



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ESTANDARIZACIÓN DE ENSAYOS INMUNOMÉTRICOS
PARA DETERMINAR LA REACTIVIDAD DE SUEROS
HUMANOS CON CALRETICULINA RECOMBINANTE DE
*Trypanosoma cruzi***

PAMELA ELISA WILLIAMS MONREAL

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

PROFESOR GUÍA: Dr. ARTURO FERREIRA VIGOUROUX

Fuente Financiamiento: Proyecto FONDECYT N° 1010930

**SANTIAGO, CHILE
2005**



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ESTANDARIZACIÓN DE ENSAYOS INMUNOMÉTRICOS
PARA DETERMINAR LA REACTIVIDAD DE SUEROS
HUMANOS CON CALRETICULINA RECOMBINANTE DE
*Trypanosoma cruzi***

PAMELA ELISA WILLIAMS MONREAL

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: Dr. ARTURO FERREIRA
PROFESOR CONSEJERO: Dr. FERNANDO FREDES
PROFESOR CONSEJERO: Dr. CLAUDIO ZÚÑIGA

SANTIAGO, CHILE
2005

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
II.1 Historia	5
II.2 Epidemiología	7
II.3 La Enfermedad	8
II.4 Transmisión	10
II.5 El vector y su distribución geográfica	12
II.6 Tratamiento	14
II.7 Control	15
II.8 Métodos diagnósticos	16
II.9 <i>Trypanosoma cruzi</i> : taxonomía y morfología	17
II.10 Ciclo biológico	18
II.11 Respuesta inmune	20
II.12 Calreticulina	22
III. HIPÓTESIS	24
IV. OBJETIVOS	25
General	25
Específicos	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS	26
V.1 Detección de anticuerpos humanos de individuos seronegativos y seropositivos contra extracto completo de epimastigotes	26

V.2 Estandarización de un ELISA para la detección de anticuerpos humanos de individuos seronegativos y seropositivos contra TcCRT recombinante (rTcCRT)	28
V.3 Estandarización de un ELISA para la detección de anticuerpos humanos de individuos seronegativos y seropositivos contra rTcCRT, capturada con un anticuerpo monoclonal	30
V.4 Validar el uso de anticuerpos policlonales anti rTcCRT, como agentes de captura de la proteína recombinante y de su contraparte nativa (nTcCRT)	31
V.5 Definir el valor de anticuerpos policlonales anti rTcCRT, como fuente de captura antigénica en ELISA	33
V.6 Relación entre el ensayo de ELISA directo con extracto completo de epimastigotes y el ELISA de captura de rTcCRT, con el anticuerpo monoclonal E2G7	34
VI. RESULTADOS	35
VI.1 Reactividad contra extracto completo de epimastigotes de sueros humanos seronegativos y seropositivos a <i>T. cruzi</i>	35
VI.2 Estandarización de un ELISA directo para la detección de anticuerpos humanos seronegativos y seropositivos contra TcCRT recombinante (rTcCRT)	36
VI.3 Estandarización de un ELISA para la detección de anticuerpos humanos reactivos con rTcCRT	38
VI.4 Validación del uso de anticuerpos policlonales anti rTcCRT, como	

agentes de captura de la proteína recombinante y de su contraparte nativa (nTcCRT)	46
VI.5 Definición del valor de anticuerpos policlonales anti rTcCRT, como fuente de captura antigénica en ELISA	48
VI.6 Relación entre el ensayo de ELISA directo con extracto completo de epimastigotes y el ELISA de captura de rTcCRT, con el anticuerpo monoclonal E2G7	51
VII. DISCUSIÓN	52
VIII. CONCLUSIONES	61
IX. BIBLIOGRAFÍA	62

RESUMEN

El protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de una de las endemias de mayor relevancia para la Salud Pública en América Latina, la Enfermedad de Chagas. Es una patología zoonótica que afecta aproximadamente a 18 millones de individuos en Sudamérica y alrededor de 150.000 en Chile.

El diagnóstico de esta enfermedad es principalmente serológico, basándose en la detección inmunométrica de IgG contra antígenos parasitarios o el parásito completo. Esta metodología tiene la desventaja que, a pesar de tener un alta sensibilidad, la presencia de reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos disminuye la especificidad del método. Este problema no es de mayor relevancia en Chile, ya que no existen datos acerca de la existencia de otros parásitos que pudieran producir resultados falsos positivos.

Con el objetivo de mejorar la calidad del diagnóstico, numerosos laboratorios han desarrollado ensayos que usan proteínas recombinantes o péptidos sintéticos de *T. cruzi*. Se ha descrito que tanto sueros de ratones desafiados con tripomastigotes, como sueros humanos infectados con el parásito, presentan una respuesta humoral dirigida contra una proteína de 45 kDa de *T. cruzi*, descrita en el laboratorio donde se desarrolló esta Memoria, llamada en un comienzo Tc45, hoy día identificada como calreticulina de *T. cruzi*, TcCRT.

En esta Memoria de Título se propone estandarizar ensayos inmunoenzimáticos para determinar la reactividad de sueros humanos con calreticulina recombinante de *T. cruzi* (rTcCRT), con el fin de aportar datos con un posible potencial diagnóstico de la enfermedad.

Se utilizaron sueros humanos seropositivos y seronegativos a *T. cruzi* (según criterio del Centro de Referencia Nacional, ISP, Chile), y se desarrollaron ensayos inmunoenzimáticos utilizando extracto parasitario completo y calreticulina

recombinante del parásito, para evaluar y comparar la reactividad de los sueros en estudio con estos reactivos. Además, se utilizaron inmunoglobulinas monoclonales y policlonales, dirigidas contra rTcCRT, para sensibilizar las placas de ELISA.

Los resultados demostraron que el ensayo inmunoenzimático directo, utilizando extracto parasitario completo, es un buen método diagnóstico que permite discriminar entre individuos infectados y no infectados, ya que la especificidad de este ensayo no estaría comprometida, en Chile, por la presencia de reacciones no deseadas con otros tripanosomátidos.

Aunque los resultados obtenidos en los ensayos indirectos no favorecen un valor diagnóstico para rTcCRT, indican que tanto en individuos infectados, como en individuos normales, la presencia de anticuerpos anti – TcCRT es un hecho frecuente. En los individuos seropositivos, este hecho se puede explicar por numerosos factores, tanto del hospedero como del parásito. En los individuos seronegativos, que no han estado en contacto con el parásito, al igual que en los seropositivos, se presume que la presencia de reactividad contra TcCRT podría tener un origen autoinmune, además de otros factores que se discuten en esta Memoria.

A pesar que el ensayo de captura de la proteína nativa desde extracto parasitario con inmunoglobulinas policlonales lapinas anti rTcCRT ofrecía una posibilidad atractiva para discriminar entre sueros positivos y negativos, experimentos posteriores sugieren que la inmunogenicidad de nTcCRT es sólo una parte menor de un conjunto de otras interacciones complejas (no necesariamente inmunológicas), participantes en el ensayo. Una contribución inesperada de estos ensayos, es la participación paradójica de la fase sólida (representada por el PVC de la placa de ELISA, sensibilizada con inmunoglobulinas lapinas, inmunes o no, y la proteína saturante inespecífica). Así, independientemente de la especificidad de los anticuerpos unidos al PVC, se unieron antígenos parasitarios, inmunogénicos en humanos y discriminatorios

entre sueros positivos y negativos. Es obvia, entonces, la necesidad futura de identificar estos antígenos parasitarios.

SUMMARY

The flagellated protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the causal agent of Chagas` Disease, one of the most important endemics concerning Public Health in Latin America. This pathology is a zoonosis that affects nearly 18 million people in South America, and about 150,000 in Chile.

Serology is the main tool to detect the infection and it is based on the detection of IgG against *T.cruzi* antigens or against the whole parasite. In spite of a good sensitivity, this methodology has low specificity, due to possible cross reactivity with other trypanosomatids. This is not a major problem in Chile, because there is no data reporting the presence of other parasites that could generate false positive results.

With the aim of improving the diagnosis quality, many laboratories have developed assays using *T. cruzi* recombinant proteins or synthetic peptides. Within this context, our laboratory has described that both humans and mice, infected with trypomastigotes, develop a humoral response against a 45 kDa *T. cruzi* protein, first called Tc45, and now identified as *T. cruzi* calreticulin, TcCRT.

With the goal of providing data with potential diagnostic value, this thesis proposes the development of immunoenzymatic assays to detect the reactivity of human sera with recombinant calreticulin from *Trypanosoma cruzi* (rTcCRT).

Human sera, positive and negative to *T. cruzi* (according to the National Reference Center, Institute of Public Health, Chile, criterium based on immune fluorescence) were tested in an immunoenzymatic assay against a whole parasite extract and rTcCRT. The aim was to evaluate and compare the reactivity of these sera with these reagents. Also, anti rTcCRT monoclonal and polyclonal immunoglobulins were used to capture these molecules.

The results showed that the direct assay using whole parasite extract is an appropriate diagnostic method which allows to discriminate between infected and non infected individuals. The high sensitivity of this assay should not be influenced in Chile by reactions with other trypanosomatids.

Although the results obtained in the indirect assays do not favor the proposal of a diagnostic value for rTcCRT, they demonstrate that in both infected and normal individuals, the presence of anti rTcCRT antibodies is a frequent finding. In seropositive individuals this fact can be explained by a number of factors, involving both host and parasite. In seronegative individuals, which have not contacted the parasite, the presence of reactivity with TcCRT could have an autoimmune component, besides other factors discussed in this thesis.

The indirect assay, using polyclonal rabbit anti – rTcCRT IgG, offered an attractive possibility to capture the native counterpart from a whole parasite extract, thus providing a good discriminatory tool. However, further analysis of this method, indicate that nTcCRT immunogenicity is only a minor part in a complex set of participating interactions (non necessarily immunological). An unexpected contribution of these assays is the paradoxical participation of the solid phase (represented by the PVC ELISA plate, sensitized with rabbit immunoglobulines, immune or not, and the irrelevant blocking protein). Thus, irrespectively from the sensitizing antibody specificity, and the fact that an efficient blocking agent was used, immunogenic parasite antigens did bind to this phase. These antigens discriminated positive and negative sera. Obviously, identification of these parasite antigens will be attempted in the near future.

I. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana afecta las poblaciones semirurales y rurales que habitan las tierras más cálidas de América Latina y es una de las endemias más expandida del continente. Las estimaciones señalan que entre 16 y 18 millones de personas presentan serología positiva (**Dias y Schofield, 1999; Ávila et al., 1997**), que 21 mil individuos mueren cada año por causa de este mal, y que existen aproximadamente 40 millones de personas que viven en situación de alto riesgo de contraer la enfermedad (**TDR, 1999-2000**). Estas cifras, junto al estrecho vínculo que existe entre esta dolencia y el alto grado de subdesarrollo social y económico, convierten a la Enfermedad de Chagas en uno de los problemas de salud pública más graves de toda Latinoamérica.

En Chile existe una zona endémica que abarca de la I a la VI Región, incluyendo la Región Metropolitana, y se estima que existen aprox. 150 mil individuos infectados (**Olea, 1998**).

El agente etiológico de la Enfermedad de Chagas aguda, crónica y hasta a veces fatal, es el *Trypanosoma cruzi*, protozoo flagelado del Orden *Kinetoplastidea*. La sobrevivencia de este parásito depende de la exitosa transmisión y colonización de tres ambientes radicalmente diferentes, el intestino del insecto vector, y en el hospedero mamífero, los ambientes intra y extracelular (**Tyler et al., 2003**).

T. cruzi es un organismo eucarionte unicelular, parásito intracelular obligado, al cual se le han caracterizado numerosos antígenos. A pesar de importantes contribuciones para definir su potencial rol como inmunógenos o herramientas de diagnóstico, en la mayoría de los casos no se ha definido la función de estas moléculas parasitarias.

El diagnóstico etiológico de la Tripanosomiasis Americana es requerido en variadas circunstancias (confirmar etiología en un paciente, exclusión de sangre de un donante, estudios epidemiológicos, seguimiento de casos post tratamiento, sospecha de infección congénita, entre otros), y se basa en la presencia de anticuerpos contra el parásito en el suero de individuos infectados. Estos anticuerpos son normalmente detectados por una gama de ensayos serológicos, los más usados son hemoaglutinación indirecta (IHA), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA (“enzyme linked immunosorbent assay”), por su bajo costo, simplicidad de uso y aceptables resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad. Todos ellos se basan en fracciones parasitarias completas o semipurificadas. La OMS recomienda usar al menos dos pruebas en paralelo.

Sin embargo, se han detectado algunos problemas en cuanto a la reproductibilidad y confiabilidad de estos ensayos, derivado de la escasa estandarización de los reactivos. Además, se presenta reactividad cruzada con anticuerpos generados contra otros tripanosomátidos, especialmente *Leishmania spp.*, *T. rangeli* y *Chitidia fasciculata*. Con el fin de resolver estos problemas, se han descrito una serie de antígenos purificados, los cuales han sido evaluados y usados en investigación con buenos resultados, pero no se han incluido en pruebas diagnósticas por razones técnicas y económicas.

La producción y purificación de antígenos parasitarios es una tarea que consume mucho tiempo, y generalmente se obtiene una baja cantidad de la proteína de interés. Algunos de estos problemas se han solucionado con el desarrollo de la técnica de DNA recombinante, lo que permite la producción de antígenos parasitarios en altas cantidades y con un alto grado de pureza (**da Silveira et al., 2001**).

Son numerosos los laboratorios que han realizado estudios y caracterizado antígenos recombinantes de *T. cruzi*. Tal es el caso de los antígenos recombinantes B12 y B13, a los cuales se les ha descrito una potencial aplicación

en el serodiagnóstico de la enfermedad (**Gruber y Zingales, 1993**). Una proteína recombinante de 24 kDa, rTc24, fue evaluada para monitorear la eficacia de terapias, a través de ensayos de ELISA e inmunowesternblot (**Krautz et al., 1995**). También se han desarrollado ensayos de ELISA con una mezcla de antígenos recombinantes de *T. cruzi*, para el inmunodiagnóstico de la fase aguda y crónica de la Enfermedad de Chagas. Estos estudios afirman que un ensayo serológico que use mezclas de antígenos recombinantes, tiene la ventaja de mayor especificidad que el uso de extractos parasitarios, ya que se minimiza la reactividad cruzada. Sin embargo, al usar un único antígeno, disminuye la sensibilidad. En este tipo de ensayo se ha evaluado, por ejemplo, el comportamiento de tres antígenos recombinantes de *T. cruzi* (JL8, MAP, TcPo) (**Umezawa et al., 2004**). Por otra parte, se ha investigado la capacidad diagnóstica de tres secuencias multiepitópicas combinadas en un único péptido sintético, el cual fue evaluado en ensayos de ELISA obteniendo una alta sensibilidad (**Houghton et al., 1999**). Otro laboratorio propuso el “TcF-ELISA”, que utiliza un antígeno recombinante que contiene secuencias “tandem” de diferentes péptidos específicos de *T. cruzi*, el cual demostró ventajas como: mejor discriminación entre suero reactivo y no reactivo, mayor precisión, y menor índice de reactividad cruzada con casos de leishmaniasis; siendo de alta reproductibilidad (**Ferreira et al., 2001**).

En el año 1991, en el laboratorio donde se desarrolló esta Memoria de Título, se describió que IgG de ratones inmunizados con *T. cruzi* reconocían un polipéptido parasitario de 45 kDa, presente tanto en epimastigotes como tripomastigotes de *T. cruzi*. Se le llamó Tc45 (**Ramos et al., 1991**). En el mismo laboratorio, en el año 2000, se define a Tc45 como calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT), caracterizada como un antígeno dimórfico, codificado por genes de distribución cromosómica variable. El gen de Tc45 fue clonado, secuenciado y expresado. La caracterización bioquímica de este polipéptido fue posible gracias a un anticuerpo monoclonal de alta afinidad, E2G7. También se desarrollaron

ensayos con potencial valor diagnóstico para la infección en humanos (**Aguillón et al., 1997; Marcelain et al., 2000**).

En 1999, se describió en Argentina TcCRT de otra cepa de *T. cruzi* y su participación chaperona en el plegamiento de glúcidos (**Labriola et al., 1999**).

En esta Memoria de Título hemos estandarizado un ensayo inmunométrico para determinar la reactividad de sueros de humanos, infectados y normales, con calreticulina recombinante de *T. cruzi*.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 HISTORIA

Carlos Chagas, estudiante de medicina en Rio de Janeiro desde 1896, enfocó sus primeros estudios en el control de la malaria en esta misma ciudad. Es así como conoció al Dr. Oswaldo Cruz, quien dedicaba su trabajo a la erradicación de la malaria y la fiebre amarilla en Rio de Janeiro. Fue Oswaldo Cruz quien en 1906 delegó a Carlos Chagas y a su compañero Belisario Peña, a Minas Gerais, región con un alto impacto de malaria. Es en Minas Gerais donde a Carlos Chagas se le advierte por primera vez de la existencia de insectos hematófagos que acostumbraban a picar al ser humano mientras dormía, especialmente en la cara por estar descubierta. Este tema despertó el interés de Chagas, por la posible transmisión de algún parásito al ser humano u otro vertebrado, por parte de este insecto hematófago. Es así que, al poco tiempo, pudo observar la existencia de flagelados en el intestino posterior de este insecto. El análisis de estos flagelados reveló la presencia de una nueva especie parasitaria. Al principio, se le denominó *Schyzotrypanum cruzi* (en honor a Oswaldo Cruz) y, posteriormente, fue renombrado *T. cruzi*.

Carlos Chagas continuó estudiando el recién descubierto parásito y potenciales hospederos vertebrados. Es así como descubrió parásitos en el torrente sanguíneo de un gato doméstico y de una niña que residía en la misma casa que el felino, la cual presentaba sintomatología clínica. Chagas observó una elevada carga parasitaria en el torrente sanguíneo de la menor, lo que lo llevó a pensar que se encontraba ante la fase aguda de una enfermedad aún no descrita. El seguimiento de este caso, a través de numerosos exámenes, le hizo notar cómo los flagelados desaparecían del torrente sanguíneo a medida que los síntomas se desvanecían, surgiendo la posibilidad de una fase crónica de la enfermedad.

El 23 de Abril de 1909, Oswaldo Cruz anunció el descubrimiento de Carlos Chagas en una reunión de la Academia Nacional de Medicina de Brasil. En Agosto, Carlos Chagas publicó en el primer volumen de “Memorias do Instituto Oswaldo Cruz”, su clásico manuscrito acerca de una nueva tripanosomiasis humana. En este trabajo él describe la infección humana, la morfología del parásito en el torrente sanguíneo, el ciclo en el tracto digestivo del vector invertebrado, el cultivo en agar sangre y la transmisión de flagelados a vertebrados desde vectores infectados.

Después de estas primeras observaciones, Carlos Chagas regresó a áreas endémicas a estudiar estados clínicos de la enfermedad. Describió efectos en corazón y sistema gastrointestinal, también observó manifestaciones neurológicas, mediante hallazgos de meningoencefalitis en un caso mortal.

En 1911 presentó ante la Academia Nacional de Medicina, el primer caso congénito de la enfermedad, y en 1912 la posibilidad de un ciclo silvestre en armadillos.

En 1916 por primera vez involucró al sistema digestivo en la enfermedad, especialmente en relación a megaesófago y disfagia, “mal do engasgo”, el cual era conocido en la región hace más de 100 años.

A los 29 años, Carlos Chagas es capaz de describir el agente, vectores, signos clínicos en seres humanos y animales, y la existencia de reservorios animales, de una nueva enfermedad conocida como Enfermedad de Chagas, (nombre sugerido por Miguel Couto, uno de sus maestros) o Tripanosomiasis Americana. Adicionalmente, influyó en otros investigadores, como Gaspar Vianna, quien en 1911 describió el ciclo intracelular. Arthur Neiva se especializó en el insecto vector, los triatominos. Guerreiro y Machado introdujeron el método de Bordet y Gengou (fijación del complemento), como diagnóstico serológico.

Chagas fue nombrado miembro extraordinario de la Academia Nacional de Medicina de Brasil. Murió el 8 de noviembre de 1934 a los 55 años. El trabajo de su vida es hasta hoy en día continuado por numerosos científicos (**Wendel et al., 1992**).

II.2 EPIDEMIOLOGÍA

La Enfermedad de Chagas se encuentra en 18 países de América (**Figura 1**), en dos zonas ecológicas diferentes: la región del cono sur, donde el principal vector habita en las viviendas humanas y en las áreas peridomiciliarias; y en Centro América y México, donde el vector habita tanto en moradas como en áreas des pobladas. La prevalencia de la enfermedad es de aproximadamente 17 millones de casos, con 4,8 a 5,4 millones de personas exhibiendo signos clínicos. La incidencia anual es de 700.000 a 800.000 nuevos casos y 45.000 muertes asociadas a la forma cardiaca de la enfermedad (**Morel y Lazdins, 2003**).



Figura 1: Distribución geográfica de *T. cruzi*. Las áreas más oscuras denotan las dos zonas ecológicas más afectadas: el cono sur y Centro América y México (extraído de <http://nsm1.utdallas.edu/bio/Gonzalez/Lecture/Parasite/images/Image54.gif>)

En Chile, el área endémica se extiende desde la I a la VI Regiones, incluyendo la Región Metropolitana. La población de esta área corresponde a un 77% del total del país, pero considerando que la enfermedad es más frecuente en áreas rurales y periurbanas, la población expuesta corresponde a aprox. 850.000 personas. Basándose en estudios de la DISAM (División de Salud del Ambiente del Ministerio de Salud) y estudios serológicos, se estima que el número de personas infectadas en esta área es de 142.000 **(Olea, 1998)**.

La mortalidad para el año 2000 alcanzó una tasa de 0,3 por 100.000 habitantes, lo que significa un total de 50 muertes (un 0,06% del total de muertes del país), correspondiendo un 70% a hombres. En los años 1992-2000 se mantiene una tasa relativamente constante de aproximadamente 0,4 por 100.000 habitantes, lo que representa un promedio de 49-55 muertes anuales.

Las notificaciones de morbilidad para el año 2002 fueron 487, lo que significa una tasa de 3,1 por 100.000 habitantes. Se debe tener en cuenta que el 83% de estas notificaciones corresponde a diagnósticos serológicos y no a casos clínicos. A contar del cambio en la Normativa N° 55 sobre Enfermedades de Notificación Obligatoria (año 2000), se considera como Enfermedad de Chagas a aquellos sospechosos que presentan un cuadro clínico sugerente de esta enfermedad y que es confirmado por laboratorio. Por ello, al analizar los casos notificados el 2002 a través del Boletín ENO (Enfermedades de Notificación Obligatoria), sólo 23 casos cumplen con confirmación clínica y serología, lo que muestra la magnitud real de la enfermedad en el momento actual **(XIIa. Reunión Intergubernamental INCOSUR, 2003)**.

II.3 LA ENFERMEDAD

La infección con *T. cruzi* resulta en una relación para toda la vida entre el hospedero y el parásito. En el caso humano, la infección inicial generalmente

ocurre en niños y jóvenes, pero las manifestaciones clínicas de la enfermedad no aparecen hasta décadas más tarde. La fase aguda de la infección se caracteriza por altos niveles parasitarios, tanto en tejidos como en sangre, y por la diseminación de los parásitos a prácticamente todos los tejidos y órganos. Esta invasión es el resultado de una efectiva evasión de la respuesta inmune innata por parte del parásito y de su habilidad para infectar un amplio rango de células del hospedero. Aunque algunas veces la fase aguda se asocia a severa sintomatología clínica, la mortalidad en esta etapa no es frecuente y podría estar asociada a individuos muy jóvenes o con inmunodeficiencias primarias o secundarias.

La fase aguda finaliza cuando se desarrolla una respuesta inmune potente y duradera, la cual controla los niveles parasitarios tanto en sangre como en tejidos, resultando en una infección crónica y persistente. Este periodo post-agudo se puede dividir en las fases “indeterminada” (asintomática) y “crónica” (sintomática). Estas dos fases son parte de un continuo en que el daño acumulado durante la fase asintomática desencadena la signología clínica característica de la fase crónica. La fase sintomática se manifiesta en la minoría (30 a 40%) de la población infectada. En la mayoría de los casos, la enfermedad es más evidente a nivel cardiaco (20 a 30%), y en una menor proporción de pacientes a nivel digestivo (8 a 10%) **(Tarleton, 2003)**.

La fase aguda de la enfermedad es generalmente asintomática, aunque en algunos niños se puede observar sintomatología paralela a la elevada parasitemia, la cual corresponde a fiebre, dolor muscular, vómitos, hepatomegalia, esplenomegalia y aumento de volumen de nódulos linfáticos y, ocasionalmente, miocarditis. La zona de ingreso del parásito al hospedero frecuentemente se destaca por una lesión en la piel llamada “Chagoma”. Una manifestación bastante usual en esta etapa es el “Signo de Romaña”, el que corresponde a un edema periocular unilateral bpalpebral, cuando el parásito penetra por esta zona.

Después de 10 a 20 años de haber adquirido la infección, una proporción variable de individuos manifiesta la enfermedad crónica, en la cual dos formas clínicas son las más comunes: la forma cardíaca, caracterizada por cambios en el ECG, falla cardíaca y muerte súbita; y una forma digestiva en la cual segmentos del tracto gastrointestinal se dilatan e hipertrofian, como por ejemplo: megaesófago, megacolon. La prevalencia y severidad de las diferentes manifestaciones de la enfermedad chagásica crónica parecen estar confinadas a ciertas áreas geográficas y pueden estar asociadas a diferentes cepas de *T. cruzi* **(Scott y Snary, 1982)**.

La presencia de epitopos de reactividad cruzada entre el hospedero y el parásito, así como la presencia de células T autorreactivas o promotoras de la enfermedad, apoyan la hipótesis que un proceso autoinmune está asociado a la enfermedad crónica **(Fernández, 2002)**.

En Chile no existe la forma aguda de la enfermedad, lo que posiblemente se relaciona con las cepas que prevalecen en el país.

II.4 TRANSMISIÓN

La transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas sigue siendo en numerosos países de América la principal vía de infección, pero en aquellos países libres de esta forma de transmisión (Uruguay y Chile), los otros mecanismos de transmisión: transfusional, transplacentaria, trasplante de órganos, y otras de menor relevancia, como la vía digestiva, leche materna y accidentes de laboratorio, deben ser motivo de atención para la comunidad científica y las autoridades de Salud Pública de cada país.

La mayor parte de los países de Latinoamérica tiene leyes, regulaciones o normas que hacen obligatorio el tamizaje o descarte de los donantes de sangre, lo

que ha controlado en gran medida la transmisión transfusional. El problema radica en la cobertura del descarte y las técnicas empleadas, en especial la calidad de los “kits” serológicos.

A pesar que, probablemente, la infección transplacentaria presenta una frecuencia alta, hasta la fecha se han implementado pocos sistemas de intervención de este mecanismo de transmisión en los países endémicos. La transmisión transplacentaria al feto en formación se puede producir en cualquier etapa de la infección materna, en embarazos sucesivos, gemelares, y generalmente se producen fetopatías, pero no abortos.

La transmisión por trasplante de órganos está actualmente bajo control, debido a la política establecida del estudio serológico previo al donante y al receptor. Por lo general, ante la presencia de donante o receptor chagásico, no está contraindicado el trasplante, pero sí, es obligatorio el seguimiento y profilaxis en los pacientes.

En laboratorios u hospitales, los accidentes pueden ser causa de transmisión, por no realizar una adecuada manipulación del material infectado, por personal no capacitado, o por mal manejo de normas de bioseguridad. Dentro de las muestras que implican mayor riesgo están los triatominios, medios de cultivos celulares, animales con infección aguda, y manejo de sangre humana con infección aguda.

La transmisión oral es producto de la ingesta de alimentos contaminados con el parásito. Este mecanismo está documentado por deyecciones de triatominios depositadas en la mucosa oral y en alimentos, o por ingesta de animales con alta parasitemia o infecciones agudas, presentándose como brotes esporádicos familiares, después de la ingestión de un animal infectado o por ingestión de vegetales contaminados con fecas de los insectos vectores.

La transmisión sexual y por leche materna son mecanismos factibles, aunque hasta la fecha, son pocos los casos descritos y claramente documentados en la literatura **(Lorca, 2001)**.

II.5 EL VECTOR Y SU DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El vector de la Enfermedad de Chagas corresponde a especies hematófagas de la familia *Reduviidae* (chinchas de trompa cónica o “kissing bugs”), principalmente especies de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*.

La adaptación del vector al ambiente doméstico humano facilita la transmisión de la infección entre animales, de animales a humanos y entre humanos, se trata, por lo tanto, de una zoonosis **(Zeledón y Rabinovich, 1981)**.

Animales domésticos como porcinos, caprinos, ovejas y aves son los más importantes reservorios de *T. cruzi*. Roedores silvestres, marsupiales y primates no humanos mantienen la circulación del parásito en áreas endémicas zoonóticas. Infecciones inaparentes y agudas se presentan en animales silvestres, la fase crónica es comúnmente encontrada en perros **(Reyes et al., 2002)**, en los cuales se ha reportado la muerte súbita por miocarditis post infección crónica **(The Merck Veterinary Manual, 2005)**.

En Chile, los vectores de importancia son *Triatoma infestans*, para el ciclo domiciliario, y *Mepraia spinolai*, para el ciclo silvestre. Se estima que un 30% de los triatomíneos están infectados **(Acuña, 2002)**.

La forma más común de transmisión del parásito al hombre es a través de estos insectos hematófagos estrictos y oportunistas, que en Chile se conocen como “vinchucas”. Estos insectos contraen el parásito al alimentarse de un

mamífero infectado, y mantienen la infección durante toda su vida. Los vectores distribuyen el parásito dentro de comunidades de mamíferos silvestres, y entre animales domésticos y el hombre, manteniendo así un reservorio silvestre (ciclo silvestre) y un reservorio doméstico (ciclo domiciliario), respectivamente (**Figura 2**).

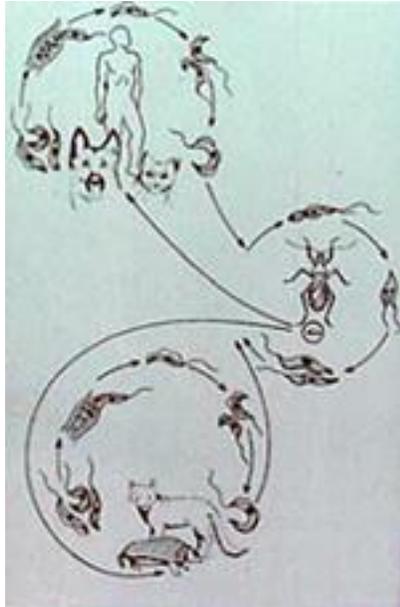


Figura 2: Interacción entre el ciclo doméstico y silvestre de *T. cruzi*. El vector artrópodo es la conexión entre ambos ciclos (**Acuña, 2002**).

La zona endémica para la Enfermedad de Chagas en Chile coincide con la distribución de los vectores. Dos especies de vectores se reconocen tradicionalmente: *Triatoma infestans* (vinchuca doméstica), y *Mepraia spinolai* (la vinchuca silvestre). Recientemente se ha descrito *Mepraia gajardoi*, cuya importancia epidemiológica es aún desconocida, aunque se la responsabiliza del mantenimiento del ciclo en mamíferos acuáticos (**Acuña, 2002**).

II.6 TRATAMIENTO

En la actualidad se acepta que la Enfermedad de Chagas humana debe ser tratada en cualquier periodo de su evolución, con la única excepción del periodo crónico terminal.

T. cruzi causa una infección de por vida en humanos. La extensión del daño es variable y depende de la cepa del parásito y de factores del individuo afectado, pudiendo ocasionar incapacidad e incluso la muerte. La eliminación de este protozoo es posible con al menos dos drogas disponibles, Benznidazole (Bz) y Nifurtimox (Nf), las que han demostrado ser parcialmente efectivas y con una razonable relación costo/beneficio. Sin embargo, estas drogas no son efectivas en todos los individuos infectados, y no están exentas de efectos colaterales, por lo tanto, el tratamiento con estas drogas de alta complejidad debe ser realizado por especialistas con alto grado de conocimiento, tanto de la enfermedad como de las drogas utilizadas **(Rassi y Luquetti, 2003)**.

Es importante señalar que, en general, en el periodo crónico no hay negativización de la serología convencional, y el criterio de curación se debe basar en dos o más de los siguientes parámetros, los cuales se deben mantener por años, sin existir posibilidad de reinfección: **(Apt, 1999)**.

- xenodiagnóstico negativo.
- hemocultivos negativos.
- viraje de PCR (“polymerase chain reaction”) de positivo a negativo.
- viraje de anticuerpos líticos de positivo a negativo.
- mejoría clínica y del electrocardiograma (ECG), en especial en cardiópatas recientes.

II.7 CONTROL

En los últimos diez años, una serie de iniciativas multinacionales han llevado a una reducción significativa del impacto económico y social de la Enfermedad de Chagas en América. Este éxito se debe a iniciativas regionales enfocadas en la transmisión vectorial, la evaluación de donantes de sangre para disminuir la transmisión transfusional, y el mejoramiento de la detección y tratamiento de casos congénitos.

A pesar de estos logros, existen muchas áreas con un alto índice de transmisión vectorial, y muchos países endémicos deben desarrollar programas de vigilancia e intervención a gran escala. Incluso en áreas en que se ha declarado la eliminación de la transmisión vectorial, existe un riesgo continuo de que esta forma de transmisión vuelva a surgir. Las estrategias para el control del vector se enfocan en el mejoramiento de la vivienda y el uso de insecticidas. Existe la posibilidad de que las poblaciones domésticas del vector sean eliminadas, lo que junto al mejoramiento del tamizaje en bancos de sangre, llevará a la progresiva reducción en la transmisión de *T. cruzi*.

Sin embargo, estos logros no significan que la vigilancia epidemiológica deba pasar a segundo plano, lo que podría tener severas consecuencias como el progresivo reestablecimiento de focos activos de transmisión (**Dias et al., 2002**).

Por otra parte, aunque el rol epidemiológico de *Mepraia spinolai* está en estudio, por ser un vector silvestre, en Chile su erradicación representa una tarea de muy difícil ejecución.

II.8 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

La Tripanosomiasis Americana es comúnmente asintomática; por esta razón, su diagnóstico se basa principalmente en pruebas de laboratorio. Durante los periodos clínicos indeterminado y crónico, el estándar diagnóstico se basa en la detección de IgG contra antígenos de *T. cruzi*, mediante más de una prueba serológica. Además, el serodiagnóstico es usado para la vigilancia epidemiológica, para evaluar la eficacia de terapias y la evaluación rutinaria en bancos de sangre **(Salomone et al., 2003)**.

El diagnóstico se debe sustentar en antecedentes epidemiológicos, como la procedencia del enfermo, y antecedentes clínicos, como la presencia de chagoma, compromiso cardiaco, nervioso y/o digestivo, entre otros.

Dentro de los métodos diagnósticos tenemos los parasitológicos directos, que demuestran la existencia de *T. cruzi*, y los parasitológicos indirectos, que se basan en reacciones serológicas.

Los diagnósticos directos son de mayor relevancia en la etapa aguda de la infección, y dentro de ellos tenemos:

- examen microscópico directo de sangre fresca
- método de gota gruesa
- método de centrifugación de sangre fresca (Método de Strout)
- xenodiagnóstico (útil en la etapa aguda y crónica de la infección)
- PCR.

El diagnóstico parasitológico indirecto es un método inmunológico para la detección de anticuerpos en el individuo infectado. Las pruebas más usadas son ELISA (“enzyme linked immunosorbent assay”) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Estas pruebas han desplazado a la hemoaglutinación (HAI), por su menor

especificidad y sensibilidad, y a la prueba de fijación del complemento, por su alta complejidad.

Los avances en la investigación han permitido elaborar la librería genómica de *T. cruzi*, y obtener antígenos de DNA recombinantes, los cuales facilitan la elaboración de métodos diagnósticos **(Gomes, 1997)**.

II.9 *Trypanosoma cruzi*: TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA

No existe una población homogénea de *T. cruzi*, ésta se compone de un conjunto de cepas las cuales participan en los ciclos domésticos y silvestres, involucrando humanos, vectores artrópodos y reservorios animales del parásito **(Tibayrenc y Ayala, 1988)**.

T. cruzi es un organismo eucarionte unicelular, que infecta a la mayoría de las células mamíferas. Es altamente pleomórfico, exhibiendo una serie de formas diferentes durante su ciclo biológico. Este protozooario hemoflagelado, perteneciente a la familia de los Tripanosomátidos, incluidos en el orden de los Kinetoplástidos, se caracteriza por la presencia de un flagelo y una única mitocondria en la cual se sitúa el kinetoplasto, organelo especializado que contiene DNA. Presenta cuatro estados morfológicos: tripomastigote metacíclico, promastigote o tripomastigote sanguíneo, epimastigote y amastigote.

El tripomastigote metacíclico presenta flagelo, es alargado con núcleo central. Este estado presenta deficiente capacidad de reproducción y es la forma que penetra e infecta al hospedero desde el vector biológico.

El promastigote o tripomastigote sanguíneo es alargado, similar al estado anterior, puesto que también presenta flagelo. Este estado se encuentra en la

sangre del hospedero vertebrado y no tiene capacidad para dividirse, pero si tiene capacidad para invadir otras células.

El epimastigote es fusiforme, presenta flagelo y núcleo en posición central. Corresponde a la forma replicativa en el insecto vector.

El amastigote es de forma redondeada, carece de flagelo y, por lo tanto, de movimiento. Tiene capacidad de replicación dentro de las células del hospedero **(Guzmán *et al.*, 1999)**.

II.10 CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *T. cruzi* es complejo, alterna entre un insecto vector y un hospedero vertebrado. Mediante diferenciación celular se replica en dos ambientes diferentes, el intestino del insecto vector y el citoplasma de la célula mamífera. La sobrevivencia de *T. cruzi* depende de la transmisión exitosa y colonización de estos ambientes. Estas transformaciones adaptativas se manifiestan como cambios coordinados en morfología, metabolismo, y regulación del ciclo celular **(Barret *et al.*, 2003)**.

El vector infectado habitualmente deyece sobre la piel del hospedero, luego de alimentarse. Los tripomastigotes metacíclicos, presentes en los excrementos del insecto vector hematófago, son introducidos en el hospedero mediante mecanismos no bien esclarecidos. La forma metacíclica no replicativa es capaz de invadir un amplio rango de células nucleadas fagocíticas y no fagocíticas, ingresando a ellas rodeadas por una membrana, formando la vacuola parasitófora. Después de entrar a la célula, el parásito comienza la diferenciación hacia la forma amastigótica, y escapa de la vacuola para liberarse al citoplasma celular, lugar en que se completa la transformación morfológica, incluyendo la involución del flagelo. El amastigote vuelve a ingresar al ciclo celular y prolifera

hasta que la célula mamífera se llena de estas formas. Los amastigotes se elongan y vuelven a adquirir su flagelo, transformándose en tripomastigotes. Los tripomastigotes escapan de la célula y pueden invadir células adyacentes o entrar a la circulación sanguínea o linfática. La sangre contaminada puede ser succionada durante la alimentación del insecto vector hematófago. En el intestino medio de este insecto vector, los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes. Finalmente, después de migrar al intestino posterior, los epimastigotes se adhieren a la cutícula intestinal a través de su flagelo y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos infectantes, completando así el ciclo biológico (Barret *et al.*, 2003). (Figura 3).

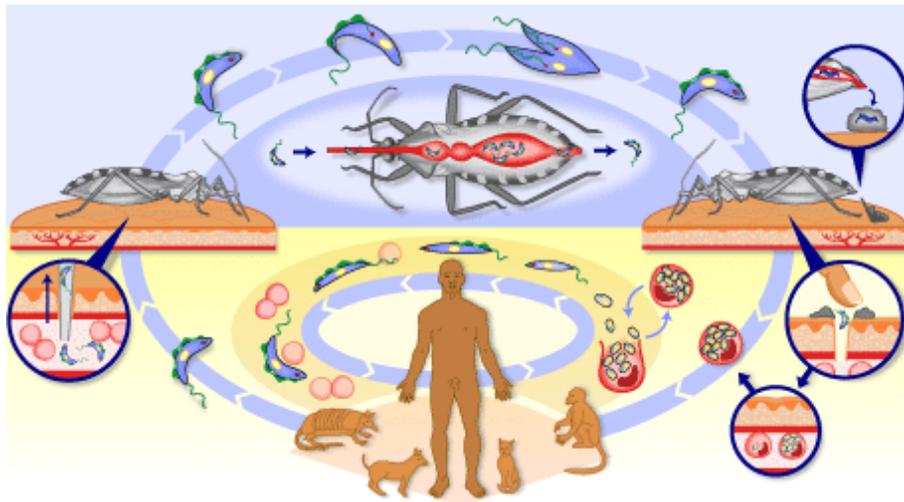


Figura 3: Ciclo biológico de *T. cruzi*. La ilustración muestra los distintos estados parasitarios durante el ciclo biológico, en los diferentes hospederos: el vertebrado y el vector artrópodo (extraído de: www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm).

II.11 RESPUESTA INMUNE

Los mamíferos desarrollan una inmunidad parcial contra *T. cruzi*. El control inmunológico de *T. cruzi* requiere una respuesta combinada de mecanismos efectores. Para prevenir la muerte a causa de una exacerbación de la parasitemia en la fase aguda, se requiere al menos de una respuesta humoral consistente y la activación de células T CD4⁺ y CD8⁺. A medida que la respuesta inmune adaptativa es estimulada, el alto grado de parasitismo tisular es controlado, pero nunca erradicado.

Estas mismas respuestas son requeridas para mantener el control de *T. cruzi* durante la fase crónica de la infección **(Tarleton, 2003)**.

La infección aguda causa una vigorosa activación policlonal de células T y B, seguida de una breve etapa de inmunosupresión generalizada, asociada a la respuesta inflamatoria de los tejidos del hospedero. Por esto, es posible que mecanismos no específicos jueguen un rol importante en la protección del hospedero, y tanto una respuesta inmune exagerada como una respuesta de menor intensidad a lo normal contra el parásito, pueden estar asociadas al desarrollo de la fase crónica de la enfermedad. Tanto la respuesta humoral como celular están presentes durante la fase crónica. A pesar de la respuesta inmune, los parásitos persisten en los tejidos del hospedero **(Pérez et al., 1998)**.

Es muy probable que diversos mecanismos de inmunidad innata operen también en la determinación del equilibrio hospedero vertebrado/parásito.

Se ha demostrado la existencia de anticuerpos dirigidos contra *T. cruzi*, tanto en pacientes humanos como animales que sufren la enfermedad, y también en aquellos individuos expuestos al parásito que no presentan sintomatología clínica. Los primeros anticuerpos en aparecer son de clase IgM, detectables en la

fase temprana de la enfermedad. Después aparece IgG, cuyos niveles persisten durante toda la enfermedad (**Bull. WHO, 1974**).

T. cruzi expresa una serie de proteínas y glucoconjugados en su superficie, componentes relacionados con la sobrevivencia del parásito en sus diferentes hospederos. Estas moléculas son de mayor relevancia en parásitos protozoarios, los cuales generalmente deben sobrevivir en condiciones desfavorables. Estos componentes son el resultado del ambiente al que *T. cruzi* ha estado expuesto durante la evolución, ya que es importante para el parásito protegerse de los cambios ambientales que se producen al alternar su hospedero (**Frasch, 2003**). Estos antígenos de superficie son candidatos naturales para inducir una respuesta humoral protectora. La caracterización de antígenos de superficie de *T. cruzi* reconocidos por el sistema inmune puede ser útil para el estudio de los mecanismos de invasión celular y protección del hospedero. Las versiones recombinantes de estos polipéptidos pueden ser usadas en el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas (**Gruber y Zingales, 1993**).

Recientemente, en el laboratorio en que se realizó esta memoria, se ha determinado que en la superficie de tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*, se encuentra la proteína calreticulina (TcCRT). Individuos seropositivos a *T. cruzi* poseen cantidades variables de anticuerpos dirigidos contra esta molécula. Este hecho implica que la infección natural o experimental con *T. cruzi*, provee de TcCRT a células inmunocompetentes. TcCRT puede ser expuesta a las células inmunes del hospedero vía expresión en la superficie, pero también podría ser secretada, liberada por destrucción masiva de parásitos en tejidos del hospedero, o combinaciones de estos mecanismos (**Ferreira et al., 2004**).

La respuesta inmune humoral humana contra TcCRT constituye el tema central de esta Memoria de Título. Por ello, la siguiente sección, se refiere a calreticulina, en términos generales.

II.12 CALRETICULINA

Calreticulina (CRT) es una proteína identificada y caracterizada por primera vez hace más de treinta años. Su nombre deriva de su localización preferente en el retículo endoplásmico y de su alta capacidad para unir calcio. Esta proteína multifuncional es altamente conservada y se la encuentra en todas las células de organismos superiores, a excepción de eritrocitos. Además del retículo endoplásmico, CRT ha sido descrita en gránulos citotóxicos de células T, en la superficie celular, en saliva de garrapatas, en suero sanguíneo, en el núcleo celular, en el citoplasma, en el acrosoma espermático, y en el espacio extracelular de algunas células estimuladas *in vitro*. Algunas de las funciones celulares en que participa CRT son: **(Eggleton y Michalak, 2003)**

- modulación de la expresión génica
- proliferación celular
- desarrollo cardíaco
- control de la calidad del plegamiento proteico (propiedad chaperona)
- función de células T citotóxicas
- modulación de flujos de calcio
- enfermedades autoinmunes
- almacenamiento de calcio en el retículo endoplásmico
- diferenciación
- adhesión y migración celular
- apoptosis
- angiogénesis y crecimiento tumoral

A través de la evolución se conserva, en gran medida, la organización genómica y la secuencia aminoacídica de CRT, manteniendo sus roles en las funciones celulares. Así, la identificación de proteínas homólogas en diversos parásitos, sugiere que CRT puede tener numerosos roles conservados. CRT de parásitos y de vertebrados comparten una serie de dominios funcionales.

Calreticulina humana (huCRT), es aproximadamente un 50% idéntica a TcCRT **(Ferreira et al., 2002)**.

En el laboratorio donde se desarrolló esta Memoria de Título se describió por primera vez TcCRT **(Ramos et al., 1991)**. Se caracterizó como un antígeno de 45 kDa, inmunodominante, dimórfico, y de localización cromosómica variable. El gen de TcCRT fue clonado, secuenciado y expresado.

Se ha demostrado que TcCRT nativa (nTcCRT) es inmunogénica tanto en ratones como en humanos. TcCRT es inmunogénica en ratones A.SW ($H2^s$), infectados o inmunizados con extracto parasitario completo. Ante el desafío, estos animales desarrollan una infección crónica. Al contrario, ratones A.CA ($H2^f$), quienes no montan una respuesta contra TcCRT, desarrollan una infección aguda. IgG de ratones A.SW infectados en forma crónica, protege en forma pasiva a su contraparte congénica A.CA **(Ramos et al., 1991)**. Los sueros de los ratones respondedores (A.SW) reconocieron una molécula de 45 kDa, denominada entonces Tc45, que resultó ser TcCRT **(Aguillón et al., 2000)**.

La reactividad de sueros humanos seropositivos con nTcCRT es extremadamente variable, desde negativa a altamente positiva, lo que hace sospechar que la respuesta contra organismos complejos, como *T. cruzi*, está modulada por múltiples genes esparcidos en el genoma del hospedero, incluyendo el complejo MHC **(Aguillón et al., 1997)**.

III. HIPÓTESIS

Si calreticulina recombinante de *T. cruzi* (rTcCRT) conserva aspectos estructurales relevantes a la antigenicidad/inmunogenicidad de calreticulina nativa (nTcCRT), entonces, anticuerpos presentes en sueros de humanos infectados, generados contra la molécula nativa, reaccionarán específicamente con la molécula recombinante.

IV. OBJETIVOS

General:

Contribuir al conocimiento de las relaciones inmunológicas, entre *T. cruzi* y sus hospederos humanos, proporcionando datos experimentales sobre la reactividad de sueros de éstos con rTcCRT.

Específicos:

1. Detectar anticuerpos humanos de individuos seronegativos y seropositivos, que reaccionen con extracto completo de epimastigotes.
2. Estandarizar un ELISA para la detección de anticuerpos humanos, de individuos seronegativos y seropositivos, que reaccionen con TcCRT recombinante (rTcCRT).
3. Estandarizar un ELISA para la detección de anticuerpos humanos, de individuos seronegativos y seropositivos, que reaccionen con rTcCRT capturada con un anticuerpo monoclonal.
4. Validar el uso de anticuerpos policlonales anti rTcCRT, como agentes de captura de la proteína recombinante y de su contraparte nativa (nTcCRT).
5. Definir el valor de anticuerpos policlonales anti rTcCRT, como fuente de captura antigénica en ELISA.
6. Relacionar el ensayo de ELISA directo con extracto completo de epimastigotes y el ELISA de captura de rTcCRT, con el anticuerpo monoclonal E2G7.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Detección de anticuerpos humanos de individuos seronegativos y seropositivos, contra extracto completo de epimastigotes.

- a. **Sueros humanos:** Fueron obtenidos del Centro de Referencia para la Enfermedad de Chagas del Instituto de Salud Pública (ISP). Por motivos de bioseguridad, estos sueros se evaluaron como negativos para anticuerpos anti-HIV y hepatitis B. La seropositividad y seronegatividad a *T. cruzi* se definieron por criterios de inmunofluorescencia indirecta contra parásitos completos. **Por ello, en el resto de este documento, los términos “seropositividad” o “positividad” y “seronegatividad” o “negatividad”, se referirán al criterio usado por el ISP.**

- b. **Extracto de epimastigotes:** Epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuén (gentilmente proporcionados por la Dra. Yolanda Repetto, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile), fueron cosechados en etapa de crecimiento exponencial y sometidos a ultrasonido (3 ciclos de 25 segundos cada uno).

- c. **Inmunosonda:** IgG de conejo, conjugada a peroxidasa, anti IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda humana (DAKO™ P0212).

- d. **Ensayo inmunoenzimático directo (Figura 4):** Para medir la reactividad de sueros humanos contra extracto de epimastigotes. Se utilizaron placas de ELISA NUNC™. El ensayo se realizó en las siguientes etapas (**Engval y Perlman, 1971**):
 - Sensibilización de la fase sólida: 100 µl por pocillo de extracto de epimastigotes en PBS 1x, en una concentración de 70 µg/ml. La sensibilización se realizó por 2 horas a 37°C.

- Bloqueo: 250 µl por pocillo de PBS-proteínas de soya 0,5% p/v (PBS-SOYA) se utilizaron para bloquear los sitios activos remanentes en los pocillos, durante 2 horas a 37°C.
- Incubación con sueros problema: 100 µl por pocillo de los sueros en estudio, en diluciones de 1/800 y 1/ 1.600, en PBS-SOYA TWEEN 0,05% v/v. La incubación se realizó por 1 hora a 37°C.
- Incubación con inmunoglobulina reveladora: 100 µl por pocillo de inmunoglobulina de conejo anti inmunoglobulinas humanas, en dilución 1/4.000 en PBS-SOYA TWEEN 0,05% v/v. Se incubó 1 hora a 37°C.
- Lectura de resultados: el sustrato usado fue ABTS (*Azino Bis Thiazoline Acid*, SIGMA™). La lectura de los resultados se hizo a los 30 minutos, en un lector de ELISA (BIORAD™).

Después de cada etapa se realizaron 5 lavados con PBS- TWEEN 0,05% v/v.

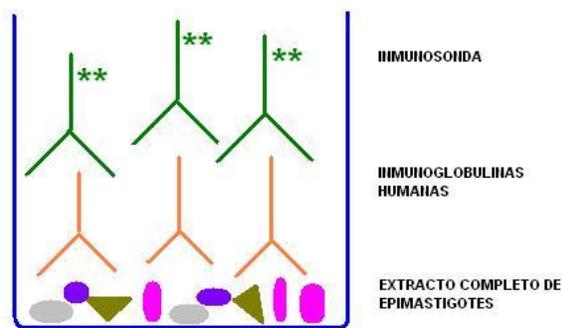


Figura 4: Ensayo inmunoenzimático directo. La placa se sensibilizó con extracto parasitario, posteriormente se agregaron los sueros humanos. Las inmunoglobulinas humanas se detectaron a través de la inmunosonda.

e. Determinación del valor de corte: El valor de corte (VC) para discriminar entre los sueros seropositivos y seronegativos a *T. cruzi*, se determinó en base a la expresión $VC = xDO(neg) + 2 DS$, donde $xDO(neg)$ y DS corresponden al promedio de densidades ópticas obtenidas y su desviación estándar, para los

individuos seronegativos. Para los sueros en diluciones 1/800 y 1/1.600, este valor corresponde a 0,902 y 0,528, respectivamente.

V.2 Estandarización de un ELISA para la detección de anticuerpos humanos de individuos seronegativos y seropositivos contra TcCRT recombinante (rTcCRT).

a. Sueros humanos: Descrito en punto V.1 a.

b. Calreticulina recombinante de *T. cruzi* (rTcCRT): Obtenida mediante procedimientos estándares. Brevemente, se usó *Escherichia coli* transformadas con un plasmidio, el cual tiene inserto el gen de la proteína de interés. Las bacterias se cultivaron en medio LB, por tiempo suficiente para permitir la adecuada síntesis protéica. Posteriormente las bacterias se lisaron por sonicación, el extracto fue centrifugado y el sobrenadante filtrado. Para la purificación de rTcCRT se usa una columna His-Bind™ (Novagen), la cual une en forma selectiva la proteína recombinante, por afinidad a níquel (**Ferreira et al., 2004**).

c. Sueros lapinos: Conejas provenientes del bioterio del ISP se inmunizaron con 150 µg de antígeno (rTcCRT) más coadyuvante de Freund. Las sangrías se obtuvieron desde la arteria central de la oreja. Esta sangre fue incubada y centrifugada dos veces para eliminar glóbulos rojos remanentes. El suero obtenido fue alicuotado y almacenado a –20°C (**Aguilar, 2003; Ramirez, 2005**)

d. Inmunosondas: Ambas purificadas por inmunoafinidad antigénica y conjugadas a peroxidasa.

d.1 IgG de cabra anti IgG de conejo (DAKO™ P0448).

d.2 IgG de conejo anti IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda humana (DAKO™ P0212).

e. Ensayo inmunoenzimático directo (Figura 5): Para medir la reactividad de sueros humanos con rTcCRT. Realizado, básicamente, como se describe en V.1.d, salvo que la sensibilización de la fase sólida se realizó con 100 μ l de rTcCRT en PBS 1x, en una concentración de 5 μ g/ml. y las diluciones de los sueros en estudio fueron de 1/400 y 1/800. La lectura de los resultados se realizó a los 60 minutos. La reactividad de los sueros con PBS-SOYA determinó el ruido basal y permitió expresar los resultados en delta DO.

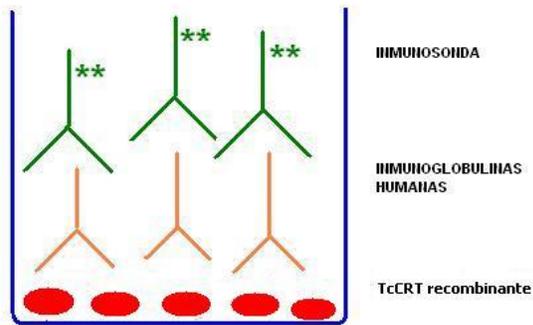


Figura 5: Ensayo inmunoenzimático directo. La placa se sensibilizó con rTcCRT, posteriormente se agregó los sueros humanos. Las inmunoglobulinas humanas se detectan a través de la inmunosonda.

f. Análisis estadístico: Para determinar si existe una diferencia significativa entre dos variables relevantes, el valor de p se determinó mediante la prueba t de una cola.

V.3 Estandarización de un ELISA para la detección de anticuerpos humanos de individuos seronegativos y seropositivos contra rTcCRT, capturada con un anticuerpo monoclonal.

a. Anticuerpo monoclonal (AcMo) contra TcCRT (E2G7): Para la generación de este anticuerpo se utilizó la sublínea de mieloma BALB/c P3/x63.Ag8.653. El AcMo fue purificado desde ascitis de ratón por cromatografía de afinidad en Sefarosa-proteína G (Aguillón *et al.*, 1997).

b. Calreticulina recombinante de *T. cruzi* (rTcCRT): Descrito en el punto V.2 b.

c. Sueros lapinos: descrito en el punto V.2 c.

d. Inmunosondas: Descritas en V.2.d. Además se usó IgG de cabra, conjugada a peroxidasa, anti IgG humana, absorbida con inmunoglobulinas murinas (Santa Cruz Biotechnology™ SC-2907).

e. Ensayo inmunoenzimático indirecto o de captura (Figura 6): Para medir reactividad de los sueros con rTcCRT, capturada con el anticuerpo E2G7. Realizado, básicamente, como se describe en V.1.d, salvo que la fase sólida fue sensibilizada con 100 µl por pocillo de E2G7 (15 µg/ml) en PBS 1x, durante toda la noche a 4°C. Luego se agregó 100 µl por pocillo de rTcCRT (10 µg/ml) PBS-SOYA TWEEN 0,05% v/v y se incubó por 1 hora a 37°C. La incubación con los sueros humanos en estudio se realizó como se describe en V.2.d. Finalmente se agregó 100 µl por pocillo de inmunoglobulina de cabra anti inmunoglobulinas humanas, absorbida con inmunoglobulinas murinas, en dilución 1/20.000 en PBS-SOYA TWEEN 0,05% v/v. La lectura de resultados se realizó a los 60 minutos. En este ensayo la reactividad de los sueros con E2G7 determinó el ruido basal y permitió expresar los resultados en delta DO.

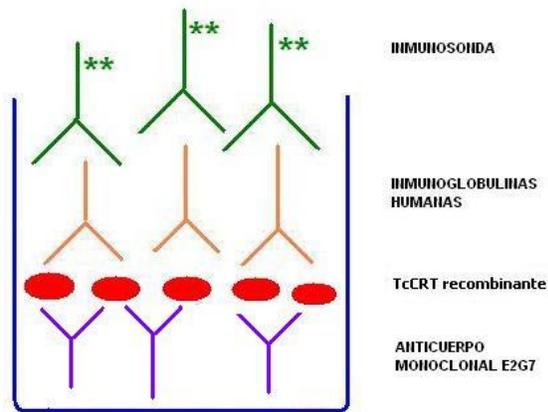


Figura 6: Ensayo inmunoenzimático indirecto o de captura. La placa se sensibilizó con E2G7, para capturar rTcCRT. Posteriormente se agregó los sueros humanos. Las inmunoglobulinas humanas se detectaron a través de la inmunosonda.

V.4 Validar el uso de anticuerpos policlonales anti rTcCRT, como agentes de captura de la proteína recombinante y de su contraparte nativa (nTcCRT).

- a. **Calreticulina recombinante de *T. cruzi* (rTcCRT):** descrito en el punto V.2 b
- b. **Calreticulina nativa de *T. cruzi* (nTcCRT):** Brevemente, la proteína nativa se purificó mediante cromatografía de afinidad en una columna de Sepharosa activada con bromuro de cianógeno, acoplada con anticuerpos policlonales dirigidos contra TcCRT. La columna se equilibró con PBS y se cargó con extracto completo de epimastigotes. Después se incubó a 4°C por toda la noche en constante agitación. Posteriormente se hizo una elución con glicina 0,1M – HCl 0,1M pH 2,8. La presencia de nTcCRT en el eluido obtenido se determinó mediante “immunowesternblotting” (Aguilar, 2003).
- c. **Inmunoglobulinas policlonales de conejo anti rTcCRT:** La precipitación de inmunoglobulinas presentes en el suero policlonal lapino se realizó con

sulfato de amonio, método que remueve moléculas de agua de las proteínas por competencia, disminuyendo su solubilidad, lo que desencadena su precipitación. Se agregó una solución de sulfato de amonio, hasta alcanzar un 40% de saturación, en forma lenta y mezclando. Se incubó toda la noche a 4°C, se centrifugó, se extrajo el sobrenadante, y el pellet resultante se resuspendió y dializó exhaustivamente

d. Inmunosonda: IgG de conejo, conjugada a peroxidasa, anti inmunoglobulinas murinas (BIODESIGN™ W99188P).

e. Ensayo inmunoenzimático de captura: Para medir reactividad de sueros humanos selectos, con rTcCRT y nTcCRT, presente en extracto de epimastigotes, capturadas por inmunoglobulinas policlonales lapinas. Realizado básicamente según se describe en el punto V.1.d, con las siguientes excepciones:

- Sensibilización de la fase sólida: 100 µl por pocillo de inmunoglobulinas policlonales lapinas en una concentración de 20 µg/ml en PBS 1x. La sensibilización se realizó por toda la noche a 4°C.
- Antígeno: En el caso de extracto de epimastigotes se agregó 100 µg/ml, mientras que para rTcCRT se usó 2 µg/ml. Se incubó por 1 hora a 37°C.
- Incubación con sueros problema: se usaron diluidos 1/400 en PBS-SOYA TWEEN 0,05%v/v. La incubación se realizó por 1 hora a 37°C.
- Incubación con inmunoglobulina reveladora: se agregó inmunoglobulina de conejo anti inmunoglobulinas humanas en dilución de 1/2.000 en PBS-SOYA TWEEN 0,05% v/v. Se incubó 1 hora a 37°C.

La reactividad de los sueros humanos con inmunoglobulinas policlonales lapinas determinó el ruido basal y permitió expresar los resultados en delta DO.

V.5 Definir el valor de anticuerpos policlonales anti rTcCRT, como fuente de captura antigénica en ELISA.

a. Extracto de epimastigotes: Descrito en punto V.1.b.

b. Inmunosonda: IgG de conejo, conjugada a peroxidasa, anti IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda humana (DAKO™ P0212).

c. Inmunoglobulinas policlonales de conejo anti rTcCRT: Descrito en punto V.4.c.

d. Inmunoglobulinas policlonales de conejo inoculados sólo con coadyuvante de Freund: conejos controles fueron inoculados con coadyuvante de Freund, en la misma dosis usada para las inmunizaciones que incluyeron rTcCRT como antígeno. La precipitación de las inmunoglobulinas presentes en el suero policlonal se realizó de la misma forma descrita en V.4.c.

e. Ensayo inmunoenzimático de captura: Para medir reactividad de sueros humanos con nTcCRT, capturada con inmunoglobulinas policlonales lapinas desde extracto completo de epimastigotes. Realizado con el mismo método descrito en el punto V.4.e, con la diferencia de que se evaluó la reactividad de los sueros sólo con nTcCRT presente en extracto parasitario, y no con rTcCRT.

f. Determinación del valor de corte: El valor de corte (VC) para discriminar entre los sueros seropositivos y seronegativos a *T. cruzi*, se determinó en base a la expresión $VC = xDO(neg) + 2 DS$, donde $xDO(neg)$ y DS corresponden al promedio de densidades ópticas obtenidas y su desviación estándar, para los individuos seronegativos. El VC obtenido fue 0,0142.

V.6 Relación entre el ensayo de ELISA directo con extracto completo de epimastigotes y el ELISA de captura de rTcCRT, con el anticuerpo monoclonal E2G7.

a. Determinación del valor de corte (VC), para ensayo directo con extracto de epimastigotes: Según se describe en V.1.e

En el caso del ensayo indirecto, el VC se obtuvo mediante una prueba t, en que se generó un valor de p para los triplicados de cada suero analizado. Dos valores de p significativos consecutivos identificaron el VC.

VI. RESULTADOS

VI.1. Reactividad contra extracto completo de epimastigotes de sueros humanos seropositivos y seronegativos a *T. cruzi*.

Las **Figuras 7A y 7B** muestran un “ranking” de reactividad, contra extracto completo de epimastigotes, de 24 sueros seropositivos y 24 seronegativos, respectivamente. Al establecer el VC y expresar los resultados como DO, todos los sueros clasificados como seropositivos o seronegativos por el método de IFI (ISP) se comportaron como tales con el criterio de reactividad con extracto parasitario. Concordante con estos resultados, en las **Figuras 7C y 7D**, se resume lo obtenido con otros 12 sueros positivos y 12 negativos, usados en una dilución inferior a la de los experimentos resumidos en las Figuras 7A Y 7B.

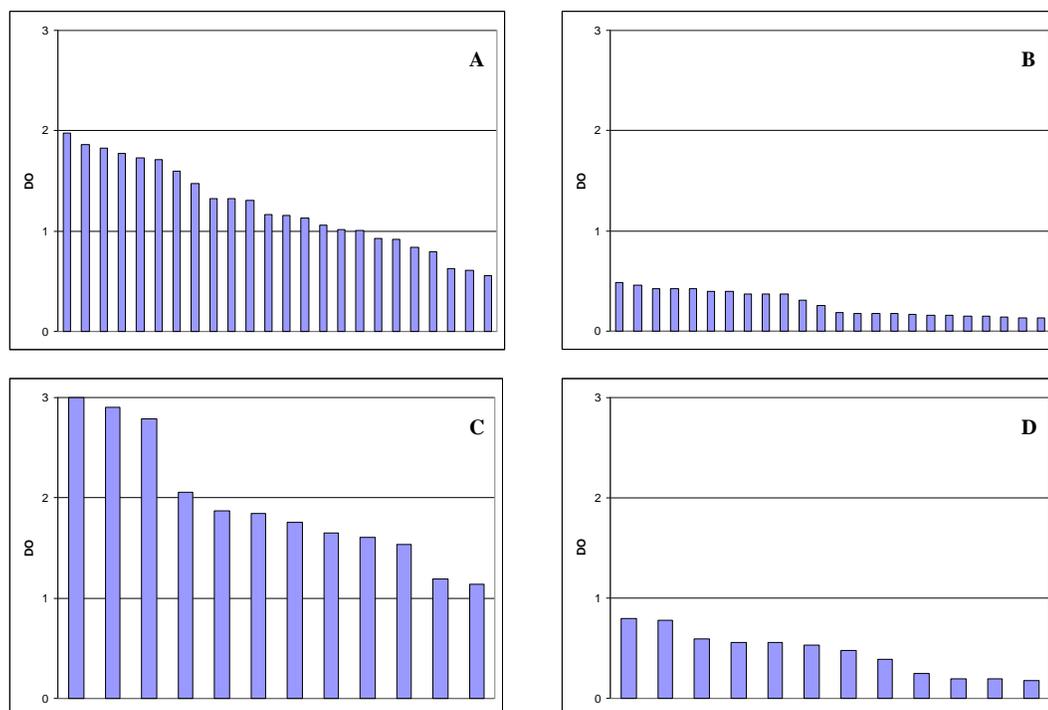


Figura 7: “Ranking” de reactividad, en ELISA directo, de sueros humanos positivos y negativos contra extracto de epimastigotes de *T. cruzi*. Sueros positivos (A y C) y negativos (B y D), en diluciones de 1/1.600 (A y B) y 1/800 (C y D). Cada barra representa un individuo.

VI.2. Estandarización de un ELISA directo para la detección de anticuerpos humanos de individuos seropositivos y seronegativos contra TcCRT recombinante (rTcCRT).

VI.2.1 Reactividad de sueros lapinos inmunes, contra rTcCRT en ELISA directo.

Al analizar preliminarmente sueros lapinos inmunes contra rTcCRT, en cuanto a sus reactividades con la molécula homóloga, en ELISA directo, se demostró la antigenicidad del inmunógeno en este ensayo, como se observa en la **Figura 8**.

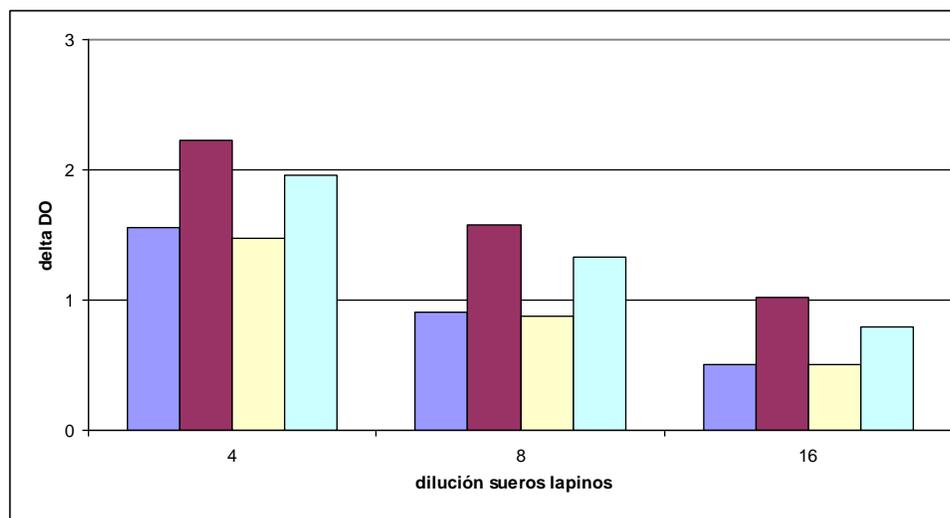


Figura 8: ELISA directo para la detección de anticuerpos de conejos inmunizados con TcCRT recombinante (rTcCRT). Sueros de cuatro conejos inmunes (identificados por cada barra, de izquierda a derecha, en cada conjunto). Los valores indicados en la abcisa corresponden al \log_2 de la dilución ($\times 10^{-4}$).

VI.2.2 Titulación de sueros humanos selectos, positivos y negativos, en su reactividad contra rTcCRT en ensayo directo.

Debido a lo limitante de los volúmenes de sueros humanos disponibles, fue necesario titular sueros seropositivos y seronegativos selectos, en su reactividad contra rTcCRT en ensayo directo, en diluciones \log_2 (1/200 - 1/6.400). Para los siguientes experimentos, se eligió 1/400, en un compromiso entre economía y sensibilidad.

VI.2.3 Reactividad de sueros humanos positivos y negativos con rTcCRT en ensayo de ELISA directo.

En el ensayo directo con rTcCRT, tanto los sueros seropositivos (**Figura 9A**) como los seronegativos (**Figura 9B**), presentaron una reactividad moderada, no discriminatoria entre los dos grupos ($p = 0,12$).

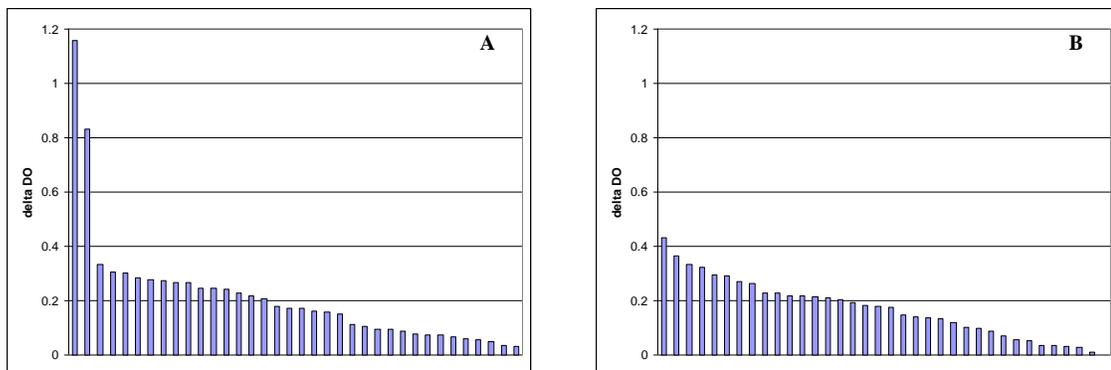


Figura 9: “Ranking” de reactividad, en ELISA directo, de sueros humanos positivos y negativos (criterio ISP) contra rTcCRT. Sueros positivos (A) y negativos (B). Cada barra representa un individuo.

VI.3. Estandarización de un ELISA para la detección de anticuerpos humanos reactivos con rTcCRT. Sueros humanos positivos y negativos se hicieron reaccionar con rTcCRT, capturada con el anticuerpo monoclonal E2G7.

VI.3.1 Determinación de la concentración necesaria de rTcCRT.

Se evaluó la reactividad de distintas diluciones de un suero lapino, preinmune e inmunizado con rTcCRT, con distintas concentraciones del inmunógeno, capturado con E2G7. Se observó que 10 $\mu\text{g/ml}$ es la concentración de rTcCRT que mejor discrimina entre las distintas diluciones del suero (**Figura 10**).

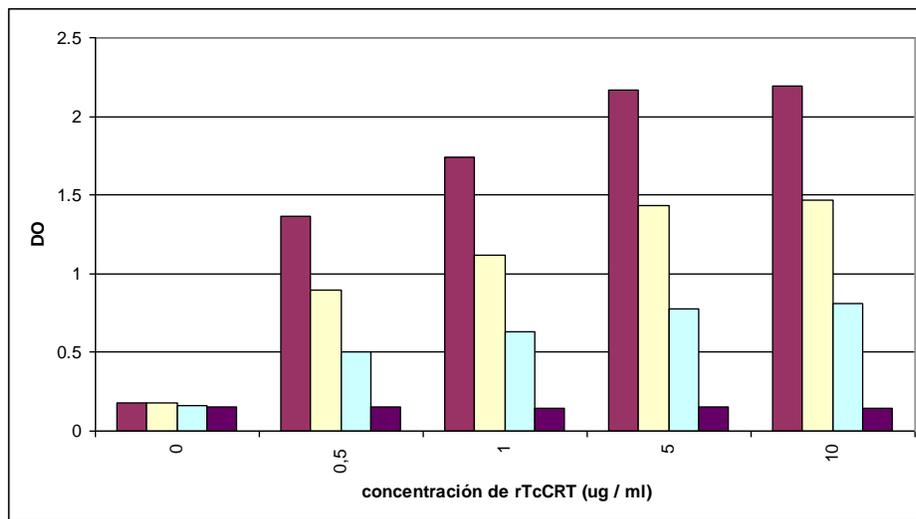


Figura 10: ELISA indirecto para determinar la concentración de rTcCRT a utilizar en el ensayo de captura. Las barras representan, de izquierda a derecha, los valores obtenidos en presencia de suero de conejo preinmune, y en diluciones de 1/80.000, 1/160.000 y 1/320.000.

VI.3.2 Comparación de la reactividad de sueros humanos selectos en el ensayo directo y de captura con rTcCRT. Determinación de la dilución adecuada de la inmunosonda a usar en el ensayo de captura.

En base a los resultados resumidos en la **Figura 9**, se seleccionó 2 sueros positivos, altamente reactivos, y 2 negativos, uno de alta y otro de mediana reactividad. Estos fueron comparados simultáneamente en su reactividad, en ensayos directo y de captura. Se observó que la reactividad de los sueros fue mayor en el ensayo de captura (indirecto). En este mismo experimento se evaluaron tres concentraciones diferentes del anticuerpo conjugado (IgG de conejo anti inmunoglobulinas humanas), y se definió que la concentración 1/2.000 fue la más adecuada para ser usada en el ensayo indirecto (**Figuras 11A y 11B**).

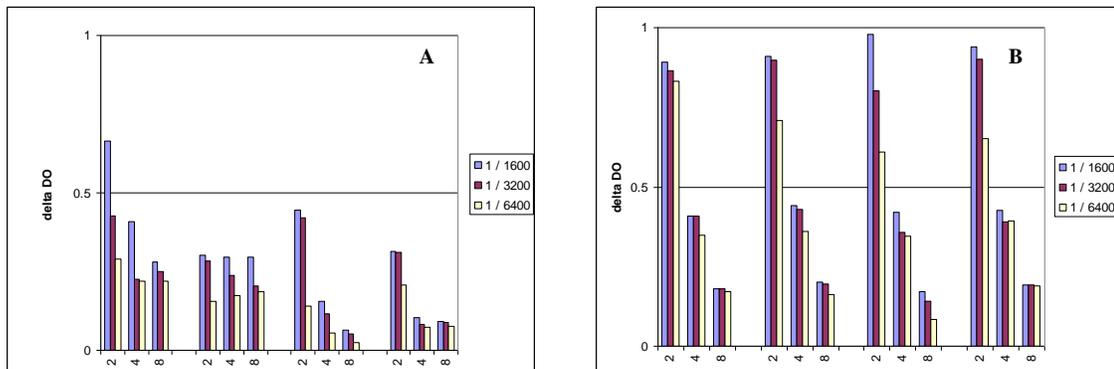


Figura 11: Comparación entre la reactividad de sueros humanos selectos en ELISA directo y ELISA indirecto. Ensayo directo, A. Ensayo indirecto, B. Los conjuntos de nueve barras, de izquierda a derecha, representan dos sueros positivos de alta reactividad, y dos sueros negativos, de alta y mediana reactividad, definidos en el ensayo directo mostrado en la **Figura 9**. Cada subconjunto de tres barras representa distintas diluciones de un suero humano. Los valores indicados en la abcisa corresponden al log₂ de la dilución (x 10⁻³).

VI.3.3 Reactividad contra rTcCRT de sueros humanos positivos y negativos, en ensayos de ELISA indirecto.

Posterior a la estandarización del ensayo de captura, los sueros humanos seropositivos y seronegativos fueron analizados por este método. Se observó un aumento en la reactividad con rTcCRT al estar capturada con el anticuerpo monoclonal (**Figuras 12A y 12B**).

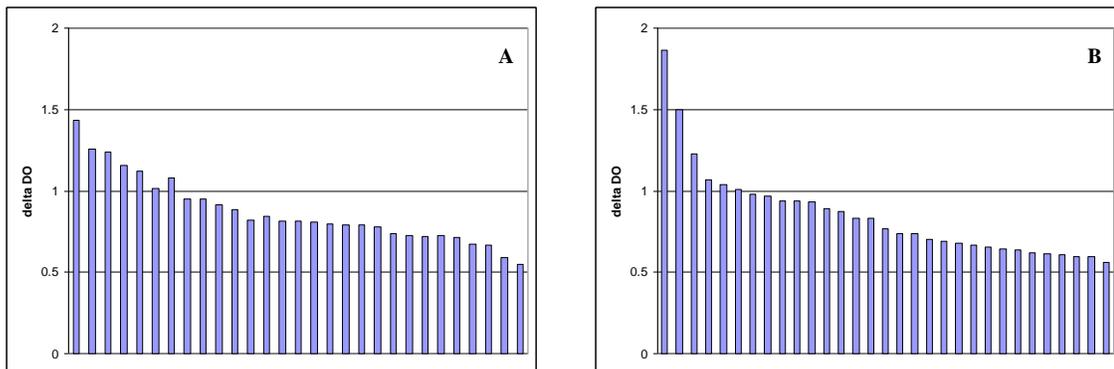


Figura 12: “Ranking” de reactividad en ELISA indirecto de sueros humanos positivos y negativos contra rTcCRT. Sueros positivos (A) y negativos (B). Cada barra representa un individuo.

VI.3.4 Sensibilidad del ELISA de captura.

Para visualizar mejor la sensibilidad del sistema, y considerando los resultados resumidos en la **Figura 12**, se seleccionaron 4 sueros positivos y 4 negativos, de alta y baja reactividad, para reanalizarlos en el ensayo de captura. Esto permitió observar reactividad indeseada contra el anticuerpo monoclonal E2G7, como se resume en las **Figuras 13A y 13B**.

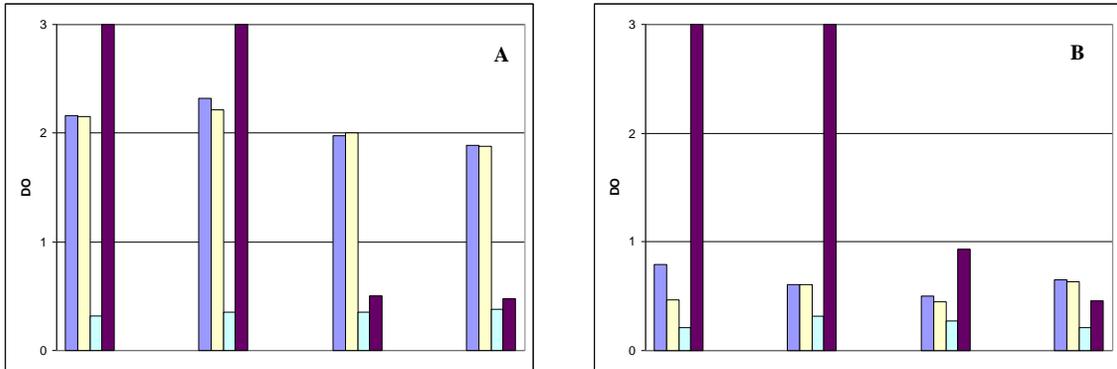


Figura 13: Análisis de la reactividad de sueros humanos positivos y negativos, con rTcCRT, en ELISA indirecto. Se analizaron sueros positivos y negativos de alta reactividad (A), y de baja reactividad (B) en el ensayo de captura, mostrado en la **Figura 12**. Las barras de cada conjunto, de izquierda a derecha, representan reactividad con rTcCRT capturada por E2G7, con E2G7 solo, con PBS-SOYA y con extracto de epimastigotes. Cada conjunto de barras representa un suero humano, los dos primeros conjuntos de cada figura corresponden a sueros positivos y los dos siguientes a sueros negativos.

VI.3.5 Determinación del origen de la reactividad contra E2G7.

Para determinar el origen de la reactividad contra E2G7, se analizó la inmunosonda utilizada en este ensayo (IgG de conejo anti inmunoglobulinas humanas). Como se observa en la **Figura 14**, al aumentar la concentración de E2G7, se observa un incremento proporcional de la reactividad con la inmunosonda.

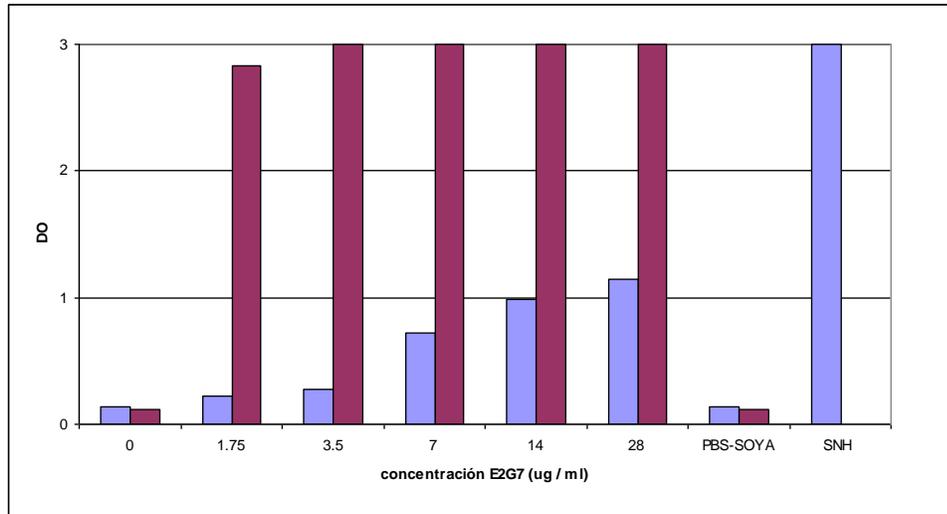


Figura 14: ELISA directo para medir reactividad de IgG de conejo anti inunoglobulinas humanas, con el anticuerpo monoclonal E2G7. Concentraciones expresadas en \log_2 de la dilución, los controles fueron PBS-SOYA y un suero normal humano (SNH). La reactividad de la inmunosonda (IgG de conejo anti inunoglobulinas humanas), con E2G7, se representa en la primera barra de cada conjunto. Como control (2^o barra), se incluyó IgG de cabra anti IgG de ratón.

VI.3.6 Análisis de una nueva inmunosonda, IgG de cabra anti IgG humana, absorbida con inunoglobulinas murinas.

Para eliminar la reactividad contra E2G7 de la IgG de conejo anti inunoglobulinas humanas, se usó una IgG de cabra anti IgG humana, absorbida con inunoglobulinas murinas. Los resultados se resumen en la **Figura 15**. Se observa una drástica disminución de la reactividad cruzada indeseada.

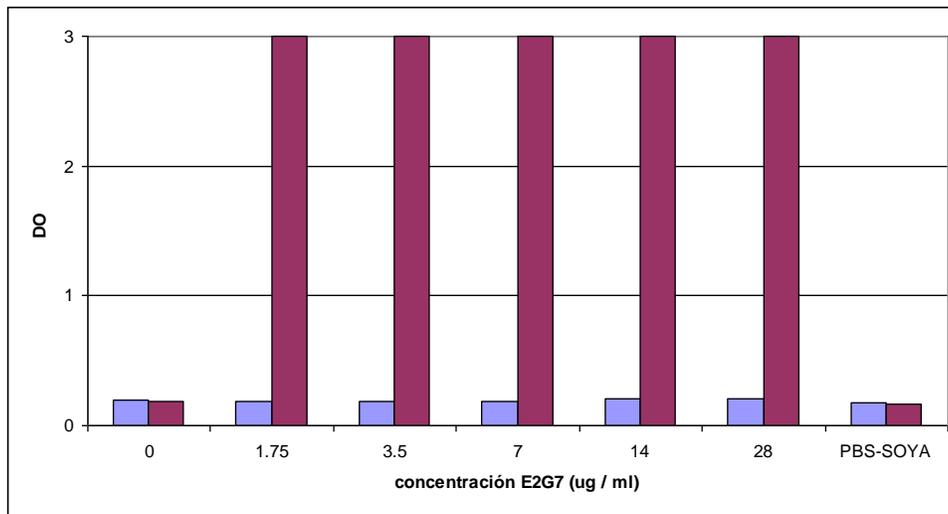


Figura 15: ELISA directo para medir reactividad con E2G7, de IgG de cabra, absorbida con inmunoglobulinas murinas, anti IgG humana. Concentraciones \log_2 de la dilución y control PBS-SOYA. La reactividad de la inmunosonda con E2G7, se representa en la primera barra de cada conjunto. Como control (2ª barra), se incluyó IgG de cabra anti IgG de ratón.

Luego, se evaluó la actividad biológica remanente de la IgG de cabra, absorbida con inmunoglobulinas murinas, anti IgG humana. Se observa que el reactivo mantuvo su reconocimiento de las inmunoglobulinas humanas, como se observa en la **Figura 16**.

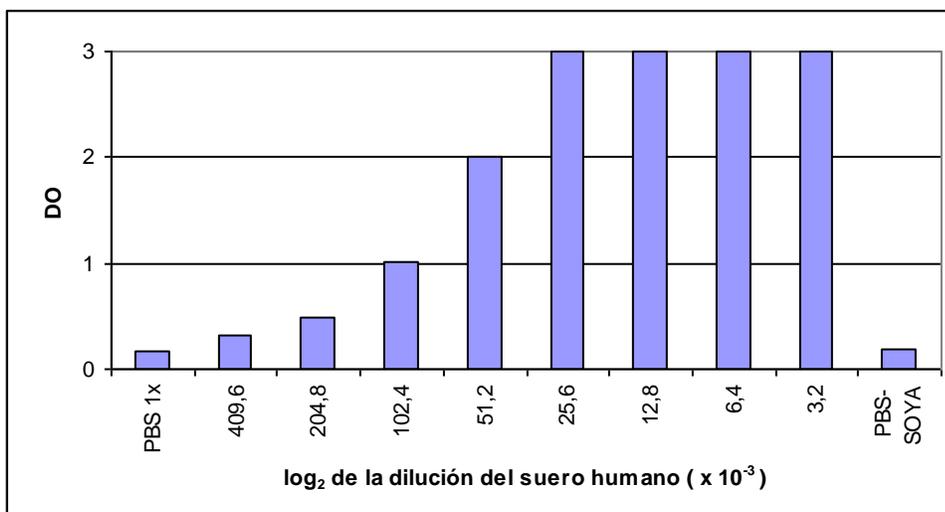


Figura 16: ELISA directo para medir reactividad con un suero humano de IgG de cabra, absorbida con inmunoglobulinas murinas, anti IgG humana. Control PBS-SOYA. Las barras representan la reactividad de la inmunosonda.

VI.3.7 Reactividad de sueros humanos positivos y negativos contra rTcCRT en ensayo de ELISA indirecto, usando como inmunosonda IgG de cabra, absorbida con inmunoglobulinas murinas anti IgG humana.

Después de validar la inmunosonda anti IgG humana, absorbida con inmunoglobulinas murinas, se repitió el ensayo de captura de rTcCRT con E2G7. TcCRT capturado en esta matriz sólida, se hizo reaccionar con los sueros humanos positivos y negativos (**Figuras 17A y 17B**). Estos resultados deben compararse con aquellos mostrados en las **Figuras 12A y 12B**.

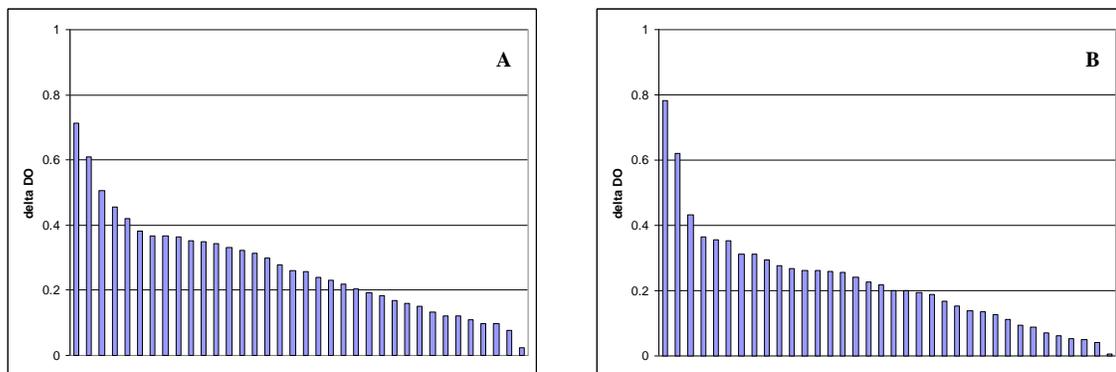


Figura 17: “Ranking” de reactividad en ELISA indirecto de sueros humanos positivos y negativos con rTcCRT. Sueros positivos (A) y negativos (B). Cada barra representa un individuo. Como inmunosonda se usó IgG de cabra anti IgG humana, absorbida con inmunoglobulinas murinas.

VI.3.8 Análisis de un suero negativo que presentó alta reactividad en el ensayo de captura mostrado en la Figura 17.

Como se aprecia en la **Figura 17B**, un suero negativo (SNH 26), mostró una elevada reactividad en el ensayo de captura. El suero fue reanalizado, y se observó una elevada reactividad con el anticuerpo monoclonal E2G7 (**Figura 18**).

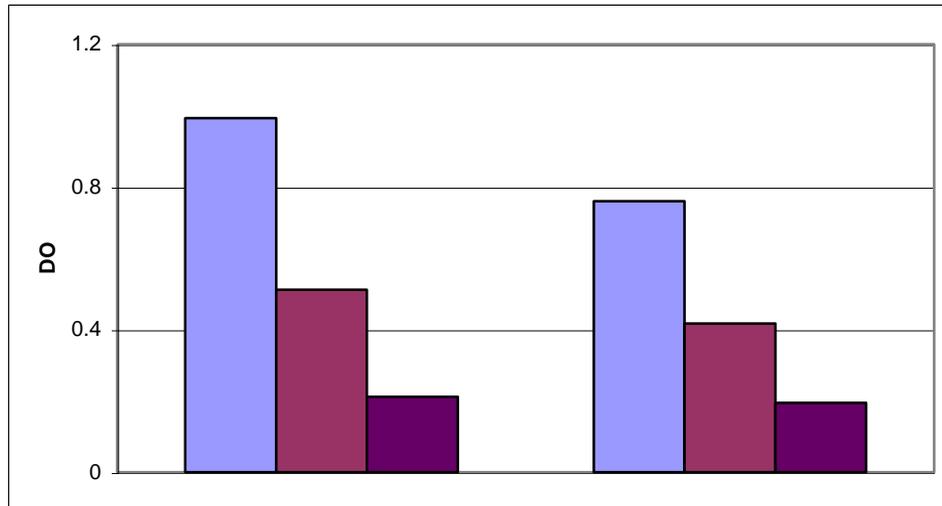


Figura 18: Análisis de la reactividad de un suero humano negativo con rTcCRT, ELISA indirecto. Las barras de cada conjunto, de izquierda a derecha, representan reactividad con rTcCRT capturada con E2G7, con E2G7 solo, y con PBS-SOYA. Cada conjunto de barras representa una dilución del suero analizado, el primero 1/400 y el segundo 1/800.

VI.3.9 Reactividad de sueros humanos positivos y negativos con rTcCRT en ensayo de ELISA indirecto, usando como inmunosonda IgG de cabra, absorbida con inmunoglobulinas murinas, anti IgG humana, y determinando el ruido basal según la reactividad de cada suero con E2G7.

Después de comprobar que los sueros humanos son capaces de reaccionar con el anticuerpo monoclonal E2G7, éstos fueron reevaluados en el ensayo de captura, pero la determinación del ruido basal se hizo en base a la reactividad de cada suero con el anticuerpo monoclonal E2G7 (**Figura 19**).

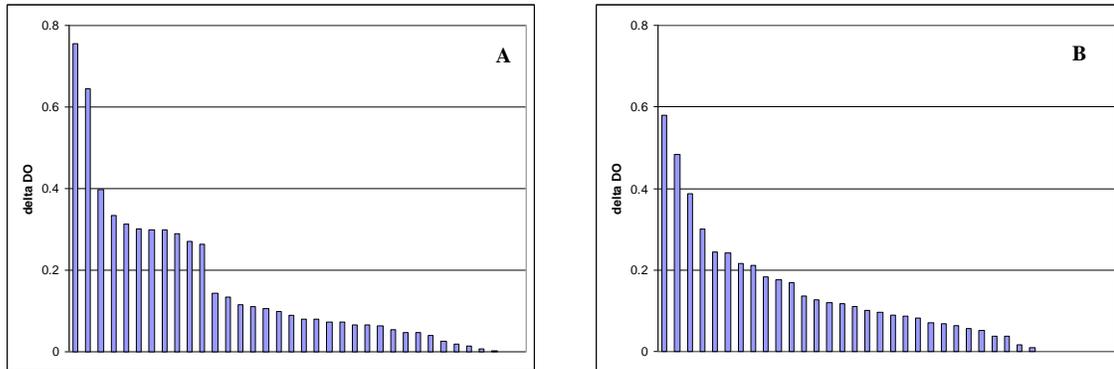


Figura 19: “Ranking” de reactividad en ELISA indirecto de sueros humanos positivos y negativos con rTcCRT. Sueros positivos (A) y negativos (B). Cada barra representa un individuo. Como inmunosonda se usó IgG de cabra, absorbida con inmunoglobulinas murinas, anti IgG humana. El ruido basal fue determinado en base a la reactividad de cada suero con E2G7.

El que rTcCRT es efectivamente capturada en este sistema, se demuestra en los resultados resumidos en la Figura 10.

VI.4 Validación del uso de anticuerpos policlonales anti rTcCRT, como agentes de captura de la proteína recombinante y de su contraparte nativa (nTcCRT).

VI.4.1 ¿Detecta E2G7 rTcCRT o nTcCRT capturada por anticuerpos policlonales?

Se usó anticuerpos policlonales lapinos anti rTcCRT, unidos a la fase sólida, para intentar capturar rTcCRT y nTcCRT (presente esta última en extracto de epimastigotes). A pesar que el anticuerpo monoclonal E2G7 generó una alta señal con la proteína recombinante, no detectó proteína nativa en este sistema (**Figura 20**).

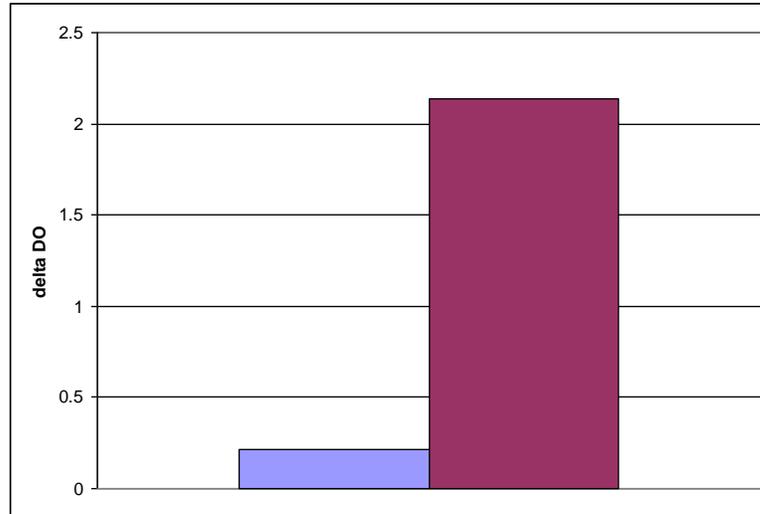


Figura 20: E2G7 detecta rTcCRT capturada por anticuerpos policlonales. La primera barra representa la reactividad de E2G7 con los pocillos tratados con extracto parasitario, la segunda con rTcCRT. La reactividad de E2G7 con inmunoglobulinas policlonales determinó el ruido basal, lo que permitió expresar los resultados en delta DO.

VI.4.2 Comparación de la reactividad, en ELISA, de sueros humanos selectos usando rTcCRT y extracto parasitario completo como fuentes antigénicas.

En base a los resultados resumidos en la **Figura 19**, se seleccionó dos sueros positivos y dos negativos de alta reactividad, y dos positivos y dos negativos de baja reactividad, para analizarlos en ELISA de captura con anticuerpos policlonales, usando como fuente antigénica rTcCRT y extracto de epimastigotes (**Figura 21**).

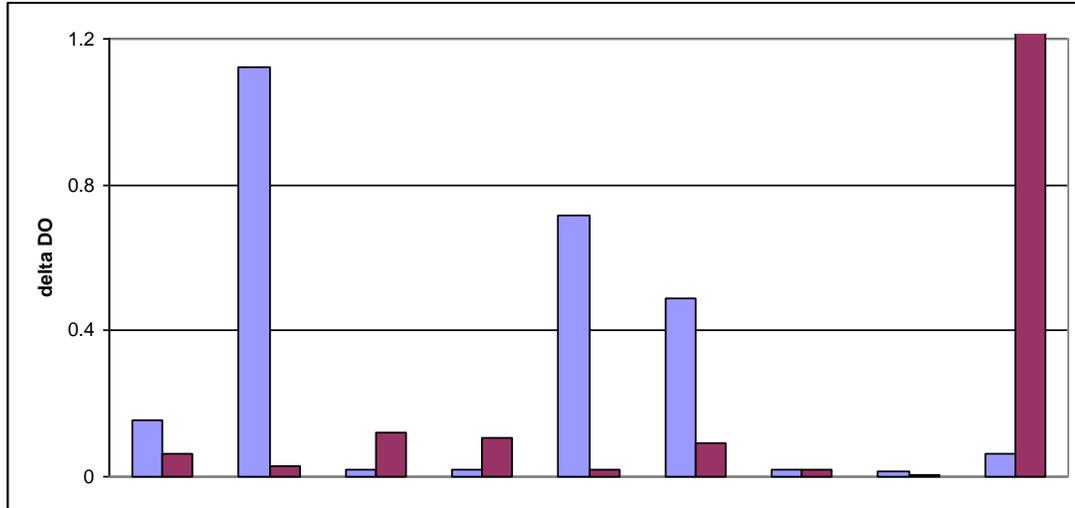


Figura 21: Análisis de la reactividad, en ELISA de captura con anticuerpos policlonales, de sueros humanos selectos, usando rTcCRT y extracto parasitario, como fuentes antigénicas. En cada conjunto de dos barras, la primera representa la reactividad de los sueros con los pocillos tratados con el extracto parasitario, mientras que la segunda representa la reactividad con rTcCRT. Los cuatro primeros conjuntos representan sueros humanos (dos positivos y dos negativos) de alta reactividad, y los cuatro siguientes (dos positivos y dos negativos) de baja reactividad. El último conjunto corresponde a la reactividad de E2G7, como control.

En este experimento preliminar se observa que, sólo cuando se usa el extracto parasitario como fuente antigénica, se produce una discriminación, concordante con los criterios de positividad, establecidos por la fuente nacional de referencia (ISP).

VI.5 Definición del valor de anticuerpos policlonales anti rTcCRT, como fuente de captura antigénica en ELISA.

VI.5.1 Reactividad de sueros humanos positivos y negativos usando extracto parasitario como fuente antigénica en ELISA de captura con anticuerpos policlonales anti rTcCRT.

Los resultados preliminares mostrados en la **Figura 21** sugirieron que la proteína nativa, capturada desde extracto parasitario con inmunoglobulinas policlonales, sería capaz de discriminar entre los individuos seronegativos y seropositivos. Este último ensayo nos llevó al análisis de reactividad de todos los sueros con este método, como muestra la **Figura 22**.

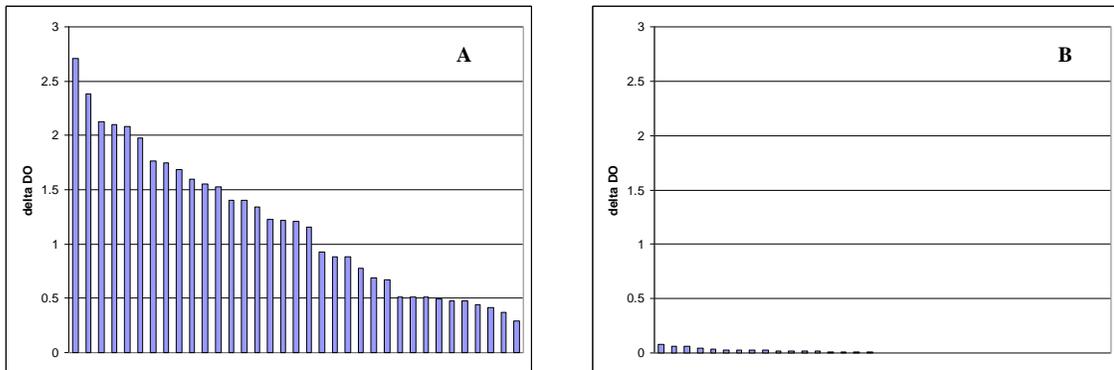


Figura 22: Ranking de reactividad en ELISA indirecto de sueros humanos positivos y negativos, usando como fuente antigénica extracto parasitario completo. Sueros positivos (A) y negativos (B) (criterio ISP). Cada barra representa un individuo. Como inmunosonda se usó IgG de conejo anti IgG humana. El ruido basal fue determinado en base a la reactividad de cada suero con inmunoglobulinas policlonales lapinas.

La Figura 22 muestra resultados concordantes con los presentados en la Figura 21.

VI.5.2 ¿Es nTcCRT, capturada por los anticuerpos policlonales lapinos, responsable de la discriminación entre sueros positivos y negativos?

Para comprobar que efectivamente el ensayo de captura con inmunoglobulinas policlonales lapinas fue capaz de discriminar entre ambos grupos de individuos en base a sus reactividades con nTcCRT, se realizó un ensayo en que se seleccionaron ocho sueros positivos y ocho sueros negativos. Éstos se reevaluaron en el mismo ensayo, incluyendo la reactividad de estos sueros con pocillos sensibilizados con inmunoglobulinas policlonales lapinas

generadas en animales inoculados sólo con coadyuvante de Freund (la misma dosis usada en las inmunizaciones que incluyeron rTcCRT como antígeno). La **Figura 23** muestra los resultados obtenidos.

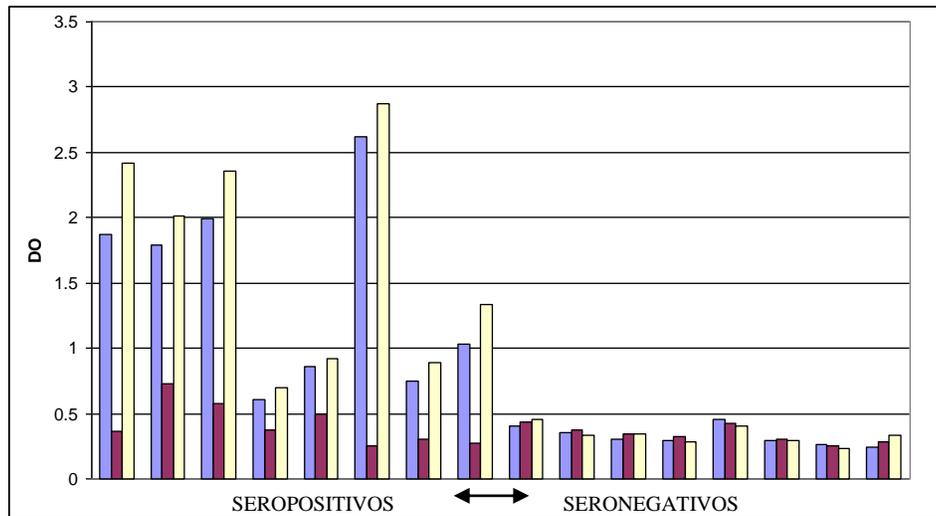


Figura 23: ELISA de sueros positivos y negativos en pocillos sensibilizados con inmunoglobulinas policlonales lapinas anti rTcCRT e inmunoglobulinas inespecíficas, ambos tratados con extracto parasitario, como fuente antigénica. Las tres barras de cada conjunto, de izquierda a derecha, representan: 1) la reactividad de los sueros humanos con los pocillos sensibilizados con inmunoglobulinas policlonales anti rTcCRT, seguido de extracto parasitario; 2) lo mismo que 1, pero sin extracto y, 3) con extracto parasitario capturado por inmunoglobulinas generadas en animales inoculados con coadyuvante de Freund. Cada conjunto de barras representa el resultado obtenido con un suero humano. Los ocho primeros conjuntos corresponden a sueros positivos y los ocho siguientes a sueros negativos (según criterio ISP).

Sorprendentemente, tanto el uso de inmunoglobulinas policlonales específicas como inespecíficas, discriminó entre los sueros positivos y negativos (ver discusión).

VI.6 Relación entre el ensayo de ELISA directo con extracto completo de epimastigotes y el ELISA de captura de rTcCRT, con el anticuerpo monoclonal E2G7.

Finalmente, los resultados mostrados en las **Figura 7** y **Figura 19**, pueden usarse para relacionar la reactividad de los sueros negativos y positivos, en los ensayos directo (extracto completo de epimastigotes) y de captura (rTcCRT). Aunque no hubo correlación entre ambos ensayos ($p > 0,05$), en las **Figuras 22A** y **22B**, representativas de dos experimentos independientes, se observa que el ELISA directo discrimina entre individuos seropositivos y seronegativos, mientras que el indirecto no discrimina entre estos individuos y señala la presencia de anticuerpos anti TcCRT, en individuos seronegativos (criterio ISP).

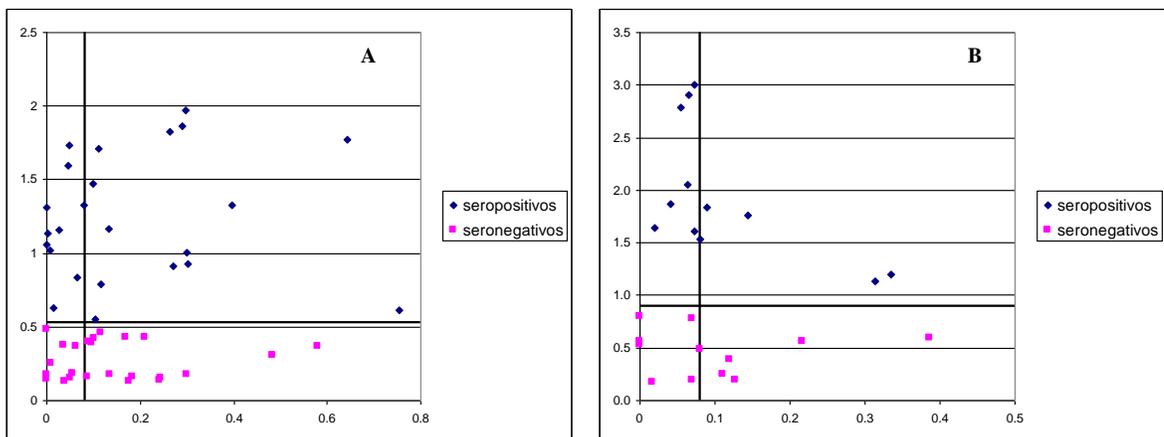


Figura 24: Relación entre el ensayo directo con extracto de epimastigotes y el ensayo de captura de rTcCRT con E2G7. En la abscisa se representan los resultados en delta DO para el ensayo de captura de rTcCRT, y en la ordenada los resultados en DO para el ensayo directo con extracto parasitario. Las rectas representan los valores de corte para cada ensayo. En la **Figura 24A** la dilución de los sueros evaluados con extracto parasitario es 1/1.600, y en la **Figura 24B**, la dilución es 1/800.

VII. DISCUSIÓN

La Enfermedad de Chagas está presente en una extensa área de Latinoamérica, pero las manifestaciones de la enfermedad y sus características epidemiológicas varían entre las zonas endémicas. Además, existe una amplia diferencia en la prevalencia, características parasitarias, patología clínica, vectores y reservorios. Más que cualquier otra enfermedad parasitaria, la Enfermedad de Chagas se relaciona al desarrollo social y económico.

La infección parasitaria está controlada por una respuesta inmune innata y por mecanismos específicos de inmunidad, tanto celulares como humorales. La respuesta humoral generada contra *T. cruzi* se basa en la producción de anticuerpos contra una serie de antígenos parasitarios. Es por esta razón que para la Enfermedad de Chagas el inmunodiagnóstico es de uso masivo, ya que la gran mayoría de los individuos infectados produce anticuerpos contra una gran variedad de antígenos parasitarios. La mayoría de estas pruebas convencionales utiliza una mezcla compleja de antígenos parasitarios (IHA y ELISA) o el parásito completo (IFI), lo que incrementa la capacidad de identificar la infección aunque los niveles de anticuerpos sean bajos, pero aumentan las probabilidades de obtener falsos positivos, debido a la presencia de reacciones cruzadas con otras parasitosis, como *Leishmania spp.* o *T. rangeli* (WHO, 2002).

Se recuerda que en esta Memoria de Título los términos “seropositividad” o “positividad” y “seronegatividad” o “negatividad”, se referirán al criterio usado por el ISP.

En relación a los inmunodiagnósticos convencionales, el ensayo ELISA directo, contra extracto completo de epimastigotes, fue capaz de detectar la heterogeneidad de una respuesta policlonal poliespecífica, contra al menos varias centenas de antígenos presentes en *T. cruzi* (Figura 7). Si bien esta respuesta discrimina entre seropositivos y seronegativos, es un hecho conocido que en

países donde existen otras tripanosomiasis, como *Leishmania*, *T.rangeli*, etc., este tipo de ensayo carece de especificidad suficiente. Sin embargo, en Chile, la ausencia de otras parasitosis convierte a este ensayo en un método diagnóstico útil. Resta determinar si la presencia de *Toxoplasma gondii* en Chile (aproximadamente infectando a un 25% de la población) (**Contreras et al, 1996**), afecta el resultado del ensayo directo contra extracto de epimastigotes, presentado aquí.

Muchos laboratorios están enfocando sus estudios en el desarrollo de pruebas serológicas no convencionales, las cuales se basan en la técnica de ELISA, y usan reactivos como proteínas recombinantes, antígenos purificados o péptidos sintéticos. Estos reactivos han sido desarrollados con el objetivo de aumentar la especificidad del diagnóstico serológico y evitar la reactividad cruzada con otras enfermedades parasitarias. Las pruebas usadas con más frecuencia utilizan antígenos recombinantes individuales o mezclas de ellos. Estas pruebas no convencionales pueden mostrar alta especificidad, pero su sensibilidad es menor que la de la serología convencional.

Basados en estos antecedentes, en esta Memoria de Título se evaluó la reactividad de sueros humanos infectados y no infectados con *T. cruzi*, en ensayos inmunométricos, con rTcCRT, proteína recombinante de este parásito, descrita y generada en nuestro laboratorio,

Previamente, se ha demostrado que TcCRT es inmunogénica, tanto en ratones como en humanos (**Ramos et al., 1991. Aguilón et al., 1997**). Además, al ser evaluada en ensayo ELISA directo, la proteína recombinante demuestra ser inmunogénica en el modelo lapino (Figura 8). También se demuestra que esta proteína recombinante es antigénica adsorbida en una matriz sólida. Esto permite prever que inmunoglobulinas presentes en sueros humanos reconocerán esta proteína en estas condiciones.

En concordancia con los resultados mostrados en la Figura 8, en el ensayo directo, los sueros humanos reconocieron rTcCRT adsorbida a una matriz sólida (Figura 9), aunque no hubo discriminación entre sueros positivos y negativos. Este resultado podría explicarse porque, de la respuesta policlonal generada en la infección parasitaria, se seleccionan sólo anticuerpos dirigidos contra un antígeno parasitario. Por ello, en contraste a lo observado en la Figura 7, no es posible discriminar entre sueros positivos y negativos. Quizás, el hecho que la proteína esté adsorbida a la placa, altere su configuración terciaria y por ende su antigenicidad (Nótese que en esta discusión usamos los términos antigenicidad e inmunogenicidad en sentido estricto).

Debido a los resultados obtenidos, se desarrolló un ensayo de ELISA indirecto o de captura, en que la proteína recombinante es presentada a los sueros humanos capturada con un anticuerpo monoclonal, E2G7. Para el desarrollo de este ensayo, se establece que la concentración de 10 µg/ml de rTcCRT, está dentro de los rangos habituales de antígeno para ser capturado por el anticuerpo monoclonal (Figura 10). Por cierto, este valor es variable según la concentración de anticuerpo que se use para la captura antigénica.

Nuevamente se hizo evidente que tanto los sueros positivos como negativos presentaron reactividad con rTcCRT, capturada con el anticuerpo monoclonal, o directamente adsorbida al fondo de la placa (Figura 11).

El ensayo de captura con todos los sueros disponibles, reafirmó el hecho que tanto sueros positivos como negativos reaccionarían por igual con rTcCRT (Figura 12). Estos resultados y los anteriores (Figura 11B), por ser inesperados, sugirieron la necesidad de investigar la posibilidad de reacciones inespecíficas. Entre éstas, se investigó la reactividad de la inmunosonda lapina y de las inmunoglobulinas humanas, con el anticuerpo monoclonal murino de captura, como se discutirá más adelante.

Efectivamente, el anticuerpo monoclonal E2G7 fue reconocido por la inmunosonda lapina y/o por las inmunoglobulinas humanas (Figura 13). La causa de esta reactividad es difícil de precisar. En el caso de los humanos, la reactividad con inmunoglobulinas murinas es frecuente. En el caso del conejo, el proceso de inmunización con inmunoglobulinas humanas, bien podría haber generado inmunidad cruzada contra la IgG murina.

En concordancia con esto, la inmunoglobulina lapina reconoció a la inmunoglobulina murina en una forma concentración dependiente (Figura 14). Se genera así un problema serio para la interpretación de algunos de nuestros resultados (Figuras 11B, 12A y 12B). Esto motivó el cambio de la inmunosonda lapina, a una nueva inmunosonda, IgG de cabra, absorbida con inmunoglobulinas murinas, anti IgG humana. Ésta no reconoció significativamente la IgG de ratón (Figura 15), pero sí IgG humanas (Figura 16). En este nuevo ensayo se probaron los sueros positivos y negativos disponibles y, aunque se observó una disminución en la intensidad de la reactividad, el sistema no discriminó entre sueros positivos y negativos (Figura 17). Por ende, persistió la interrogante sobre una posible reactividad de los sueros humanos con la IgG murina (Figura 18).

Dada la gran dificultad para eliminar la reactividad de estos sueros con la IgG murina, se decidió expresar los resultados de cada suero en un delta, que excluye esta reactividad. Considerando este criterio, la Figura 19 resume los resultados de la reactividad de los sueros positivos y negativos, en un ensayo de captura de rTcCRT con el anticuerpo monoclonal. Estos resultados mostraron, una vez más, que rTcCRT, no discrimina entre sueros positivos y negativos. Este resultado es *persé* interesante, pues el sistema inmunométrico ha sido depurado de reactividades inespecíficas. Se puede proponer, entonces, que las reactividades observadas corresponden al reconocimiento de la CRT parasitaria tanto por sueros positivos como negativos. Además, se observó una marcada heterogeneidad, en ambos grupos, en la reactividad con rTcCRT.

Existen numerosos factores que pueden influenciar la amplia variabilidad que se presenta en la reactividad de los individuos seropositivos, tales como: heterogeneidad genética (desde sexo hasta complejo HLA), cantidad del inóculo (número de parásitos), constitución genética de los parásitos inoculados (cepas y clones), oportunidad histórica de la infección, número de infecciones y frecuencia, entre otros **(Skamene, 1985)**.

Además, existen otros factores que pueden explicar estos resultados, tanto para individuos positivos como negativos. Los anticuerpos dirigidos contra rTcCRT pueden ser producto de la reactividad cruzada de anticuerpos dirigidos contra CRT de otros microorganismos, o incluso pueden ser autoanticuerpos dirigidos contra huCRT **(Sontheimer et al., 2003)**. Los autoanticuerpos pueden tener su origen en enfermedades autoinmunes, pero además, es importante considerar que existe en el organismo un nivel de autoanticuerpos circulantes fisiológico, denominados autoanticuerpos naturales **(Lacroix-Desmazes et al., 1988)**.

Por más de diez años, se ha descrito la existencia de autoanticuerpos contra CRT humana (huCRT) en presencia de desórdenes autoinmunes como Artritis Reumatoidea, Síndrome de Sjögren, Enfermedad Celíaca, Bloqueo Cardíaco Congénito Completo, Lupus Eritematoso Sistémico, Enfermedad de Behçet, entre otras **(Sontheimer et al., 2003)**. Dado que TcCRT y huCRT tienen una identidad de aprox. 50%, es posible que anticuerpos dirigidos contra huCRT, reaccionen en forma cruzada con TcCRT.

Estas enfermedades autoinmunes están presentes en Chile. Aunque no existen datos sobre la prevalencia de enfermedades autoinmunes en general, si existen datos acerca de la prevalencia de Artritis Reumatoidea, la cual afecta entre un 1 a 1,8% de la población, y de Lupus Eritematoso, del cual existen 15 a 50 casos por cada 100.000 habitantes. Es importante considerar que a nivel mundial, la Enfermedad de Sjögren es la segunda enfermedad reumatológica más común,

después de la Artritis Reumatoidea (**Base de Enfermedades de la Clínica Alemana**). Estos datos nos indican que existe la posibilidad que entre las muestras analizadas en esta Memoria de Título, se encuentren pacientes que presenten alguna de estas enfermedades, sin estar necesariamente infectados con *T. cruzi*.

En relación a los anticuerpos naturales, se ha descrito la presencia de anticuerpos en suero de individuos sanos en ausencia de inmunización con antígenos específicos. Caen, por lo tanto, en la categoría de anticuerpos naturales. Cuando los anticuerpos naturales reaccionan con antígenos propios, se les denomina autoanticuerpos naturales. Una serie de funciones se han propuesto para estos autoanticuerpos bajo condiciones fisiológicas, como inmunidad no específica (actuando como opsoninas), ayudar en el proceso de eliminación de productos del catabolismo, propiedades antiinflamatorias, entre otras (**Lacroix-Desmazes et al., 1998**).

Como en los ensayos inmunométricos descritos en este documento se usó como inmusonda anticuerpos dirigidos contra IgG humana molécula completa, podría esperarse una reactividad cruzada con anticuerpos naturales de clase IgM, producto de la comunidad de cadenas livianas kappa y lambda existente entre todas las clases de inmunoglobulinas (**Nisonoff, 1984**).

Los autoanticuerpos reconocen un set limitado de antígenos propios que son altamente conservados durante la evolución, compartidos entre individuos y conservados durante la vida. Se ha propuesto que los antígenos reconocidos por esos autoanticuerpos son esenciales para la selección del repertorio de células T y B, y para la mantención de la auto tolerancia (**Pashov et al., 2002**).

Tanto la prevalencia de enfermedades autoinmunes y los consecuentes autoanticuerpos generados, como la presencia de autoanticuerpos naturales, permiten postular que, tanto en las muestras negativas como positivas, estos

anticuerpos podrían jugar un rol en los resultados observados. Esto implica que los anticuerpos contra huCRT tendrían un cierto grado de reactividad con la CRT parasitaria usada en nuestros ensayos.

Los resultados obtenidos sugirieron la necesidad de validar la capacidad de inmunoglobulinas policlonales anti rTcCRT como agentes de captura específica de la proteína recombinante, y de la proteína nativa (esta última presente en un extracto de epimastigotes). Para esto se intentó capturar la proteína recombinante y la nativa, con anticuerpos policlonales semipurificados. Curiosamente, el anticuerpo monoclonal, a pesar de detectar la proteína recombinante, no detectó proteína nativa (Figura 20).

En un experimento piloto, se evaluó la reactividad de sueros humanos selectos, positivos y negativos, con pocillos sensibilizados con inmunoglobulinas policlonales lapinas anti rTcCRT, y tratados con extracto parasitario. Como se observó discriminación entre sueros positivos y negativos (Figura 21), fue necesario analizar todos los sueros mediante este método. Los resultados resumidos en la Figura 22, muestran una excelente discriminación entre ambos grupos de individuos (Figura 22).

Para una mejor validación del método utilizado, se evaluó la reactividad de sueros selectos con pocillos sensibilizados con inmunoglobulinas policlonales lapinas provenientes de animales inoculados con coadyuvante de Freund. Luego de tratar estos pocillos con extracto parasitario completo, se observó también una discriminación excepcional (Figura 23). Por lo tanto, no se puede postular que el excelente nivel de discriminación observado se deba a la reactividad con nTcCRT capturada por inmunoglobulinas policlonales lapinas específicas, desde el extracto de epimastigotes.

Estos resultados son paradójicos e inmunológicamente no convencionales. Es necesario recordar que, posterior a la sensibilización con

inmunoglobulinas policlonales, específicas anti rTcCRT o no, los sitios activos remanentes de la fase sólida fueron bloqueados con proteínas de soya. La efectividad de estas proteínas como agentes bloqueantes ha sido ya demostrada (**Aguillón et al., 1992**). Entre las posibles explicaciones para estos resultados pueden mencionarse: 1) reconocimiento de uno o más antígenos no identificados de *Mycobacterium bovis*, presentes en el coadyuvante de Freund completo, usado en la inmunización con rTcCRT y en los conejos controles. Así, en ambos grupos de conejos se generarían anticuerpos contra antígenos de *M. bovis* que reconocerían y capturarían antígenos de *T. cruzi*. Los anticuerpos de los individuos positivos reaccionarían en forma cruzada con estas moléculas putativas bacterianas. Aún así, debe señalarse que estas moléculas tendrían valor para detectar la seropositividad a *T. cruzi*, en humanos y, presumiblemente, en otras especies. 2) en *T. cruzi* existirían moléculas con afinidad importante por inmunoglobulinas (resisten 5 lavados con PBS-Tween 20 0,05% v/v). Esta situación se ha descrito en otros microorganismos, siendo ejemplos clásicos el de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (variedad Cowan 1) y el de la proteína G de *Streptococcus spp* (**Eliasson et al., 1989**). En ambos casos la proteína microbiana se une a la porción Fc de las inmunoglobulinas y, 3) no podemos descartar que las proteínas parasitarias que discriminan entre sueros humanos positivos y negativos, tengan afinidad por las proteínas bloqueadoras, en este caso proteína de soya. Al igual que lo propuesto en 1) para el caso de *M. bovis*, si son proteínas parasitarias las que discriminan, es evidente la importancia de identificarlas y caracterizarlas. Estas posibilidades se investigarán ya fuera del contexto de esta Memoria de Título.

Finalmente, se relacionó los resultados obtenidos con el ensayo directo con extracto parasitario (Figura 7), con el ensayo de captura de la proteína recombinante, con el anticuerpo monoclonal E2G7 (Figura 19). Se observó, nuevamente, que el ensayo directo con extracto parasitario completo discrimina seropositividad de seronegatividad (Figura 24), concordando con los resultados obtenidos en el Centro de Referencia Nacional (ISP). Estos resultados ilustraron

un nuevo hecho. Entre los sueros negativos hay un número importante de individuos que tienen niveles apreciables de anticuerpos contra TcCRT. Como se indicó anteriormente, estos anticuerpos, entre otras posibilidades, representarían reactividad cruzada con TcCRT generada por la presencia de anticuerpos contra huCRT, ya sea de causa autoinmune u otras, indeterminadas.

En síntesis, en esta Memoria de Título, se ha intentado evaluar la reactividad de sueros humanos seronegativos y seropositivos a *T. cruzi* con la CRT parasitaria. Los resultados principales señalan que, si bien es efectivo que en sueros humanos positivos existen anticuerpos contra TcCRT, estos representarían una fracción menor de los anticuerpos antiparasitarios totales, y que estos anticuerpos no son patrimonio sólo de los sueros positivos. Por otra parte, los resultados sugieren fuertemente que en el parásito existen otras moléculas inmunogénicas, contra las cuales hay anticuerpos específicos en los individuos positivos. Estas moléculas parasitarias presentan una fuerte afinidad no específica (en términos inmunológicos) por proteínas unidas a la fase sólida. Esas moléculas parasitarias, de acuerdo a los resultados presentados en esta Memoria de Título, tendrían un interesante valor diagnóstico, y las posibilidades de caracterizarlas debieran ser consideradas.

VIII. CONCLUSIONES

1. En sueros humanos positivos existen anticuerpos contra TcCRT.
2. Los anticuerpos anti TcCRT presentes en sueros humanos representarían una fracción menor de los anticuerpos antiparasitarios totales.
3. Los anticuerpos anti TcCRT no son patrimonio exclusivo de los sueros positivos.
4. En el parásito existen otras moléculas inmunogénicas, contra las cuales hay anticuerpos específicos en los individuos positivos.
5. Esas moléculas inmunogénicas presentan una fuerte afinidad no específica (en términos inmunológicos) por proteínas unidas a la fase sólida usada en los ensayos inmunométricos.
6. Estas moléculas parasitarias inmunogénicas tendrían un interesante valor diagnóstico, y las posibilidades de caracterizarlas debieran ser consideradas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

ACUÑA, M. 2002. La Vinchuca Silvestre: una amenaza latente? [en línea]. TECNOVET año 28 N° 2 s.p. World Wide Web:
<http://bellota.sisib.uchile.cl/Tecnovet/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9633%2526ISID%253D471,00.html#> [consulta 04 - 04 - 2005]

AGUILAR, L. 2003. Purificación por Inmunofinidad de Calreticulina nativa de *T. cruzi*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias. 53 pp.

AGUILLÓN, J.C.; CHIONG, M.; RAMOS, R.; VALLEJOS, P.; FERREIRA, A. 1992. Soybean proteins: Alternative blocking agents for immunoassays using nitrocellulose or plastic solid phases. Biol. Res. 25: 79 – 83.

AGUILLÓN, J.C.; HARRIS, R.; MOLINA, M.C.; COLOMBO, A.; CORTÉS, C.; HERMOSILLA, T.; CARREÑO, P.; ORN, A.; FERREIRA, A. 1997. Recognition of an immunogenetically selected *Trypanosoma cruzi* antigen by seropositive chagasic human sera. Acta Trop. 63(2-3): 159-166.

AGUILLÓN, J.C.; FERREIRA, L.; PÉREZ, C.; COLOMBO, A.; MOLINA, M.C.; WALLACE, A.; SOLARI, A.; CARVALLO, P.; GALINDO, M.; GALANTI, N.; ÖRN, A.; BILLETTA, R.; FERREIRA, A. 2000. Tc45, a dimorphic *Trypanosoma cruzi* immunogen with variable chromosomal localization, is calreticulín. Am. J. Trop. Med. Hyg. 63(5, 6): 306–312.

APT, W. 1999. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas. [en línea]. Parasitol. Día 23 (3-4):100 – 112. Word Wide Web:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-07201999000300007&lng=es&nrm=iso [consulta 03 - 03 - 2005].

ÁVILA, G.; MARTÍNEZ, M.; PONCE, C.; PONCE, E.; SOTO, R. 1997. La Enfermedad de Chagas en la zona central de Honduras: conocimientos, creencias y prácticas. Pan. Am. J. Public Health 3(3):158-163.

BASE DE ENFERMEDADES DE LA CLÍNICA ALEMANA. [en línea]. World Wide Web:
<<http://www.alemana.cl/benfermedad/ben001.asp>> [consulta 05 - 04 - 2005].

BARRET, M.; BURCHMORE, R.; STICH, A.; LAZZARI, J.; FRASCH, A.; CAZZULO, J.; KRISHNA, S. 2003. The trypanosomiasis. *The Lancet* 362: 1469 – 1480.

BULLETIN WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1974. Immunology of Chagas Disease. No authors listed. 50(5): 459-72.

CONTRERAS, M., SCHENONE, H., SALINAS, P., SANDOVAL, L., ROJAS, A., VILLARROEL, F., SOLIS, F. 1996. Seroepidemiology of human toxoplasmosis in Chile. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 38(6): 431-435.

DA SILVEIRA, J.F.; UMEZAWA, E.S.; LUQUETTI, A.O. 2001. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol.* 17(6): 286-291.

DIAS, J.C.; SCHOFIELD, C.J. 1999. The Evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Control after 90 Years since Carlos Chagas Discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94(I): 103-121.

DIAS J.C.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. 2002. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97(5): 603-612.

EGGLETON, P.; MICHALAK, M. 2003. Introduction to Calreticulin **In:** Calreticulin. 2nd ed. Kluwer Academic / Plenum Publishers. New York, USA. pp: 1 – 6.

ELIASSON, M.; ANDERSON, R.; OLSSON, A.; WIGZELL, H.; UHLEN, M. 1989. Differential IgG-binding characteristics of staphylococcal protein A, streptococcal protein G, and a chimeric protein AG. *J. Immunol.* 142(2): 575 – 581.

ENGVAL, E.; PERLMAN, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8(9): 871-874.

FERNÁNDEZ, M. 2002. Immunogenetics of Chagas` disease. *Immunología* 21(1): 21 – 28.

FERREIRA, A.W.; BELEM, Z.R.; LEMOS, E.A.; REED, S.G.; CAMPOS-NETO, A. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. J. Clin. Microbiol. 39(12): 4390-4395.

FERREIRA, V.; MOLINA, M.C.; VALCK, C.; ROJAS, A.; FERREIRA, A. 2002. Parasite calreticuline: possible roles in the parasite/host interface. Inmunología 21(3): 156 – 168.

FERREIRA, V.; VALCK, C.; SÁNCHEZ, G.; GINGRAS, A.; TZIMA, S.; MOLINA, M.C.; SIM, R.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A. 2004. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. 172(5): 3042-3050.

FRASCH, A.C. 2003. *Trypanosoma cruzi* surface proteins In: Tyler, K.; Miles, M. (Eds). World Class Parasites: American Trypanosomiasis. Kluwer Academic Publishers. Boston, USA. pp. 25 - 35.

GOMES, Y.M. 1997. PCR and sero-diagnosis of chronic Chagas' disease. Biotechnological advances. Appl. Biochem. Biotechnol. 66(2): 107 – 119.

GRUBER, A.; ZINGALES, B. 1993. *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. Exp. Parasitol. 76(1): 1-12.

GUZMÁN, E.; ZAVALA, J.; ACOSTA, K.; ROSADO, M. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Biomed. 10: 177-184.

HOUGHTON, R.L.; BENSON, D.R.; REYNOLDS, L.D.; MCNEILL, P.D.; SLEATH, P.R.; LODES, M.J.; SKEIKY, Y.A.; LEIBY, D.A.; BADARO, R.; REED, S.G. 1999. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. J. Infect. Dis. 179(5): 1226-1234.

KRAUTZ, G.M.; GALVAO, L.M.; CANCADO, J.R.; GUEVARA-ESPINOZA, A.; OUAISSI, A.; KRETTLI, A.U. 1995. Use of a 24-kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas' disease. J. Clin. Microbiol. 33(8): 2086-2090.

LABRIOLA, C.; CAZZULO, J.J.; PARODI, A.J. 1999. *Trypanosoma cruzi* calreticulin is a lectin that binds monoglucosylated oligosaccharides but not protein moieties of glycoproteins. *Mol. Biol. Cell.* 10(5): 1381-1394.

LACROIX-DESMAZES, S.; KAVERI, S.; MOUTHON, L.; AYOUBA, A.; MALANCHERE, E.; COUTINHO, A.; KAZATCHKINE, M. 1998. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *Journal of Immunological Methods* 216: 117 – 137.

LORCA, M. 2001. La Enfermedad de Chagas congénita, transfusional y otras vías en el contexto de la interrupción de la transmisión vectorial. [en línea]. Grupo de Trabajo OPS en Enfermedad de Chagas, Montevideo, Uruguay, Noviembre de 2001. World Wide Web:
<<http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/consulta-3.pdf>> [consulta 04 - 04 - 2005]

MARCELAIN, K.; COLOMBO, A.; MOLINA, M.C.; FERREIRA, L.; LORCA, M.; AGUILLÓN, J.C.; FERREIRA, A. 2000. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Trop.* 75(3): 291-300.

MOREL, C.M.; LAZDINS, J. 2003. Disease Watch. Focus: Chagas Disease. [en línea]. *Nature Reviews, Microbiology* 1(1): 14-15. World Wide Web:
<http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/nrmicro/journal/v1/n1/full/nrmicro735_fs.html&filetype=pdf> [consulta 12 - 04 - 2005]

NISONOFF, A. 1984. Properties and evolution of classes of antibodies **In:** Introduction to molecular immunology. 2nd ed. Sinauer associates, Inc. Massachusetts, USA. pp. 45 – 65.

OLEA, A. 1998. Enfermedad de Chagas en Chile: Situación Epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en Chile. [en línea]. Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud. World Wide Web:
<<http://epi.minsal.cl/epi/html/public/chagaschile.htm>> [consulta 04 - 04 - 2005]

PASHOV, A.; KENDEROV, A.; KYURKCHIEV, S.; KEHAYOV, I.; HRISTOVA, S.; LACROIX-DESMAZES, S.; GILTIAY, N.; VARAMBALLI, S.; KAZATCHKINE, M.D.; KAVERI, S.V. 2002. Autoantibodies to heat shock protein 90 in the human natural antibody repertoire. *Int. Immunol.* 14(5): 453-461.

PÉREZ, R.; SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ, C.; MONTEÓN, V.; REYES, P.; ROSALES, J. 1998. Humoral nitric oxide levels and antibody immune response of symptomatic and indeterminate Chagas' disease patients to commercial and autochthonous *Trypanosoma cruzi* antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58(6): 715–720.

RAMIREZ, G. 2005. Calreticulina de *Trypanosoma cruzi*: modulación, por fragmentos inmunoglobulínicos f(ab')₂, de su capacidad inhibitoria del sistema del complemento humano. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias. 77 pp.

RAMOS, R., JURI, M., RAMOS, A., HOECKER, G., LAVANDERO, S., PEÑA, P., MORELLO, A., REPETTO, Y., AGUILLÓN, J.C., FERREIRA, A. 1991. An immunogenetically defined and immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44(3): 314-322.

RASSI, A.; LUQUETTI, A.O. 2003. Specific treatment for *Trypanosoma cruzi* infection **In:** Tyler, K.; Miles, M. (Eds). *World Class Parasites: American Trypanosomiasis*. Kluwer Academic Publishers. Boston, USA. pp. 117 - 125.

SALOMONE, O.; BASQUEIRA, A.; SEMBAJ, A.; AGUERRI, A.M.; REYES, M.E.; OMELIANUK, M.; FERNÁNDEZ, R.; ENDERS, J.; PALMA, A.; MORENO, J.; MADOERY, R. 2003. *Trypanosoma cruzi* in persons without serologic evidence of disease, Argentina. *Emerging infectious diseases* 9(12): 1558 – 1561.

REYES, L.; SILESKY, E.; CERDAS, C.; CHINCHILLA, M.; GUERRERO, O. 2002. Presence of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in costa rican dogs. *Parasitol. Latinoam.* 57: 66 – 68.

SCOTT, M.T.; SNARY, D. 1982. American Trypanosomiasis (Chagas disease) **In:** Cohen S.; Warren, K. (Eds). *Immunology of Parasitic Infections*. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications. London, England. pp. 261 – 289.

SKAMENE, E. 1985. Genetic Control of Resistance to Parasitic Infections **In:** Progress in Leukocyte Biology, volume 3: Genetic Control of Host Resistance to Infection and Malignancy. Alan R. Liss, Inc. New York, USA. pp. 431 – 564.

SONTHEIMER, R.; RACILA, D.; RACILA, E.; EGGLETON, P.; DONNELLY, S. 2003. Calreticulin Role(s) in Autoimmune Disorders **In:** Eggleton, P.; Michalak, M. (Eds). Calreticulin 2nd ed. Kluwer Academic / Plenum Publishers. New York, USA. pp: 180 – 192.

TARLETON, R.L. 2003. *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease: cause and effect **In:** Tyler, K.; Miles, M. (Eds). World Class Parasites: American Trypanosomiasis. Kluwer Academic Publishers. Boston, USA. pp. 107 – 115.

TDR. 1999-2000. Fifteenth Programme Report Progress. Chagas Disease: multi-governmental initiatives. [en línea] World Wide Web: <<http://www.who.int/tdr/research/progress9900/partnerships/chagas.htm>> [consulta 04 – 04 - 2005].

THE MERCK VETERINARY MANUAL. 2005. 9th ed. Kahn C.M. (Ed). Merck Publishers. New Jersey, USA. pp. 35.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. 1988. Isoenzyme variability of *T. cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution 42: 277-292.

TYLER, K.; OLSON, C.; ENGMAN, D. 2003. The Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* **In:** Tyler, K.; Miles, M. (Eds). World Class Parasites: American Trypanosomiasis. Kluwer Academic Publishers. Boston, USA. pp. 1 – 12.

UMEZAWA, E.S.; LUQUETTI, A.O.; LEVITUS, G.; PONCE, C.; PONCE, E.; HENRIQUEZ, D.; REVOLLO, S.; ESPINOZA, B.; SOUSA, O.; KHAN, B.; DA SILVEIRA, J.F. 2004. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. J. Clin. Microbiol. 42(1): 449-452.

WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E. 1992. Rassi, A. (Edt). Chagas disease - american trypanosomiasis: it's impact on transfusion and clinical medicine. [en línea]. ISBT BRAZIL' 92. World Wide Web: <<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter.html>> [consulta 03 - 03 - 2005].

WHO. 2002. Expert Committee on The Control of Chagas Disease. Control of Chagas Disease: Second Report of the WHO Expert Committee. WHO, Geneva.

XIIa. Reunión Intergubernamental INCOSUR/Chagas. 2003. Evaluación Programa de Chagas. [en línea]. Santiago, Chile. World Wide Web: <<http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/dch-XII-INCOSUR-inf-final-chi.pdf>> [consulta 04 - 04 - 2005].

ZELEDÓN, R.; RABINOVICH, J.E. 1981. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. Annu. Rev. Entomol. 26: 101 – 133