J.S., PEREIRA M.E.A. Monoclonal antibodies against *T. cruzi* neuraminidase reveal enzyme polymorphism, recognize a subset of trypomastigotes, and enhance infection in vitro. J. Immunol. 1990., 144 : 43-84.