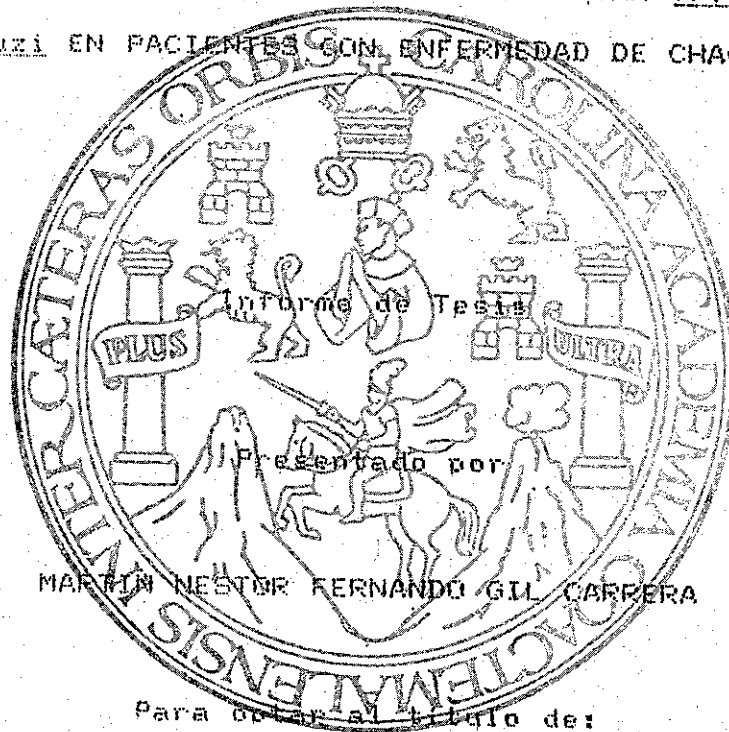


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

RESPUESTA INMUNE CELULAR DIRIGIDA CONTRA Trypanosoma  
cruxi EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS



MARTÍN NESTOR FERNANDO GIL CARRERA

Para optar al título de:

Químico Biólogo

Guatemala, enero de 1996

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

**JUNTA DIRECTIVA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

<b>DECANO</b>	<b>LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>LICDA. ELEONORA GAITAN IZAGUIRRE</b>
<b>VOCAL I</b>	<b>LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ</b>
<b>VOCAL II</b>	<b>LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN</b>
<b>VOCAL III</b>	<b>LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME</b>
<b>VOCAL IV</b>	<b>BR. ANA MARIA RODAS CARDONA</b>
<b>VOCAL V</b>	<b>BR. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA</b>

R  
06  
1(1032)  
C.3

## TESIS QUE DEDICO

- A DIOS. fuente de sabiduría y guía de mis pasos
- A MIS PADRES. Ernesto Gil Peláez y Rosa Carrera de Gil  
con gratitud y cariño
- A MI HERMANA. Silvia Gil Carrera, con cariño
- A MIS ABUELOS. Randolpho Gil Arriaza  
Marta Peláez  
Diego Carrera (QEPD)  
Rosaura Carrera, con mucho cariño
- A MIS TIOS Y TIAS. con mucho cariño
- A MI NOVIA. Evelyn Rodas Pernillo, con mucho amor
- A MIS MAESTROS. Lic. Jorge Perez, Lic. Gerardo Arroyo,  
Lic. Federico Nave, Licda. Maria C. Bran,  
Dr. Marco A. Acevedo, Lic. Fernando Diaz y  
Dr. Kenji Hirayama, con mucha gratitud
- A MIS AMIGOS. Hector Mejia, Erick Baldizón
- A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
- A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
- A MI PATRIA GUATEMALA

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edmundo Velásquez, Licda. Dina Dubón,  
asesores de tesis.

A Kenji Hirayama, PhD, por sus conocimientos  
transmitidos desinteresadamente.

A Licda. Diana Freire, por su apoyo y ayuda.

Al Lic. Federico Nave, por su asesoría estadística.

A la Agencia Internacional de Cooperación del Japón  
(JICA).

Al Ministerio de Energía y Minas, departamento de  
Energía Nuclear.

## INDICE

Título	No. de página
I. Resumen .....	1
II. Introducción .....	3
III. Antecedentes .....	5
A. Datos Históricos .....	5
B. Distribución Geográfica .....	5
C. Morfología del Agente Etiológico .....	6
D. Vectores .....	7
E. Ciclo Vital .....	7
F. Formas de Transmisión .....	8
G. Patología .....	8
H. Fases de la Enfermedad y Sintomatología.....	9
I. Respuesta Inmune .....	12
J. Evaluación de la Respuesta Inmune Celular.....	17
K. Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas ...	19
L. Tratamiento .....	20
M. Epidemiología .....	21
N. Prevención y Profilaxia .....	22
IV. Justificaciones .....	24
V. Objetivos .....	25
VI. Hipótesis .....	26
VII. Materiales y Métodos .....	27
VIII. Resultados .....	34
IX. Discusión .....	38
X. Conclusiones .....	41

XI. Recomendaciones .....	42
XII. Referencias .....	43
XIII. Anexos .....	48

## I. RESUMEN

La Enfermedad de Chagas es una patología endémica en los departamentos del oriente de Guatemala. Las formas clínicas varían desde la forma asintomática hasta la forma crónica donde hay daño severo al miocardio, pudiéndose producir muerte súbita por paro cardíaco.

En el presente estudio, se caracterizó la respuesta inmune celular en términos de proliferación celular en 40 pacientes 19 seropositivos y 21 seronegativos dirigida contra Trypanosoma cruzi agente etiológico de la enfermedad. El objetivo fue determinar si se produce proliferación celular dirigida contra T. cruzi en pacientes seropositivos y en seronegativos.

Para ello se tomaron pacientes que asistieron a la Clínica de Cardiología del Hospital Roosevelt, a quienes se les extrajo sangre y se les evaluó la reactividad hacia T. cruzi por el método de hemaglutinación indirecta (IHA) y aglutinación con partículas de látex. Se separaron las células mononucleares y se cultivaron por triplicado. Para el ensayo proliferativo se utilizó la siguiente distribución: control negativo, células sin exposición a mitógeno o antígeno como control negativo; control positivo, células expuestas al mitógeno concanavalina A (ConA) (5 y 10  $\mu$ g/ml), y las muestras de casos se expusieron dirigida contra el antígeno soluble purificado de epimastigotes de T. cruzi (5, 10 y 20  $\mu$ g/ml).

Como índice de proliferación celular se utilizó timidina tritiada como marcador, midiéndose la radiactividad de la misma en cuentas por minuto (cpm).

El análisis estadístico utilizado fue análisis de varianza de dos vías para un diseño anidado; éste demostró que hubo diferencias significativas en la proliferación celular entre pacientes seropositivos y seronegativos, observándose una marcada proliferación celular en los pacientes seropositivos a diferencia de los pacientes seronegativos ( $p < 0.00001$ ). También se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett determinándose que las mejores concentraciones para activar una proliferación celular son de 5 y 10 mcg/ml de T. cruzi ( $p < 0.05$ ).

Se encontró que el ensayo de proliferación celular es altamente sensible y específico para las concentraciones de T. cruzi: 5  $\mu$ g/ml (sensibilidad 92.6% y especificidad 88.9%) y 10  $\mu$ g/ml (sensibilidad 89.5% y especificidad 91.9%). Con los resultados obtenidos se observó que en pacientes seropositivos hacia T. cruzi existe una respuesta inmune celular dirigida contra el antígeno purificado de T. cruzi y se comprobó que este ensayo puede utilizarse como otro método diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central



## I. INTRODUCCION

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana que es producida por Trypanosoma cruzi, es endémica en las zonas rurales de Centro y Sur América, donde las enfermedades parasitarias son de los mayores problemas de Salud Pública (1).

El área endémica es una extensa región geográfica, la cual se caracteriza por poseer un clima cálido, con una altitud sobre el nivel del mar de 420 a 1500 metros y una temperatura entre los 18 y los 30 grados Celsius, debido a que este tipo de clima favorece la proliferación de los vectores de la enfermedad, "los triatominos" (2). Además de la transmisión por vectores, existe la vía transfusional y también puede transmitirse verticalmente, causando daño al neonato, produciendo elevada mortalidad (3).

La enfermedad de Chagas es una patología de gran importancia en nuestro país debido a que se presentan 30,000 casos nuevos por año (4,5) y debido a que no se tiene un amplio conocimiento de la enfermedad en las regiones endémicas y a que no se conoce totalmente la respuesta inmune hacia la misma, es sumamente necesario estudiar, describir y determinar el tipo de respuesta inmune dirigida contra el agente causal T. cruzi para así contribuir a un mejor entendimiento sobre dicha enfermedad.

Para conocer la respuesta inmune celular dirigida contra T. cruzi se utilizó sangre de pacientes seropositivos y

seronegativos que visitaron el Hospital Roosevelt durante el periodo de abril a junio de 1994. De la sangre obtenida se separaron y se cultivaron las células mononucleares y por último se midió la incorporación de timidina tritiada como marcador de proliferación celular para evaluar diferencias entre los pacientes seronegativos y los seropositivos (39).

## II. ANTECEDENTES

### A. Datos Históricos

En 1909, el Dr. Carlos Chagas descubre la enfermedad de Chagas también conocida como Tripanosomiasis Americana, en el estado Brasileño de Minas-Gerais. Este fue informado que en las paredes y techos de la viviendas de trabajadores habían algunos insectos que tenían hábitos nocturnos para picar y succionar sangre. Carlos Chagas estudió estos insectos y encontró en el intestino de ellos unos protozoos flagelados a los que llamó en honor a su maestro Oswaldo Cruz, Trypanosoma cruzi. También los encontró en la sangre de un niño que padecía de fiebre, linfadenopatía generalizada y anemia, con lo que describió las manifestaciones clínicas, el agente etiológico, las manifestaciones parasitológicas y también epidemiológicas de esta enfermedad (1,2).

El segundo país donde se descubrió la enfermedad fué en El Salvador, por Segovia en 1913. En Guatemala se encuentran los primeros casos de la enfermedad en 1932, por Reichenow de Hamburgo (1-3).

### B. Distribución Geográfica

Se han reportado casos humanos de la enfermedad desde Texas (EE.UU.), hasta las provincias de Chubut, Tierra de Fuego (Chile) y Patagonia (Argentina); estando limitada a la región Americana. La presencia de reduvidos, insectos vectores, y de animales domésticos y silvestres que sirven de

reservorios es más amplia, desde California a Florida y hasta Maryland en EE.UU. (1-3). También se han encontrado en algunas islas del Caribe tales como Trinidad y Tobago y Guyana (4,5).

En Guatemala, los departamentos endémicos son: Zacapa, El Progreso, Santa Rosa, Chiquimula y Jutiapa (6).

### C. Morfología del Agente Etiológico

T. cruzi se presenta en la sangre en forma de tripomastigote, que es un flagelado de 15 a 20 micras de largo, delgado o grueso, tiene un extremo posterior puntiagudo. En los frotis teñidos con Giemsa, presenta una forma de U o S, con un flagelo libre que mide un tercio de la longitud total, tiene citoplasma granuloso, núcleo central que toma bien los colorantes, un cinetoplasto grande formado de cuerpo parabasal y un blefaroblasto y granos de volutina.

En los tejidos se encuentra en forma de amastigote con forma redondeada, sin flagelo, localizándose preferentemente en los tejidos nervioso y muscular, siendo especialmente afectado el miocardio. Por la activa reproducción binaria del parásito, la célula afectada adquiere una forma de quiste (pseudokuiste). Cuando el tripomastigote completa su evolución endocelular, en unos 4 ó 5 días, abandona el pseudokuiste, parasita a otras células vecinas o pasa a la circulación para afectar otros tejidos (1-3).

#### D. Vectores

Los insectos vectores de la enfermedad de Chagas pertenecen al genero Reduvidae, orden Hemiptera y familia Triatomidae, los que se conocen popularmente como: chinches, telepatas, picudos. Estos tienen hábitos nocturnos, en el humano producen picaduras indoloras, preferentemente en la cara y otros sitios descubiertos al dormir por lo que su picadura pasa inadvertida. También afecta a los animales domésticos (perros, gatos, aves, etc.) o a los animales silvestres (tacuazín, armadillo, monos, murciélagos, etc.). Estos insectos se infectan al picar a humanos o animales con tripanosomiasis y luego la transmiten al picar a algún otro hospedero. Estos vectores prefieren los climas cálidos y secos, en casas rurales de paja, bajareque, palopique, en las que la higiene y las condiciones económicas son muy limitadas, siendo todo esto favorable para su desarrollo (1,7,8).

Los vectores más importantes son: Triatoma infestans, Panstrongylus megistus, Triatoma brasiliensis, Triatoma dimidiata, Rhodnius prolixus y Triatoma nitida (1-3,8). Los últimos tres son los más frecuentes en Guatemala (5).

#### E. Ciclo Vital

Los insectos vectores después de picar e ingerir sangre infectada de una persona o animal son infectados con tripomastigotes, existiendo multiplicación y transformación a epimastigote en el intestino del vector, después existe otra transformación a tripomastigotes metacíclicos o formas

infectantes, que son transmitidos a los vertebrados por contaminación fecal, al picar al paciente, puesto que es frecuente que defequen después de picar debido al reflejo gastrocólico; el sitio de piquete se contamina fácilmente produciéndose así la infección. La víctima dormida también puede erosionarse sin darse cuenta o frotar la zona lesionada transportando al parásito al interior de las mucosas de ojos y otros sitios (Anexo 1) (1-3,5).

#### F. Formas de Transmisión

Una de las formas de transmisión es la vectorial, ya descrita, pero existen otras vías de transmisión que son: la vertical o transplacentaria (de madre a hijo), con un alto porcentaje de probabilidad de 0.5 a 2 por ciento de que los hijos nazcan infectados; la forma transfusional (por transfusiones sanguíneas) y por trasplante de órganos, por el elevado porcentaje y seropositividad de 1 a 15 por ciento en donadores de bancos de sangre en hospitales latinoamericanos, otra forma de transmisión es por medio de accidentes en el laboratorio (1,3,8-11).

#### G. Patología

Al principio el parásito llega a la circulación del mamífero y es fagocitado por los macrófagos del sistema retículo endotelial, se multiplica en las células del tejido subcutáneo y en los macrófagos en el sitio de inoculación y da lugar a una lesión local llamada Chagoma (9). Las células infectadas permanecen en buen estado hasta que las destruye

el parásito al multiplicarse, ocurriendo una reacción inflamatoria, que afecta a todos los tipos de células produciendo edema local. Se ha comprobado que existen cepas cardiótropas que producen lesiones epicárdicas y pericárdicas, trombosis mural, semianeurisma del ventrículo izquierdo por dilatación de áreas fibróticas, etc. (14); también hay cepas viscerótropas que afectan los plexos nerviosos de órganos huecos tales como esófago, estómago e intestinos. También pueden afectar las células de la glia del sistema nervioso central y las meninges (3,9,12-15).

#### H. Fases de la Enfermedad y Sintomatología

La Enfermedad de Chagas tiene una fase aguda, una fase silenciosa o intermedia y una fase crónica (9).

El período de incubación es de 6 a 20 días desde la infección por el vector hasta la aparición de los primeros síntomas (1,9).

Existen pacientes que son asintomáticos y presentan molestias de poca importancia (9).

##### 1. Fase aguda

En ésta fase suele presentarse fiebre, dolor muscular, vomitos, diarrea, inflamación del tejido linfoide y miocarditis. Es diagnosticada en el 1-2 por ciento de los pacientes. La enfermedad aguda puede presentarse a cualquier edad, pero en áreas endémicas los más afectados son los niños menores de 10 años y es fatal en niños menores de 2 años (datos no reportados en Guatemala). Los signos y síntomas

son diferentes de acuerdo al sitio de infección. Cuando la infección es producida a través de la conjuntiva o piel del párpado, se desarrolla una conjuntivitis unilateral y edema bipalpebral, con linfadenitis regional, siendo el conocido Signo de Romaña. Cuando la infección es en otros sitios se produce un Chagoma de inoculación cutánea, que puede tener aspecto forunculoide o erisipeloides y en ocasiones úlcera en la región central de la lesión cubriéndose luego con una costra. En otros casos no hay puerta de entrada aparente y la enfermedad puede manifestarse de manera brusca con fiebre diaria, eritema y adenitis cervical, axilar e iliaca (1-3,9).

Más del 30 por ciento de los casos muestran anomalías electrocardiográficas, como cambios en la onda T y radiológicas como cardiomegalia debido a la miocarditis aguda; esta última produce taquicardias, arritmias y otras anomalías (2,3,14).

Una severa complicación de la fase aguda es la meningoencefalitis que produce una alta mortalidad del 50 por ciento o más. En Guatemala no se ha reportado ningún caso (14-19).

## 2. Fase Intermedia o Silenciosa

Se inicia a las 3 ó 10 semanas después de la fase aguda, con o sin manifestaciones clínicas, puede persistir por varios años o permanecer indefinidamente. Existe ausencia de sintomatología, el electrocardiograma y el examen por rayos X normales, pero los exámenes serológicos se mantienen

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central



positivos; en ocasiones es posible detectar parásitos por xenodiagnóstico en un 20 a 60 por ciento de los casos (siendo ésta la forma más común de diagnóstico en las áreas endémicas (8,19,20).

### 3. Fase Crónica

Más del 30 por ciento de las personas en la fase silenciosa progresan, 5 a 30 años después, hacia la fase crónica, con desarrollo de patología cardíaca, digestiva o neurológica (3,8,19).

#### a. Anormalidades cardíacas

Las manifestaciones clínicas dependen del grado de la lesión. ocurre insuficiencia cardíaca, arritmias, hay trastornos electrocardiográficos: alteraciones de la repolarización ventricular, extrasístoles ventriculares, bloqueo aurículo ventricular y fibrilación ventricular; no se afectan las arterias coronarias. El grado de cardiopatía puede ser demostrado radiológica o electrocardiográficamente. Existen también fenómenos tromboembólicos y la complicación más frecuente son los émbolos pulmonares que provocan muerte súbita. De estos, no existen casos reportados en Guatemala (8,18-20).

#### b. Anormalidades digestivas

Los segmentos más afectados generalmente, por causas conocidas parcialmente, son el esófago o el colon, habiendo megaesófago o megacolon. Hay lesiones significativas en los plexos nerviosos intramurales que se asocian con alteraciones

del peristaltismo. Cuando afecta al esófago hay varios grados de regurgitación y disfagia, molestia retrosternal, a veces ataques paroxísticos de tos nocturna. Cuando afecta al cólon se pierde la coordinación de los movimientos, desarrollando severa constipación, produciendo estreñimiento grave y persistente (8,17,19).

### c. Anormalidades Neurológicas

Puede involucrar el sistema nervioso central, periférico o autónomo, produciendo parestesias, convulsiones, además alteraciones del cerebelo y anomalías psiquiátricas (5,16).

### I. Respuesta Inmune

#### 1. Inmunidad hacia parásitos

Los mecanismos efectores de células T importantes en el control de infecciones parasitarias son: restricción de la proliferación del parásito y prolongación de la vida del hospedero, por células T citotóxicas, por activación de macrófagos por linfocinas ( existe mayor respuesta con macrófagos activados que en no activados); formación de granuloma en el hígado y encapsulamiento fibroso (respuesta a infección crónica por antígeno local); por funciones efectoras de anticuerpos ( implicados en citotoxicidad dependiente de anticuerpos y opsonización del antígeno) (Anexo 2) (21-24).

## 2. Inmunidad hacia T. cruzi

Tanto células B como T están involucradas en la inmunidad contra T. cruzi. Esta inmunidad juega un importante papel controlando el crecimiento del parásito evitando su expansión en el hábitat intracelular en la fase aguda, existe producción de IgM anti-T. cruzi en ésta fase de la infección y de IgG en la fase crónica, éstos anticuerpos in vitro tienen la propiedad de aglutinar epimastigotes y tripomastigotes, lo que puede ser evidenciado por reacciones de hemaglutinación, fijación de complemento o inmunofluorescencia. La IgG induce resistencia en la fase crónica, ya que hay activación de macrófagos y destrucción del antígeno por metabolitos del oxígeno, lo que se demuestra in vitro y en animales experimentales (21, 24).

## 3. Mecanismos de evasión de T. cruzi

Paradójicamente, se ha observado la capacidad del parásito para regular el sistema inmune del hospedero, siendo el mejor medio para evadir la respuesta inmune. Durante la fase aguda de la infección existe un estado de inmunosupresión inducido por el parásito, el cual es utilizado por el mismo para permanecer dentro del hospedero infectado. Este estado es acompañado por una activación policlonal de linfocitos que afecta cerca del 50 por ciento de los linfocitos del bazo en ratones de laboratorio y afecta todas las subpoblaciones de células inmunes (21-23).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

Se han observado diferentes mecanismos de escape de I. cruzi como la localización ya que muchos parásitos se protegen por ser inaccesibles anatómicamente. Por ejemplo, en un habitat intracelular en los macrófagos, los parásitos escapan introduciéndose en el citoplasma de dichos macrófagos.

#### 4. Alteraciones inmunológicas producidas por I. cruzi

Se ha mencionado que I. cruzi posee o secreta moléculas con capacidad mitogénica para los linfocitos y ésta estimula preferencialmente a las células B CD5 así como las células TcRI, las cuales son esenciales para una activación policlonal. Otra deficiencia inmune inducida por I. cruzi es que el receptor para IL-2 es drásticamente reducido así como la expresión de moléculas para CD3, CD4 y CD8. También se ha observado que hay una producción disminuida de IL-2, también de interferón gamma en los ratones de laboratorio, aunque éstas no son alteradas en el humano (25-27).

También se ha observado en otros estudios que I. cruzi suprime la expresión de transferrina y de IL-2R sin afectar la producción de IL-1, de IL-2 y de IFN-gamma. Esta supresión parece tener amplia influencia sobre las subpoblaciones de linfocitos T tales como en la cooperadora, la inductora, la citotóxica y la supresora. Además altera las funciones inmunológicas de otras células tales como linfocitos B y células asesinas naturales (26,27). Se ha

determinado también que ratones infectados con I. cruzi presentan una baja regulación de la transcripción del gen de IL-2 en las células T (28,29).

Existe evidencia de activación por células T con antígenos purificados de secuencias de aminoácidos, siendo éstas como epitopos de células T y también se observó que dependiendo de la estructura del epitopo de T se puede determinar la capacidad del antígeno para producir un trastorno en la respuesta inmune en ciertos pacientes (30). En ratones de laboratorio infectados con I. cruzi se observó que sus células T lisaron células tratadas con antígeno del parásito y que no hubo efecto en las células normales (31).

Se ha reportado que hay regulación de macrófagos en ratones infectados con I. cruzi, supresión es producida por una deficiente actividad de células T y una producción anormal de citoquinas (32). Otros estudios reportaron que en la infección aguda con I. cruzi se modula la capacidad de las células del bazo y de los ganglios linfáticos para producir IL-2, IL-2R e IFN gamma durante el procesamiento de mRNA y en la etapa post-transcripcional, también se observó que en la presencia de una baja regulación de la producción de IL-2 y de la expresión de IL-2R, el hospedero infectado sobrevive, controla el parásito y resiste una nueva infección, siendo esto producido por respuesta de células T (33,34).

Otros estudios realizados reportaron que la enfermedad de Chagas induce una hiporreactividad en los linfocitos

hacia estímulos mitogénicos y antigénicos en ratones infectados durante la fase aguda, debido a la inhibición de producción de IL-2 (35,36). Se observó que ratones infectados y expuestos a antígenos específicos de célula T cooperadoras pueden potenciar la respuesta inmune, pero ésta actividad es suprimida por macrófagos supresores que inhiben la expresión de las células T cooperadoras (37).

Se ha observado también que el IFN gamma es producido tempranamente en la infección aguda con T. cruzi y que confiere un factor protector que es probablemente independiente de la respuesta inmune humoral (38).

#### 5. Mecanismos autoinmunes.

Existe una tendencia atribuible a autoinmunidad por cambios patológicos asociados a la infección crónica. Las posibles explicaciones son las siguientes: reacciones cruzadas entre antígenos parasitarios y los propios, exposición a antígenos secuestrados que conllevan a una gran destrucción tisular y exacerbación de autorreactividad de baja afinidad (21-25).

Así mismo durante la enfermedad se producen estos trastornos autoinmunes por medio de autoanticuerpos, resultado de la activación policlonal mencionada anteriormente. Estos autoanticuerpos al reaccionar cruzadamente con tejidos del hospedero provocan cardiomiopatía, megaesófago y megacolon. Se sospecha que esta respuesta inmune es producida en los ganglios por

anticuerpos o por células T citotóxicas que reaccionan cruzadamente con *T. cruzi* (24). Estudios de absorción indican que anticuerpos anti-músculo estriado cardíaco (EVI) reaccionan en forma cruzada con antígenos comunes entre el parásito y el hospedero. Recientemente se comprobó que el antígeno en el hospedero está en la laminina, una glicoproteína de la membrana basal y que una molécula similar se encuentra en el parásito, dando lugar a un mecanismo de autoinmunidad. Otros antígenos de reacción cruzada incluyen ATPasa del retículo sarcoplásmico y una variedad de proteínas y neuronas identificadas por anticuerpos monoclonales como CE5 (23,30,31).

#### J. Evaluación de la respuesta Inmune celular

Para evaluar la respuesta inmune celular se realizan ensayos de proliferación celular, para lo cual se utilizan linfocitos humanos a los que se estimula ya sea con mitógeno o con antígenos purificados. Con ello se hacen interpretaciones clínicas en las cuales se describen anomalías asociadas con inmunodeficiencias congénitas así como las producidas por enfermedades infecciosas, cáncer, desnutrición, abuso de drogas, estrés y enfermedades autoinmunes (24, 39).

Para la proliferación celular se realizan uniones específicas entre el receptor en la superficie del linfocito y un ligando que puede iniciar señales intracelulares que incluyen interacciones entre la membrana y el citoesqueleto,

flujo de calcio, activación de fosfolipasa C, liberación de calcio por trifosfato de inositol y activación de genes. La capacidad de los linfocitos para responder in vitro hacia un ligando en particular es una variable de utilidad a determinar ya sea en investigaciones o en la misma clínica (39).

Una lista parcial de ligandos puede ser utilizada para éste propósito entre ellos: mitógenos vegetales como Fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (ConA); también se pueden usar productos bacterianos como Cowan 1 de Staphylococcus aureus, productos químicos como acetato mirístico de forbol, citoquinas y anticuerpos monoclonales. Dependiendo del estímulo, los linfocitos involucrados en la respuesta pueden ser T o B. La PHA y la ConA estimulan preferencialmente linfocitos T, el Cowan 1 de S. aureus estimula a los linfocitos B (39).

Los linfocitos separados de la sangre periférica humana mediante un gradiente de centrifugación de Ficoll-type y cultivadas en placas de titulación con medio RPMI-1640 suplementado con aminoácidos, estímulos y suero AB humano. Según el tipo de células que se desean cultivar, es el tiempo de incubación; por ejemplo, los linfocitos T se incuban generalmente de 3 a 6 días, los linfocitos B de 7 a 8 días; los cultivos se hacen en incubadora con 5 por ciento de bióxido de carbono a 37 ° C (25,39).

Seguidamente después del cultivo se efectúan los conteos celulares pudiéndose realizar por citometría de flujo,

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central



también marcando las células con fluoresceína y utilizando un analizador de concentración de células Pandex. También se puede utilizar radioactividad con la utilización de timidina tritiada agregándola a los cultivos 6 a 18 horas antes de efectuar el conteo el cual se realiza extrayendo las células y colocándolas en papel filtro y luego en viales con líquido de centelleo para ser contadas en un contador Beckman, obteniéndose los resultados en cuentas por minuto (cpm), indicando que mientras más cpm hay, implica que se incorporó más timidina radiactiva por que hubo mayor proliferación celular (39).

#### K. Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas

Existen métodos directos en los que se observa el parásito y también métodos indirectos que son los serológicos (40,41).

Los métodos directos detectan el I. cruzi en sangre periférica están indicados en la fase aguda de la infección, cuando existe una parasitemia elevada, tales como el micrométodo por gota gruesa, el xenodiagnóstico, que es bastante sensible y se basa en la multiplicación activa de I. cruzi en el tubo digestivo de los triatomas, aunque su uso es muy limitado por ser muy traumático; luego le sigue en importancia el hemocultivo en medio LIT y el examen de sangre por concentración (3,40).

En los métodos indirectos, las pruebas inmunológicas detectan la presencia de anticuerpos específicos contra el I.

cruzi y algunos tienen sensibilidad y especificidad hasta del 95 por ciento. Estos especialmente indicados en la fase crónica de la infección y son los siguientes: inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta, ELISA, aglutinación en látex (Anexo 3), entre otros. Recientes estudios han demostrado que la reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), que es una técnica de amplificación del DNA in vitro, se ha utilizado en el diagnóstico molecular de varios trastornos genéticos y en la detección de agentes infecciosos tales como T. cruzi (40,41).

También se utilizan exámenes clínicos radiológicos en los que se observa cardiomegalia, megaesófago y megacolon y exámenes electrocardiográficos en los que se observan bloqueo de la rama derecha, extrasistolia ventricular que degenera en fibrilación ventricular causando muerte súbita (2,18-20).

Como diagnóstico diferencial, debe observarse el signo de Romaña y el chagoma inicial y no confundir con miasis oculares, celulitis, picadura de otros insectos y conjuntivitis. En la fase aguda se deben diferenciar de malaria, toxoplasmosis, miocarditis y mononucleosis infecciosa. En la fase crónica diferenciarla de estenosis de esófago y organomegalia congénita (17-20,41,42)

#### L. Tratamiento

El medicamento de elección en la fase aguda es el

Nifurtimox y benznidazole, pero la terapéutica no es muy satisfactoria ya que produce trastornos al paciente como: náusea, vómitos, anorexia, cefaleas y neuritis periférica. En algunos casos se ha utilizado el alopurinol, encontrando buena tolerancia sin que se presenten efectos adversos. En ciertas oportunidades se ha administrado el antipalúdico primaquina ya que se sospecha que elimina los tripomastigotes sanguíneos en la fase aguda de la infección (19). En los casos crónicos con insuficiencia cardíaca se debe utilizar con cuidado con los digitálicos, se deben utilizar diuréticos y las arritmias requieren el uso de lidocaína o amiodarona (3,19,43,44).

Recientes estudios han reportado que el sistema inmune por sí mismo, no elimina al parásito, pero puede ser efectivo en combinación con alguna droga (45). Otros estudios han reportado que el IFN gamma suprime la infección aguda y crónica en ratones tratados con ciclosporina (46); y otro estudio reportó que ratones infectados con dosis letales de T. cruzi redujeron la morbilidad y eliminaron la mortalidad al ser tratados con IFN gamma (47).

#### M. Epidemiología

Se desconoce exactamente el número de casos de tripanosomiasis. Aproximadamente existen unos 65 millones de personas a riesgo de sufrir esta infección. Actualmente 20 millones de habitantes en áreas urbanas y rurales padecen de esta enfermedad en Guatemala. El ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, lleva el registro de casos reportados

espontáneamente aunque ésto no refleja el número real de los mismos (5,48,49).

La prevalencia de la Enfermedad de Chagas es variable desde 5 a 20 por ciento de seropositividad en áreas endémicas en las regiones de Jutiapa, Zacapa, Santa Rosa, Chiquimula y el Progreso (48,49). Uno de los factores que condiciona la prevalencia de ésta endemia, es la existencia de reservorios animales domiciliarios como perros, gatos, aves y también la pobreza asociada a la falta de higiene y salubridad. La situación anteriormente descrita, determina la prevalencia de índices elevados de desnutrición ( más del 70 por ciento de los niños); enfermedades infecciosas y mortalidad (con tasas de más de 60 por 1000 nacidos vivos); así como el déficit habitacional ( 71 por ciento en áreas rurales ). Con ello es indudable que la Enfermedad de Chagas está íntimamente ligada al subdesarrollo (47,49).

Los primeros casos reportados en Guatemala fueron en el departamento de Sta. Rosa por el Dr. Edward Reichnow en 1932, en 1943 se delimitaron las áreas endémicas del país que son Chiquimula, Zacapa, El Progreso, Santa Rosa, Jalapa y Jutiapa. En el período de 1952-1976 fueron reportados 2620 casos positivos, pero de 1976-1983 se reportaron 312 casos positivos y de 1980-1989 se reportaron 312 casos positivos y 66 casos dudosos con la prueba de HAI-Chagas (50-55).

La Oficina Sanitaria Panamericana (OPS) estima que hay una incidencia anual de 30,000 casos nuevos por año y

una prevalencia de 750,000. Sin embargo, la Dirección General de Servicios de Salud, reportó únicamente 312 casos en la década comprendida de 1980-1989 (49).

#### N. Prevención y profilaxia

Como es lógico hay que destruir a los triatomas transmisores y proteger al hombre contra su picadura. Puesto que no es posible sustituir las casas inadecuadas por otras modernas, desde el punto de vista económico, resulta como mejor método la eliminación con insecticida de triatomas de las habitaciones. Otro aspecto a tomar en cuenta es la educación para la salud en todos los niveles (56-58).

Actualmente no existe quimioprofilaxia ni vacunación. Las primeras investigaciones afirmaron que la inmunización en ratas blancas con parásitos atenuados, no induce las lesiones crónicas de la enfermedad sino por el contrario, las puede prevenir (59,60). Otros estudios con ratas han determinado que la superficie del antígeno de T. cruzi es responsable de la resistencia del hospedero hacia infecciones activas, pero no se ha comprobado en humanos (61).

### III. JUSTIFICACIONES

La Enfermedad de Chagas constituye un grave problema endémico en Guatemala, se tiene clara evidencia de la existencia de esta enfermedad y el número de muertes causadas, habiendo 30,000 casos nuevos por año (49). Por esta razón es de gran importancia profundizar en estudios sobre las repercusiones de la enfermedad sobre el hospedero humano y la respuesta inmune celular como mecanismo de defensa que se lleva a cabo contra el agente etiológico de la enfermedad, Trypanosoma cruzi. Así también, es necesario establecer los cambios cuantitativos de dicha respuesta que puedan ocurrir durante la infección, para poder realizar futuras investigaciones que sirvan para descubrir formas de control de la enfermedad, profilaxia y/o tratamiento de la misma.

## IV. OBJETIVOS

- A. Conocer si existe proliferación celular dirigida contra Trypanosoma cruzi, como mecanismo de respuesta inmune celular en pacientes guatemaltecos con enfermedad de Chagas.
- B. Describir las características de la proliferación celular dirigida contra T. cruzi.
- C. Actualizar los conocimientos inmunológicos sobre la Enfermedad de Chagas en Guatemala.
- D. Contribuir a los proyectos de investigación sobre la Enfermedad de Chagas en Guatemala.

## V. HIPOTESIS

Existe proliferación celular determinable in vitro dirigida contra Trypanosoma cruzi, en pacientes guatemaltecos con enfermedad de Chagas.



## VI. MATERIALES Y METODOS

## A. Universo de Trabajo

Sangre de pacientes seropositivos a T. cruzi que asisten a la clínica de cardiología del Hospital Roosevelt.

## B. Recursos

## 1. Recursos humanos

El autor de la investigación Martin Gil contó con la asesoría del Dr. Edmundo Velásquez, Licda. Dina Dubón y la colaboración y asesoría del Dr. Kenji Hirayama PhD. Pacientes voluntarios del Hospital Roosevelt.

## 2. Recursos institucionales

- a. Agencia Internacional de Cooperación del Japón (JICA) del SNEM.
- b. Clínica de Cardiología del Hospital Roosevelt.
- c. Departamento de Energía Nuclear del Ministerio de Energía y Minas.
- d. Universidad de Saitama del Japón.

## C. Materiales

## 1. Equipo

- Jeringas descartables de 20 y 12 ml.
- Agujas tipo "mariposa"
- Algodón
- Pipetas Pasteur
- Pipetas volumétricas descartables de 5, 2 y 1 ml.
- Tubos de ensayo plásticos
- Etiquetas para tubos de ensayo

- Centrífugas
- Campana de flujo laminar
- Succionador al vacío
- Placas de microtitulación
- Incubadora de bióxido de carbono
- Panel filtro de fibra de vidrio (Whatman No.3)
- Viales de borosilicato (Wheaton)
- Cosechador de células (Minimash)
- Contador de centelleo (Beckman, USA)

## 2. Reactivos

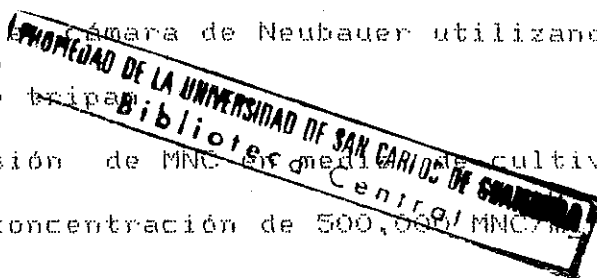
- Heparina (Novo Heparin)
- Etanol al 75%
- Buffer de fosfatos (PBS pH=7.4)
- Ficoll-paque (Lymphoprep, SH=1.077)
- Suero bovino fetal.
- Medio RPMI-1640 (Gibco, USA)
- Estreptomina (10mcg/ml)
- Penicilina (10 UI/ml)
- L-glutamina (2mM)
- L-aspargina (0.04mg/ml)
- L-arginina (0.12mg/ml)
- Piruvato de sodio (1mM)
- Suero AB humano (Gibco, USA)
- Concanavalina A (ConA)
- Antígeno de epimastigote de I. cruzi
- Timidina tritiada (5. Curie/mM, NEN, USA)
- Kit para hemaglutinación indirecta (Seroimmunodiagnositics, USA)

- Latex Chagas
- Insta Gel(USA).
- Solución de azul de tripán.

#### D. Metodología

1. Técnica de extracción y almacenamiento de muestras de sangre empleada en el SNEM (39).
  - a. Preparar etiqueta con nombre del donador de sangre.
  - b. Preparar una jeringa de 12 ml con 0.3 ml de heparina y colocarle una aguja "mariposa" (23G para niños y 21G para adultos)
  - c. Extraer 5 ml de sangre, efectuar nudo al medio del tubo de la aguja "mariposa".
  - d. Colocar jeringa de 20 ml con 1 ml de heparina a la aguja "mariposa"
  - e. Extraer 20 ml de sangre
  - f. Etiquetar la jeringa con nombre del paciente y fecha
  - g. Enviarla al laboratorio del SNEM máximo 2 horas después
  - h. Transferir la sangre de la jeringa de 12 ml a un tubo plástico de 15 ml
  - i. Centrifugar la sangre a 3000 rpm por 10 min.
  - j. Extraer plasma y etiquetarlo en un tubo plástico
  - k. Efectuar pruebas serológicas (látex y HAI) para establecer seropositividad hacia T. cruzi
  - l. Transferir la sangre de la jeringa de 20 ml a un tubo plástico de 40 ml
  - m. Colocar 25 ml de Ficoll-Paque en otro tubo de 40 ml

- n. Transferir la sangre del tubo de 40 ml al tubo que contiene Ficoll-Paque, suavemente sin que se mezclen
- o. Centrifugar el tubo con sangre y Ficoll-Paque a 1,350 rpm a temperatura ambiente, con inicio lento y sin cortes durante 35 min.
- p. Tomar la interfase (células mononucleares, MNC) con pipeta Pasteur, colocarla en un tubo de 15 ml y agregar 10 ml de PBS
- q. Centrifugar el tubo a 1,500 rpm por 10 min. a temperatura ambiente
- r. Descartar el sobrenadante con pipeta Pasteur y el succionador al vacío
- s. Suspender las MNC en 2 ml de medio RPMI-1640 suplementado con 10 mcg/ml de estreptomicina, 10 unidades de penicilina, 0.04 mg/ml de l-asparagina, 0.12 mg/ml de L-arginina, 1mM de piruvato de sodio y 10% de suero AB humano
- t. Efectuar recuento en cámara de Neubauer utilizando solución de azul de tripan
- u. Diluir la suspensión de MNC en medio de cultivo hasta obtener una concentración de 500,000 MNC/ml
- v. Colocar 0.2 ml de dilución de MNC en medio de cultivo en cada pocillo en una placa de microtitulación.
- w. Al control negativo no agregarle antígeno de I. cruzi o mitógeno (ConA), al control positivo



agregarle 20  $\mu$ lit de ConA a concentraciones de 5 y 10  $\mu$ g/ml, y a los casos agregarles 20  $\mu$ lit de antígeno a concentraciones de 5, 10 y 20  $\mu$ g/ml, realizar los cultivos por triplicado.

x. Colocar en incubadora de bióxido de carbono al 5% durante 6 días a 37 °C.

2. Protocolo para la estimación de captación de timidina tritiada [3H]-timidina en linfocitos proliferados (39).

- a. Al sexto día de cultivo de MNC, agregar 0.5  $\mu$ Ci de [3H]-timidina a cada pocillo de la placa de microtitulación
- b. Después de 16 horas de incubación con la [3H]-timidina, obtener las MNC con un cosechador de células automático (Minimash I) en papel filtro de fibra de vidrio (Whatman)
- c. Dejar secar el papel filtro
- d. Cortar el papel filtro y colocarlo en viales de borosilicato (Wheaton) con 5 ml de líquido de centelleo (Insta-Gel)
- e. Medir la onda beta en contador de centelleo (Packard) y expresar los resultados en cuentas por minuto (cpm)
- f. Interpretar resultados, comparando el número de cpm de los casos y controles positivos con los controles negativos, indicando si hubo proliferación celular al haber más cpm.

### E. Diseño Experimental

Se utilizaron 40 pacientes seleccionados por conveniencia, 19 seronegativos y 21 seropositivos, mediante las pruebas de hemaglutinación indirecta y aglutinación en partículas de látex. Como criterio de seropositividad se tomó una aglutinación en partículas de látex y un título de 1:32 para hemaglutinación indirecta.

Fue un estudio de casos y controles.

Se utilizó análisis de varianza de dos vías para un diseño anidado o jerarquizado en dos etapas a todos los pacientes (seropositivos y seronegativos) realizándose los siguientes tratamientos: como control negativo, las células mononucleares no se estimularon con antígeno (*T. cruzi*) o mitógeno (Con A); como control positivo se estimularon con mitógeno (Con A, concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) y como casos, se estimularon las células mononucleares con antígeno (*T. cruzi*, concentraciones de 5, 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$ ) cada tratamiento se realizó por triplicado, este número de réplicas se determinó por conveniencia.

Como existieron diferencias significativas entre grupos (casos y controles), se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Fisher, también la prueba de Dunnett donde se compararon los casos y controles positivos con el control negativo, además se realizaron tablas de  $2 \times 2$  para cálculo de sensibilidad y especificidad con las 3 concentraciones de

T. cruzi ( 5, 10 y 20 g/ml), se utilizó la prueba de Kappa para observar la concordancia entre el estado serológico del paciente y la proliferación celular y por último se utilizó la razón de verosimilitud para determinar la asociación entre la proliferación de células mononucleares (CMN) por ser de pacientes seropositivos y la poca o nula proliferación de CMN por ser de pacientes seronegativos(62).

## VIII. RESULTADOS

Al examen serológico, se encontraron 19 pacientes seropositivos y 21 seronegativos a Trypanosoma cruzi, por medio de los métodos de aglutinación en látex y hemaglutinación indirecta, tomándose como título diagnóstico, 1:32; hubo 3 pacientes en los que los exámenes serológicos no mostraron concordancia, presentando aglutinación en látex y un título menor de 1:32 para hemaglutinación indirecta, por lo que se tomaron 2 como seropositivos y uno como seronegativo de acuerdo a la sintomatología que presentaban estos pacientes al ser examinados en la Clínica de Cardiología del Hospital Roosevelt.

Los resultados de los cultivos de células mononucleares fueron transformados a logaritmos de base 10 (Log) (Anexo 4), normalizándose la distribución de los datos.

Ningún control negativo mostró respuesta de proliferación celular. Los controles positivos (ConA) mostraron proliferación en ambas concentraciones utilizadas ( 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  ), excepto en 4 cultivos (10%) de los 40 realizados (Anexos 4-6). Se tomó como índice de proliferación celular una cantidad igual o superior a 10,000 cpm.

En los cultivos estimulados con T. cruzi (casos), se observó que hubo marcada proliferación celular en las 3 concentraciones utilizadas ( 5, 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$  ) en las muestras de pacientes seropositivos en comparación con los pacientes seronegativos que mostraron muy baja proliferación



celular (Anexos 6 y 7).

En algunos pacientes seropositivos con título de 1:32 no hubo proliferación, encontrándose 2 cultivos de pacientes sin proliferación celular hacia T. cruzi. También hubo cultivos de pacientes seronegativos en cuyos cultivos hubo proliferación celular con recuentos mayores de 10,000 cpm (Anexos 4-5, 8-10).

Al utilizar una concentración de 5  $\mu$ g/ml de antígeno de T. cruzi, hubo proliferación celular en 50 cultivos de pacientes seropositivos no habiendo en 4 cultivos; 56 cultivos de pacientes seronegativos no proliferaron y en 7 proliferaron sus células mononucleares (Anexos 4 y 11).

A una concentración de 10  $\mu$ g/ml de antígeno de T. cruzi, 51 cultivos de pacientes seropositivos hubo proliferación celular no observándose proliferación en 6 de ellos. En los cultivos de pacientes seronegativos no hubo proliferación celular en 57 y sí hubo en 5 (Anexos 4 y 12).

A una concentración de 20  $\mu$ g/ml de antígeno de T. cruzi, de los cultivos de pacientes seropositivos, hubo proliferación en 50 y en 4 no hubo. En cultivos de pacientes seronegativos no hubo proliferación en 46 y sí hubo en 14 (Anexos 4 y 13).

Se excluyó un cultivo de paciente seropositivo y uno de paciente seronegativo, en la estimulación a ConA (5  $\mu$ g/ml) y con T. cruzi (20  $\mu$ g/ml), por no haber suficientes células mononucleares para cultivar (Anexos 4 y 5).

Se obtuvo una sensibilidad del método para concentración de antígeno de I. cruzi de 5  $\mu\text{g/ml}$  de 92.6% y una especificidad de 88.9% y kappa 0.81; para la concentración de antígeno de I. cruzi de 10  $\mu\text{g/ml}$  se obtuvo una sensibilidad de 89.5 % y una especificidad de 91.9% y kappa 0.81 y para una concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  de I. cruzi se obtuvo una sensibilidad de 92.6% y una especificidad de 76.7% y kappa 0.68; con ésto se demuestra que existe buen acuerdo o concordancia entre la serología y el ensayo proliferativo para las concentraciones de I. cruzi de 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  y para la concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  de I. cruzi existe un acuerdo intermedio (Anexo 19).

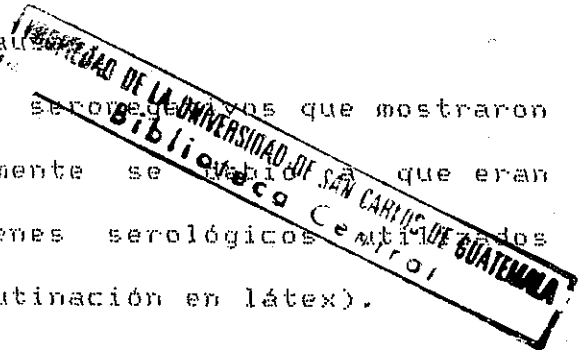
Por último se determinaron las razones de verosimilitud donde se observó la probabilidad de proliferación celular al ser paciente seropositivo en donde todos los casos ( estimulación con I. cruzi 5, 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$  ) es significativa, con  $p < 0.00001$  (Anexo 20).

## IX. DISCUSION

En el presente estudio se analizó la proliferación celular como mecanismo de respuesta inmune celular hacia I. cruzi en pacientes seropositivos y seronegativos hacia el mismo agente. Se observó que en pacientes seropositivos hubo una marcada proliferación celular hacia el antígeno de I. cruzi (concentraciones de 5, 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$ ) en comparación con los pacientes seronegativos en los que no hubo proliferación celular hacia este antígeno. Esto indica que existe asociación entre la seropositividad y la proliferación celular. En algunos pacientes seropositivos no hubo proliferación celular hacia el mismo antígeno en las 3 concentraciones indicadas, lo cual puede deberse a falsos positivos en las pruebas de hemaglutinación indirecta y aglutinación en partículas de látex para I. cruzi o probablemente a un estado de inmunosupresión inducido por I. cruzi durante la fase aguda de la enfermedad (22,23), o a inmunosupresión debida a otras causas.

En cuanto a los pacientes seronegativos que mostraron proliferación celular probablemente se debió a que eran falsos negativos a los exámenes serológicos (hemaglutinación indirecta y aglutinación en látex).

Al ser comparados los cultivos de pacientes seropositivos que mostraron una marcada proliferación celular hacia I. cruzi (casos) con sus controles negativos (sin estimulación) y también con los cultivos de pacientes seronegativos, con la utilización de la prueba de Dunnett, se



observó que dicha proliferación aumentada es probable que sea de pacientes que están en la fase crónica de la enfermedad, donde la respuesta inmune celular juega un papel importante que conlleva a la patogénesis de la misma donde hay infiltración de células mononucleares (CMN) en el miocardio conduciendo a autoinmunidad. Por lo que la caracterización de células mononucleares en sangre periférica fue de utilidad.

Con respecto a los controles positivos Con A ( 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) hubo marcada proliferación celular en cultivos de pacientes seropositivos y de seronegativos comparados con los controles negativos (prueba de Dunnett, Anexo 6) de cada uno respectivamente, indicando que la Con A sí funcionó como control positivo y que las células inmunes eran funcionales.

Al observar el análisis estadístico post-ANDEVA por la prueba de Fisher ( $p < 0.05$ ) (Anexo 15) se determinó que la proliferación celular en cultivos de pacientes seropositivos (estímulos con ConA y I. cruzi) es significativamente mayor que en pacientes seronegativos, lo que indica que existe una actividad mitogénica aumentada en los primeros pacientes ya que por haber estimulación antigénica constante en la fase crónica de la enfermedad donde ocurre una permanente exposición a antígenos propios ( laminina, produciendo autoinmunidad ), hay elevada producción de linfocinas (IL-2, IFN gamma, IL-4 e IL-6). Además de que existe en estos pacientes memoria inmune, también es probable que por estar alterado el sistema inmune en pacientes seropositivos,

sus células inmunes CMN estén sensibilizadas o hiperplásicas y que la estimulación con algún mitógeno tenga un mayor efecto proliferativo que con CMN de pacientes seronegativos. En pacientes seronegativos probablemente no hay alteración del mecanismo inmune debido a que no hay estímulo antigénico constante, no habiendo así mitosis aumentada de las CMN, por no haber elevada producción de linfocinas.

Se determinó que este ensayo de proliferación celular es altamente sensible y específico por lo que puede ser utilizado como prueba diagnóstica confirmativa para la enfermedad de Chagas, especialmente si se utilizan las concentraciones de *T. cruzi* de 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  que fue donde se observó mayor proliferación celular y donde existió mejor acuerdo o concordancia entre seropositividad y proliferación celular, así como en seronegatividad y no proliferación celular.

## X. CONCLUSIONES

- A) Existe proliferación celular como mecanismo de respuesta inmune celular dirigida contra T. cruzi determinable in vitro en pacientes seropositivos.
- B) Se encontró correlación significativa entre seropositividad y proliferación celular frente a T. cruzi.
- C) El ensayo proliferativo celular es un método altamente sensible y específico, pero requiere tiempo, equipo adecuado y es de costo elevado.
- D) La metodología empleada para la detección de respuesta inmune celular dirigida contra T. cruzi puede aplicarse para diferenciar entre un paciente seropositivo y uno seronegativo, pudiéndose utilizar como otra ayuda diagnóstica.

## XI. RECOMENDACIONES

- A) Deben continuarse y profundizar en estudios in vitro sobre proliferación celular tanto para T. cruzi como para otros parásitos.
- B) Utilizar un método serológico más sensible y específico para realizar estudios similares y comparar con la parasitemia positiva para evitar así posibles resultados falsos.
- C) Para realizar estudios como el presente hay que tomar en cuenta no utilizar pacientes inmunodeprimidos.
- D) Utilizar material estéril descartable y condiciones de máxima esterilidad para evitar contaminación.
- E) Deben realizarse estudios en los que se tomen en cuenta las diferentes fases de la Enfermedad de Chagas y compararse con la respuesta inmune celular.

## IX. REFERENCIAS

- 1) Aguilar FJ. Parasitología Médica. Guatemala: Lit. Delgado, 1987. 360p.
- 2) Macedo V. Chagas disease (American Trypanosomiasis). (In Wyngaarden JB, Smith LH, Eds. Cecil Textbook of Medicine. Philadelphia: WB Saunders, 1982. 3900p.)
- 3) Brown H. Parasitología Clínica. 4a. Ed. México: Interamericana, 1987. 366p.
- 4) Boletín Oficina Sanitaria Panamericana. Situación de la Enfermedad de Chagas en las Américas 1984; 97:159-164.
- 5) Boletín Informativo sobre el Proyecto y Enfermedad de Chagas en Guatemala. Guatemala: SNEM, JICA, 1993. 89p.
- 6) Zeledón R, Rabinoch JE. Chagas Disease: An Ecological appraisal with emphasis on insects vectors. Ann Rev Entomol 1981;26:101-337.
- 7) Lent H, Wygodzinsky. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and they significance as vector of Chagas Disease. Bull Am Mus Nat His 1970;1633:125-520.
- 8) Epidemiología de la Enfermedad de Chagas, Boletín Informativo. Guatemala: Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas, 1974. 4p.
- 9) Howard JE, Rubio M. Congenital Chagas Disease. Clinical and Epidemiological study of thirty cases. Bol Chile Parasit 1982;23:107-12.
- 10) Tabor E. Infectious complications of Blood Transfusion. USA: New York Academic Press, 1985. 187p.
- 11) Marsden PD, Selective primary health care: Strategies for control of disease in developing world, XVI Chagas Disease. Rev Infec Dis 1984;6:855-865.
- 12) Organización Panamericana de la Salud. Aspecto Clínico de la Enfermedad de Chagas. Bol Epidemiol 1982;3:1-5.
- 13) Berning H. Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Alemania: Castellana de Medizinische Wochenschrift. Medicina Alemana SRL. 1984; 109 (3):274-278.
- 14) Bloch M, et al. Tripanosomiasis Americana Fase Aguda. El Salvador: Revista Médica Tropical, 1982. 13p.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central



- 15) Aspectos Clínicos de la Enfermedad de Chagas. Bol of Sanit Panam 1974;77:141-155.
- 16) Beeson P, Mc-dermott B. Tratado de Medicina Interna de Celil Loeb. 9a Ed. México: Interamericana, 1977. 3058p.
- 17) Aspectos Clínicos de la Enfermedad de Chagas. Bol of Sanit Panam 1975;80:41-65.
- 18) Apt B, Cardiopatía Chagásica en el altiplano Chileno. Estudio Clínico, Epidemiológico y Electrocardiográfico. Rev Med Chile 1978;115:616-623.
- 19) Schoeder S, Krupp M. Diagnóstico Clínico y Tratamiento. 2d ed. México: El Manual Moderno, 1989. 1045p.
- 20) Soto Rojas F, et al. Alteraciones electrocardiográficas en 29 sujetos aparentemente sanos, con prueba serológica positiva para la enfermedad de Chagas. Arch Ins Card Mex 1984;43:876-880.
- 21) Minoprio P, et al. Immunobiology of murine I. cruzi infection: The predominance of parasite specific responses and the activation of TCRI T cells. Immunol Rev 1989;112:183-207.
- 22) Kierzenbaum F, Szein MB. Mechanisms underlying immunosuppression induced by I. cruzi. Parasitol Tod 1990;6:261-164.
- 23) Petry K, Elson H. Chagas Disease: A model for the study of autoimmune disease. Parasitol Tod 1989;5:1111-1116.
- 24) Roitt I. Immunology. England: Gower Medical Publishing, 1986. 809p.
- 25) Kierzenbaum F. On evasion of I. cruzi from the host immune response: Lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas disease. J Immunol 1981;44:641.
- 26) Szein M, Cuna W. Trypanosoma cruzi inhibits the expression of CD3m, CD4, CD8 and IL-2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. J Immunol 1990;144:3558-3562.
- 27) Tarleton RL. Trypanosoma cruzi induced suppression of IL-2 production. Evidence for the presence IL-2 producing cells. J Immunol 1988;140:2763.
- 28) Soong L, Tarleton R. Selective suppressive effects of I. cruzi infection on IL-2, c-myc and c-fos Gene expression. J Immunol 1992;160:2095-21101.

- 29) Nabors G, Tarleton R. Differential control of IFN Gamma and IL-2 production during T. cruzi infection. *J Immunol* 1991;146:3591.
- 30) Gazzinelli R, et al. Identification and partial characterization of T. cruzi antigens recognized by T cell and immune sera from patients with Chagas Disease. *Am J Trop Med Hyg* 1990;90:120.
- 31) Hudson L. Immunopathogenesis of experimental Chagas' disease in mice: damage to the autonomic nervous system. *Cytopathology of parasitic diseases (London) symp* 1983;99:235-249.
- 32) Cerrone M, Kuhn R. Macrophage regulation of Immune responses of spleen cells from mice infected with T. cruzi. *Immunology* 1991;4:d23-437.
- 33) Rottenberg M, et al. Organ Specific regulation of interferon gamma, interleukin-2 and interleukin-2 receptor during murine infection with T. cruzi. *Scand J Immunol* 1993;37:559-568.
- 34) Cunningham D, Kuhn R. Lymphoblast transformation as a measure of immune competence during experimental Chagas' disease. *J Parasitol* 1980;66:390-398.
- 35) Cerrone M, Ritter D, Kuhn R. Effect of antigen-specific R helper cells of interleukin-2 on suppressive ability of macrophage subsets detected in spleen of T. cruzi infected mice as determined by limiting dilution-partition analysis. *Infect Immun* 1992;60:1489-1498.
- 36) Rabin H, et al. Spontaneous release of a factor with properties of T-cell growth factor from a continuous line of primate tumor T cells. *J Immunol* 1981; 127:1852-1856.
- 37) Ritter D, Kuhn R. Antigen specific T-helper cells abrogate suppression in T. cruzi infected mice. *Infect Immun* 1990;58:3248-3256.
- 38) Torrico F, et al. Endogenous IFN gamma is required for resistance to acute T. cruzi infection in mice. *J Immunol* 1991;146:3631-3636.
- 39) Rose N. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 4th ed. USA: American Society for Microbiology, 1990. 715p.
- 40) Moser D, Kirchoff L, Donelson, J. Detection of T. cruzi by DNA amplification using the Polymerase Chain Reaction. *J Microbiol* 1989;27:1477-1482.

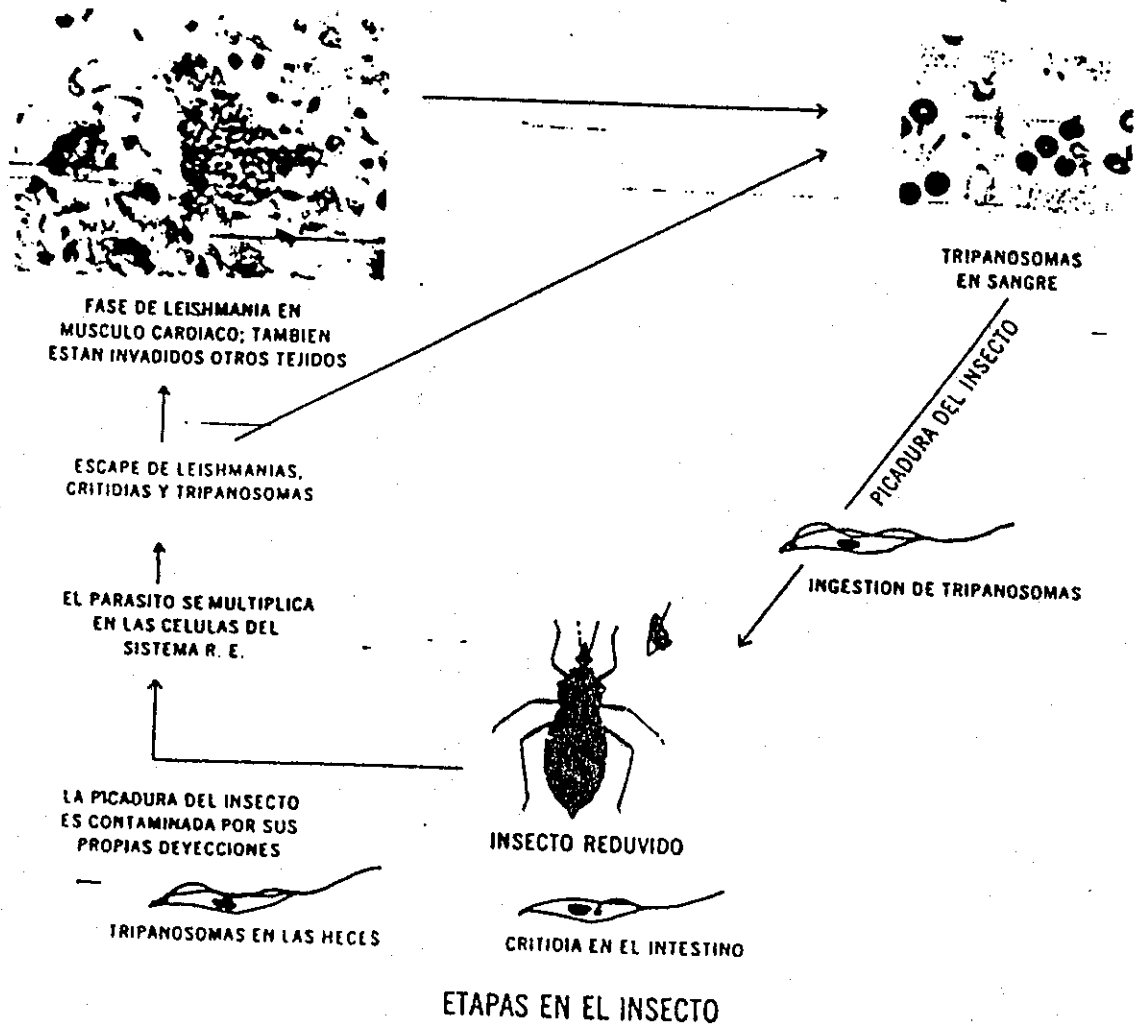
- 41) Baron E, Finegold S. Diagnostic Microbiology. 3th ed. USA: The C.V. Mosby Company, 1990. 657p.
- 42) Cancado J, Brener Z. Terapeutica in "Trypanosoma cruzi e doenca de Chagas, Brasil: Brener, Andrade A. Eds. Guanabara-Koogan 1979;1:362-424.
- 43) Brener Z. Present status chemotherapy a chemoprophylaxis of human Trypanosomiasis on the Eastern Hemisphere. Pharmacol Ther 1979;7:71-90.
- 44) Docampo R, Moreno S. Biochemical toxicology of antiparasitic compounds in the chemotherapy and chemoprophylaxis of american Trypanosomiasis (Chagas' disease). Rev in bioch tox. New York: Elsevier 1985;7:159-203.
- 45) Neal R, Van Bueren J. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of Trypanosoma cruzi in vivo and in vitro. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1988;82:709-714.
- 46) Mac Cabe R, Meagher S, Mullins B. Gamma Interferon suppresses acute and chronic I. cruzi infection in Cyclosporin treated mice. Infect Immun 1991; 59:1633-1638.
- 47) Grant I, et al. Transfusion-associated acute Chagas' disease acquired in the United States. Ann Int Med 1989;111:849-850.
- 48) Cáceres A, et al. Seroepidemiologia de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Memorias. VIII Congreso Latinoamericano de parasitología y Medicina Tropical. Guatemala: Facultad de CC. QQ y Farmacia, 1987. 198p.
- 49) Enfermedades Tropicales en Guatemala, Memoria del I Seminario Internacional de Enfermedades Tropicales. Guatemala: JICA, 1992. 180p.
- 50) Arriaza C. Enfermedad de Chagas en niños escolares, estudio prospectivo de respuesta inmunológica a I. cruzi utilizando el método de HAI en cien niños de siete a quince años, en los municipios de Olopa y Oratorio. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Médicas), 1983. 42p.
- 51) Medina V. Enfermedad de Chagas, detección al azar de la Enfermedad de Chagas en el municipio de Río Hondo Zacapa y su interrelación con estudios electrocardiográficos y radiológicos. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Médicas), 1985. 62p.

- 52) Ramirez J, Cáceres A, Matta V. El Terremoto de 1976 y la incidencia de la Enfermedad de Chagas en municipios de Guatemala. Memorias. VIII Congreso latinoamericano de Parasitología y I Congreso guatemalteco de Parasitología y Medicina Tropical. Guatemala: Facultad de CC. QQ. y Farmacia, 1987. 304p.
- 53) Gonzales B. Prevalencia de la Enfermedad de Chagas en Puerto Barrios, Izabal. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de Graduación, Facultad de CC. QQ. y Farmacia), 1986. 42p.
- 54) Castillo A. Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en el Suroriente de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de Graduación, Facultad de CC. QQ. y Farmacia), 1987. 50p.
- 55) Matta V. La Enfermedad de Chagas en Guatemala. Memorias. III Congreso Nacional de Microbiología. Guatemala: Facultad de CC. QQ. y Farmacia, 1986. 127p.
- 56) Programa de Cooperación UNESCO/UNICEF. Necesidades Educativas Básicas de la Población Rural del Area Centroamericana, Informe de Actividades, Guatemala: Lithoprisma, 1977. 180p.
- 57) Prata A. Implacoes epidemiologicas e socioeconomicas de Doenca de Chagas. Brasilia Med 1973;9:69-71.
- 58) Petana W. Educación para el control de la Enfermedad de Chagas, Bol OPS 1972;81:50-55.
- 59) Basombrio M. Trypanosoma cruzi culture used as a vaccine to prevent chronic Chagas'disease in mice. Infect Immun 1979;36:351-356.
- 60) Texeira A. Chagas'disease: Trends in immunological research for immunoprophylaxis. Bull Wld Hlt Org 1979;57:697-710.
- 61) Brener Z. Why vaccines do not work in Chagas'disease. Parasitol Tod 1986;16 9:196-197.
- 62) James B. Design Power, Statistical Design Analysis System. USA: The Johnson Inc. 1977. 376p.

XIII. ANEXOS

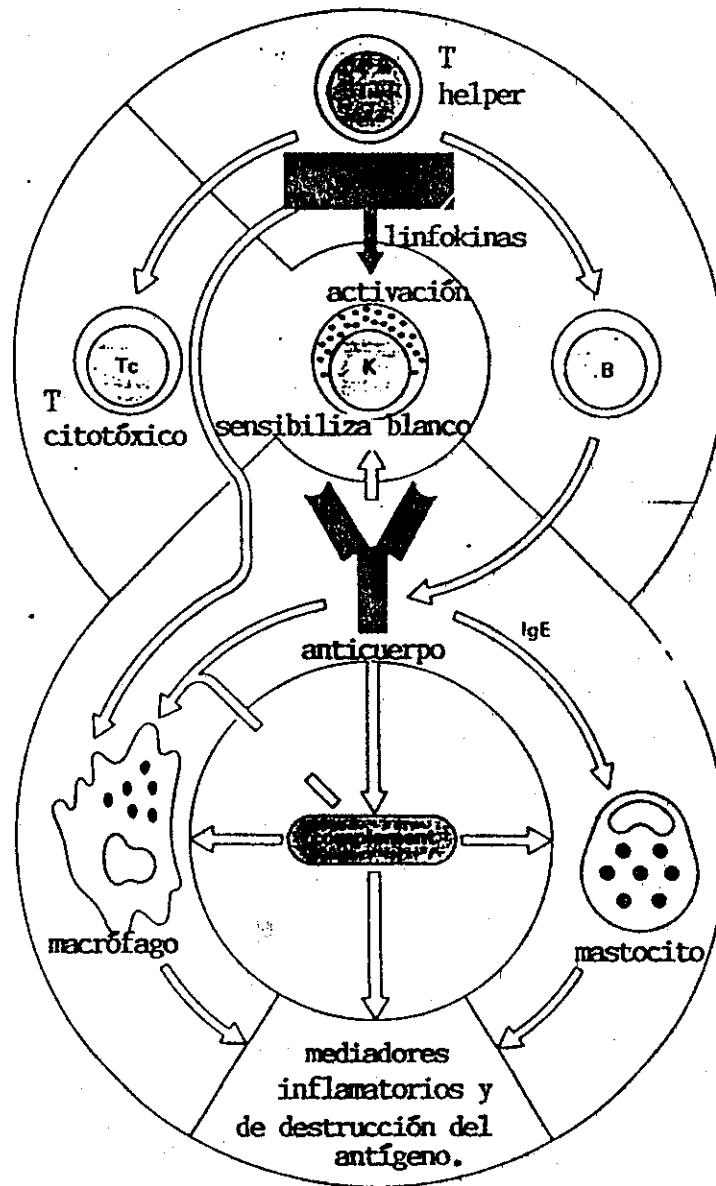
TRYPANOSOMA CRUZI

ENFERMEDAD DE CHAGAS



Ciclo vital de T. cruzi (3).

Anexo No.2



**MECANISMOS INMUNES EFECTORES.** EL sistema inmune puede activar una variedad de sistemas efectores. Las células con especificidad antigénica interactúan con otras células mediante la liberación de anticuerpos y linfocinas. El anticuerpo sensibiliza la célula blanco para llevar a cabo citotoxicidad mediada por células K (asesinas), y pueden actuar también como opsonina para macrófagos y otros fagocitos (ej. neutrófilos) con receptores Fc. El anticuerpo en asociación con el antígeno pueden activar la vía clásica del complemento, liberando péptidos quimiotácticos, actuando también como opsonina. La IgE sensibiliza mastocitos, liberando mediadores inflamatorios al unirse al antígeno; las linfocinas activan células T y B aumentando así la respuesta inmune (24).

### Anexo No.3

Tabla No.1. Sensibilidad y especificidad de los métodos serológicos utilizados en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en relación al método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) como método de referencia (8).

Método	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Hemaglutinación pasiva (Serodiagnostics)	72.7	93.3
Aglutinación en látex (Wiener)	63.6	100
ELISA (Abbott)	54.5	96.6
ELISA (Matta)	81.8	95.5



Continuacion de Tabla No. 3

---

13	1112	4279	30048	3300	3732	5523
	578	4592	24595	10844	9271	5112
	440	19373	33594	3590	7538	23422
14	246	13430	26362	361	3363	463
	300	16471	23039	357	539	326
	274	11748	9590	429	273	431
15	287	1371	720	141	216	151
	168	726	689	159	176	148
	213	382	488	158	150	310
16	221	4786	2806	387	684	468
	268	3832	3722	290	522	851
	206	2678	3909	296	496	397
17	163	11067	29678	425	476	3745
	733	9807	24574	453	6351	477
	542	12733	35688	756	499	356
18	997	12547	10664	231	1090	989
	375	15332	23411	980	1633	1211
	224	13886	22756	772	1002	2978
19	1906	33210	19005	1786	4068	3320
	777	23266	40226	2635	2876	8875
	1244	18733	37884	1786	7234	6623
20	64	16344	16578	5673	3687	5793
	198	11967	28866	7711	7885	8022
	246	10457	30063	3060	5510	4673
21	234		27194	750	1007	
	496		48183	274	396	
	135		54281	978	681	

---

Anexo No.4

Tabla No. 2. Respuesta proliferativa celular hacia T. cruzi en los siguientes pacientes seropositivos.

No.Px.	Cont(-)	ConA 5	ConA 10	Tc 5	Tc 10	Tc 20	[ $\mu$ g/ml]
1	431	18485	35128	40903	38577	63463	
	520	13687	40963	35851	36431	71369	
	456	24522	39010	38367	41822	60761	
2	805	11699	17865	38406	46183	49191	
	285	15539	20973	47547	49325	41186	
	541	10642	15987	50179	43472	62857	
3	411	11533	11980	30979	33772	26496	
	512	11015	12776	44185	27683	30386	
	205	9995	18762	27289	29528	44963	
4	100	7984	15343	34825	48250	53308	
	768	9070	19873	38288	48787	46197	
	793	9800	20907	54390	49910	45936	
5	1771	66866	51831	35394	44654	52996	
	1123	65007	57259	32259	45035	46088	
	947	60923	61546	20734	41880	46218	
6	6772	7940	19089	17325	45932	60027	
	3405	6663	13945	26393	28785	28369	
	1868	18369	12813	46631	41773	58349	
7	154	6842	9141	6105	10680	1953	
	373	4598	11482	7804	2695	18128	
	586	6478	23342	14754	2892	35994	
8	943	49933	58311	70200	62208	70481	
	3226	69689	61323	59794	64937	80266	
	4525	75812	72819	46192	56889	95718	
9	554	63195	43146	62334	101148	47606	
	396	39365	33357	32716	24429	57959	
	334	40879	46517	60475	18429	84072	
10	5184	42226	48755	19584	31688	49550	
	1701	46410	57544	17002	30479	35550	
	3679	36068	35875	13985	50831	38678	
11	2190	45952	16663	46796	46717	58661	
	998	34879	44475	37492	26541	65212	
	4345	39420	52796	40524	79322	85864	
12	1201	63119	61068	56439	67447	52933	

Continuacion de Tabla No. 2

13	2420 5791 4276	13391 9007 6373	9388 3275 1736	95173 116187 89614	87994 89678 83439	68454 13116 4593
14	459 601 1334	3588 5745 12126	15899 14315 16898	16979 24473 39208	7562 29297 31479	49592 23040 30421
15	1312 773 840	17215 20481 9374	8290 10602 10077	6615 8574 20396	22806 18350 19483	29543 9976 8220
16	374 970 3978	35975 27998 24864	17658 10079 2256	17565 15110 28446	48920 23353 50105	38466 41360 29825
17	857 184 698	58784 24898 45438	68724 45478 17783	35442 48752 37892	28414 42842 52451	58425 48872 60004
18	580 459 188	30097 41579 29876	37852 58775 48725	40331 58124 49421	45667 57811 29447	60758 35548 45563
19	1209 1638 1484		34367 49734 36280		2877 987 586	

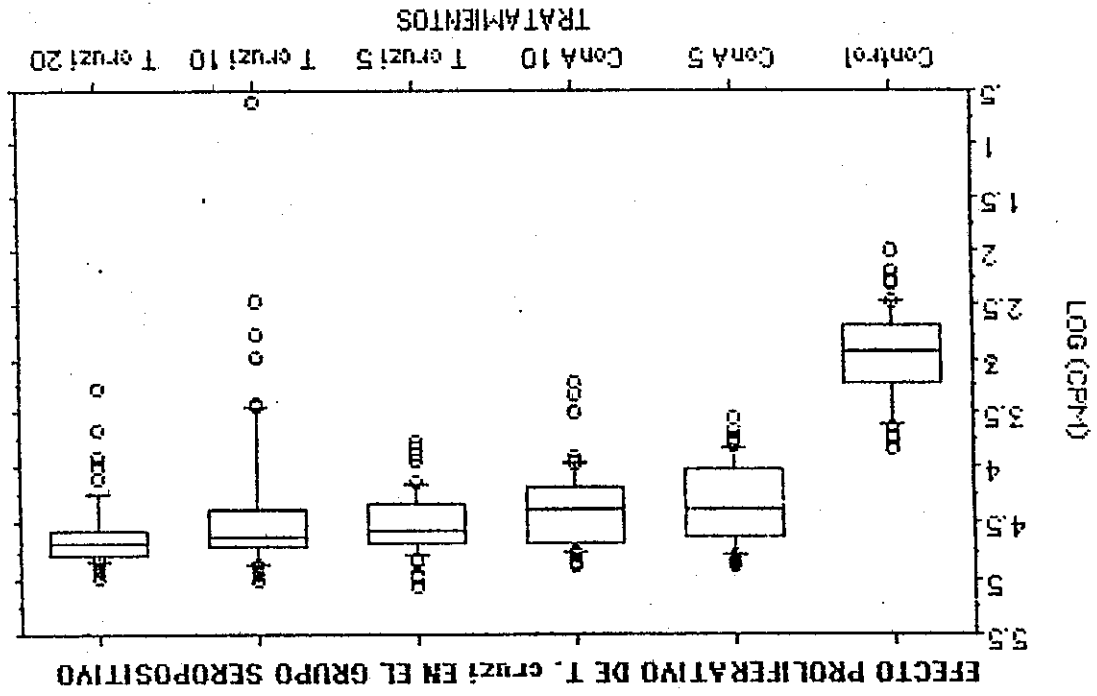
PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

Anexo No.5

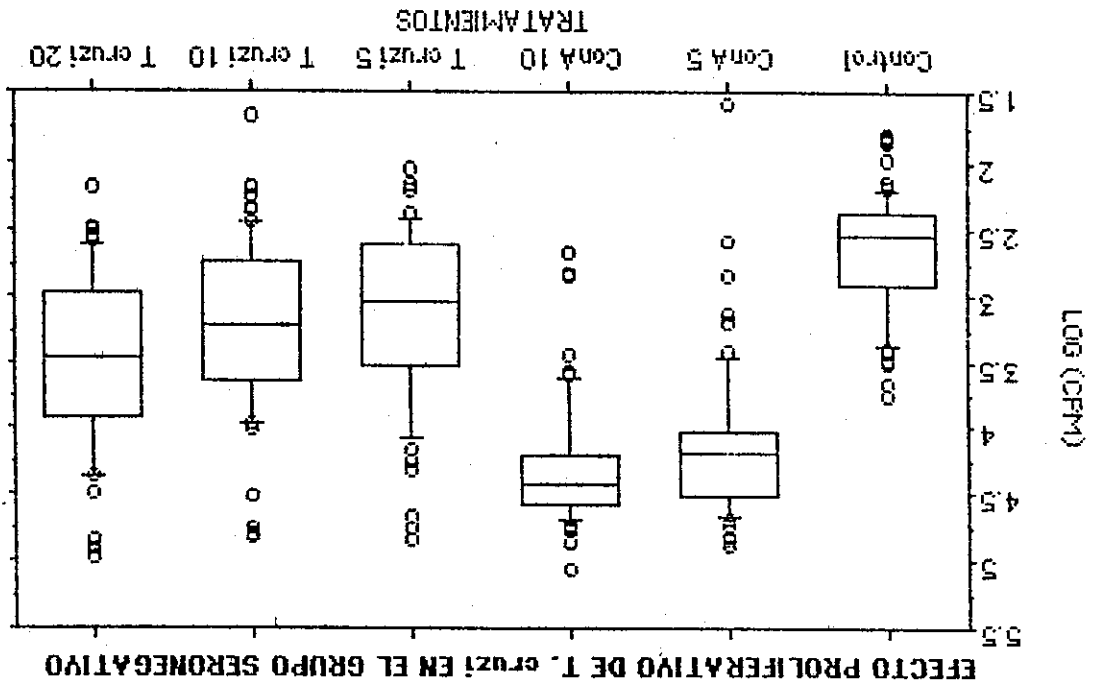
Tabla No. 3. Respuesta proliferativa celular hacia T. cruzi en los siguientes pacientes seronegativos.

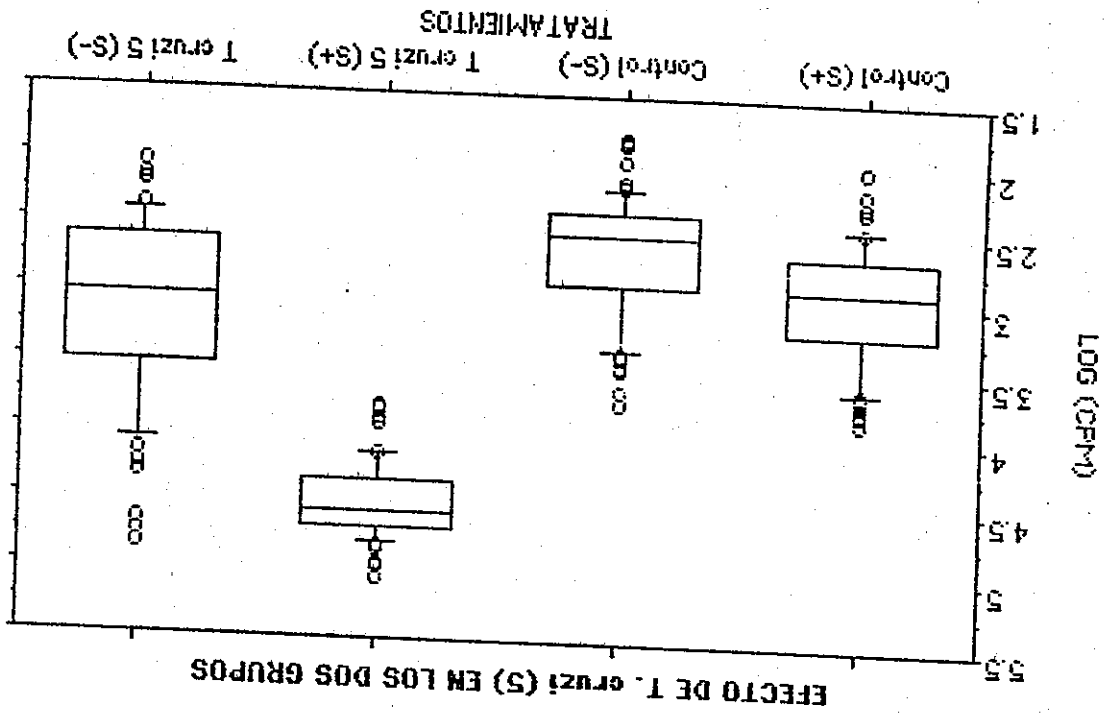
No.Px.	Cont(-)	ConA 5	ConA 10	Tc 5	Tc 10	Tc 20 [ $\mu$ g/ml]
1	245	12671	37229	2037	6145	2965
	158	17586	18441	2575	3289	10169
	165	11325	26537	1155	3611	12981
2	153	28042	33456	1449	1654	3536
	298	32293	28655	743	879	2750
	254	22446	13466	498	402	2930
3	535	10513	33160	746	1650	1341
	761	12625	17500	1171	1020	2842
	1956	10601	28926	826	522	688
4	98	27799	20237	238	2233	1130
	69	28078	38261	402	527	2528
	68	24003	42371	112	410	1801
5	173	32062	33550	374	396	4424
	253	27945	46310	492	319	2477
	285	35566	48070	324	282	414
6	543	33266	25370	302	709	636
	221	34501	15355	1108	227	1772
	360	44705	38880	277	435	633
7	5651	64964	40335	2000	2558	2170
	828	55668	44412	1573	2397	1953
	788	32874	40240	3500	1781	1648
8	267	25346	8223	14674	1765	1101
	323	6572	12517	1290	2033	2738
	579	11470	8223	1193	4317	11398
9	678	14931	4247	2832	9200	31668
	992	3621	20846	20757	4473	30658
	2360	3318	38366	18407	10568	23380
10	1731	5004	6378	4209	1429	6540
	2592	1620	15865	5113	1007	2940
	3053	5263	116460	2694	2103	16942
11	943	49933	58311	70200	62208	70481
	3226	69689	61323	57974	64937	80266
	4525	75812	72819	46192	56889	95718
12	522	44376	10837	3363	8042	16319
	349	55647	70007	5707	20745	11078

Anexo No.6



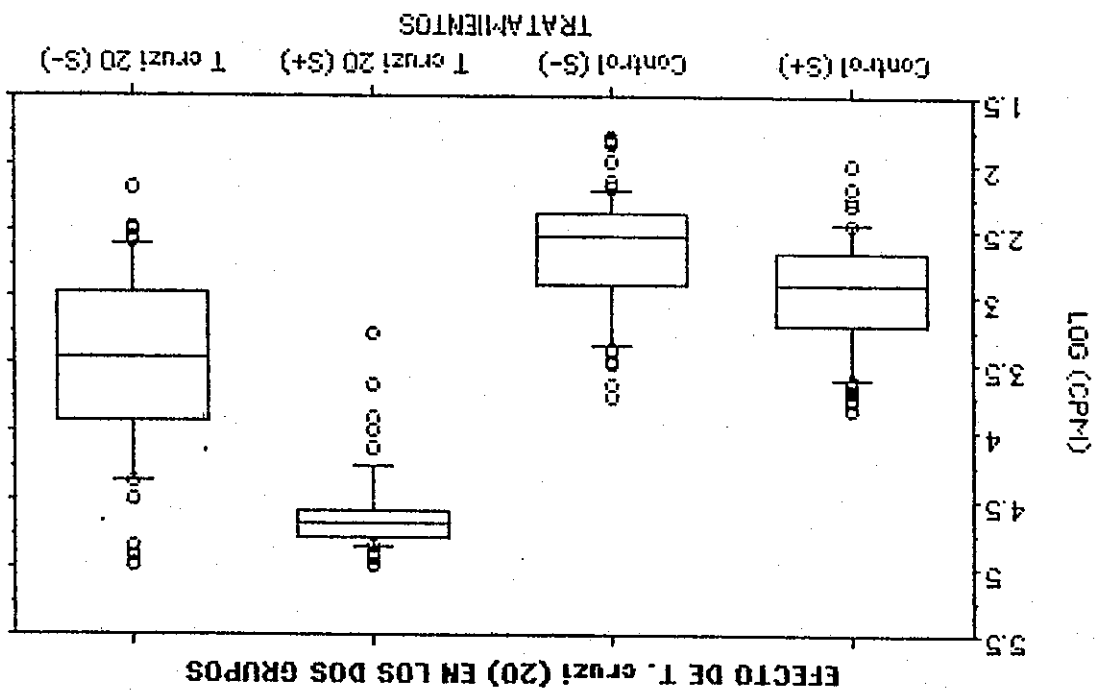
Anexo No. 7











Anexo No. 11

CUADRO No. 1

T. cruzi (S/Lg/ml)

	Seropositivos	Seronegativos	Total
Protección	50	7	57
No Protección	4	56	60
Total	54	63	117

Razón de Verosimilitud = 13.16 (5.08-34.08)

$p < 0.00001$

Anexo No.12

CUADRO No.2

I. CMZ (10<sup>6</sup>cfu/ml)

	Seropositivos	Seronegativos	Total
Proliferación	51	5	56
No Proliferación	6	57	63
Total	57	62	119

Razón de verosimilitud= 9.56 (4.43-20.56)

p<0.00001

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
 Biblioteca Central

p < 0.00001

Razón de verosimilitud = 9.77 (3.78-25.22)

			Total
		54	114
Proliferación	No	4	50
Proliferación	Proliferación	50	64
Seropositivos	Seronegativos		Total
		60	114

T. CRUZ (204g/ml)

CUADRO No. 3

Anexo No. 13

Anexo No. 14

CUADRO No. 4. Resultado del Análisis de Varianza ANDEVA no balanceado.

Condición Sero(+)/ Sero(-)	Tratamien tos	Residuo o Error	TOTAL
SC	GL	CM	F
90.2731	1	90.27315	379.92
229.774	10	22.97741	96.703
484.710	693	0.237609	---
704			P<

n = 705

CUADRO No.5. Resultados de la Prueba de Fisher para comparaciones múltiples entre todos los tratamientos de Seropositivos y Seronegativos y cada tratamiento individualmente ( $\ll 0.05$ ).

COMPARACION DE TRATAMIENTOS PARA SERO(+) vs. SERO(-)	Y1 - Y2	RESULTADO	LSD	p
todos	4.29-3.49	0.72	0.072	<0.05
Control (-)	2.96-2.65	0.31	0.147	<0.05
Con A (5 mg/ml)	4.32-4.14	0.18	0.150	<0.05
Con A (10 mg/ml)	4.37-4.30	0.07	0.147	>0.05
T. cruzi (5 mg/ml)	4.51-3.13	1.38	0.149	<0.05
T. cruzi (10 mg/ml)	4.48-3.25	1.23	0.147	<0.05
T. cruzi (20 mg/ml)	4.60-3.46	1.14	0.150	<0.05

Y = media de algún tratamiento o grupo  
 LSD, mínima desviación estándar

Anexo No.16

CUADRO No.6. Resultados de la Prueba de Dunnett donde se comparan los tratamientos con el control negativo (C-) para resultados de pacientes seropositivos, seronegativos y totales.

RESULTADOS (p<0.05)		Diferencias en valor absoluto	
Totales**	Sero(-)**	Sero(+)**	*
1.43>D2	1.49>D2	1.36>D2	∇C - ∇ Coma S
1.54>D1	1.65>D1	1.41>D1	∇C - ∇ Coma 10
1.02>D3	0.48>D1	1.55>D2	∇C - ∇ Tc S
1.06>D1	0.60>D1	1.52>D1	∇C - ∇ Tc 10
1.23>D2	0.81>D2	1.64>D2	∇C - ∇ Tc 20

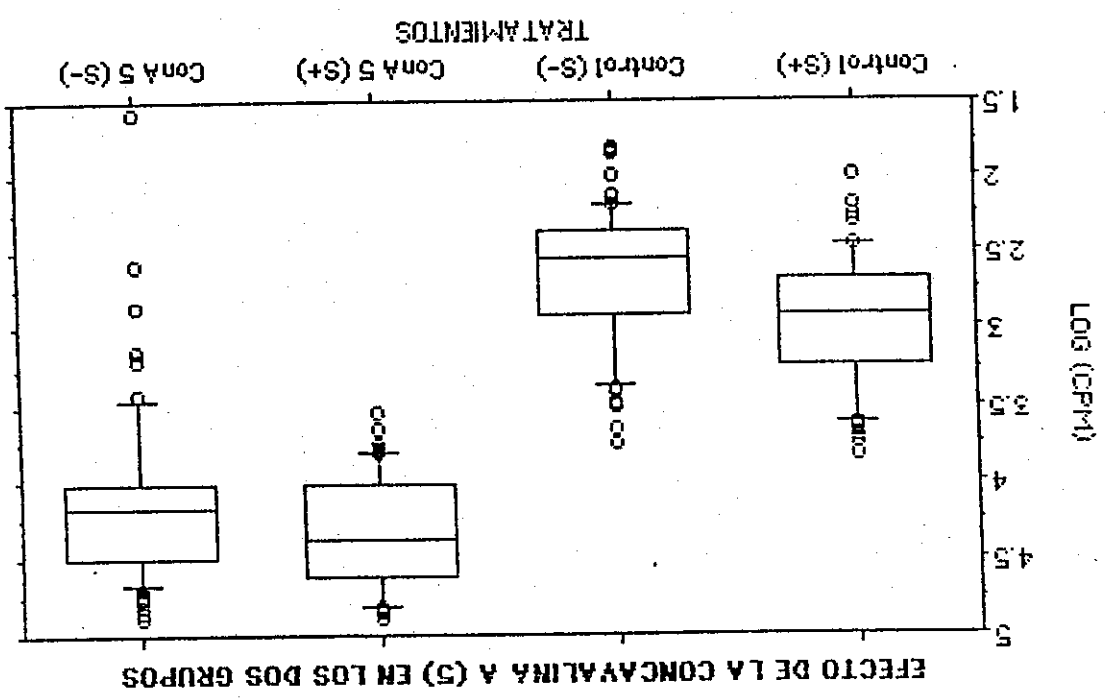
\* D1= 0.2292 \* D2= 0.2323

@ D1= 0.22 \* D2= 0.221

& D1= 0.158 \* D2= 0.160 \* D3= 0.159

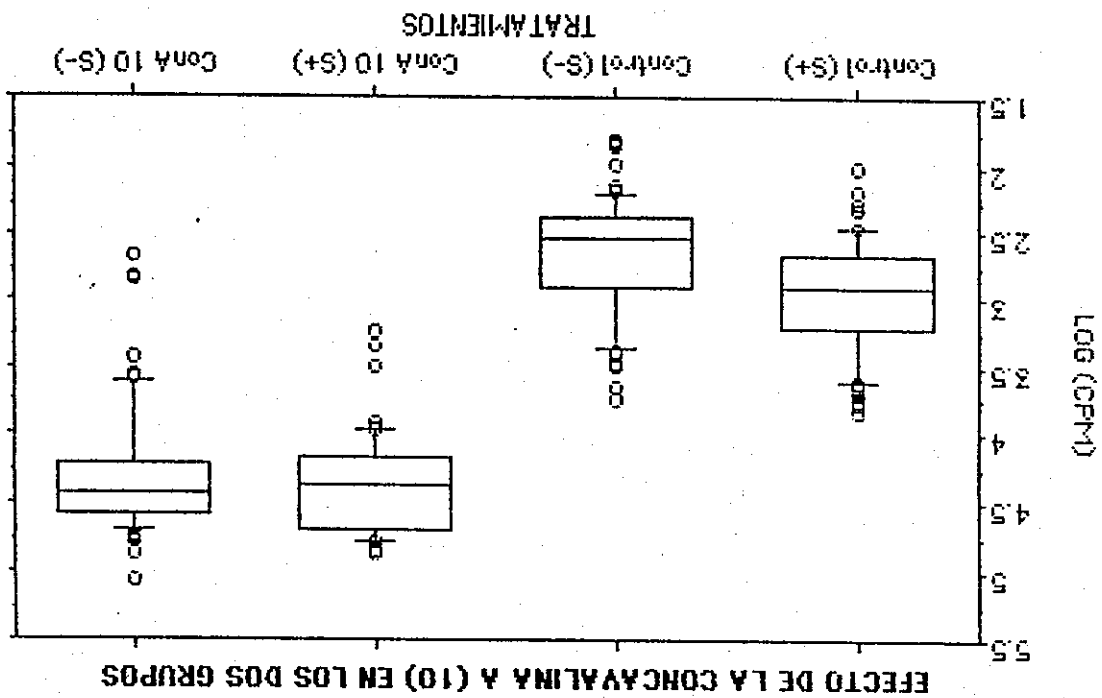
∇= media de algún grupo o tratamiento

\*\* p<0.0001 en todos los casos





PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central



Anexo No.19

Tabla No. 4. Sensibilidad y especificidad del ensayo de proliferación celular para las diferentes concentraciones de antígeno de I. CRUZI.

Concentraciones de I. CRUZI ( $\mu$ g/ml)			
	5	10	20
Sensibilidad (%)	92.59	89.47	92.59
Especificidad (%)	88.89	91.94	76.67
Kappa	0.81	0.81	0.68
IC 95% de Kappa	0.71-0.92	0.71-0.92	0.55-0.82
Acuerdo o concordancia	BUENO	BUENO	INTERMEDIO

Anexo No.20

Tabla No.5. Razones de verosimilitud donde la probabilidad de que los pacientes sean seropositivos por que proliferaron sus CMN y de ser seronegativos por no proliferar sus CMN, con un límite de confianza de 95%.

Concentración de I. CRUZ (UJ/ml)	Razones de verosimilitud	P
5	13.16	<0.05*
10	9.56	<0.05*
20	9.77	<0.05*

\* p<0.05 indica una buena asociación

Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar  
Decano

Lic. Gerardo Arroyo  
Director

Licda. Dina Dubón  
Asesora

Dr. Ramundo Velásquez  
Asesor

Martin Nestor Fernando Gil Carrera  
Autor

IMPRESOS PAIZ  
11a. Av. 24-36  
Zona 12, Reforma.  
Tel. 762694.