

ANTICUERPOS MONOCLONALES PRODUCIDOS CONTRA *Trypanosoma equiperdum* Y *Trypanosoma evansi* RECONOCEN AMBAS ESPECIES

Monoclonal Antibodies Produced Against *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* Recognize Both Species

Salvatore Giardina¹, Daniele Giansante², Teresa Mercante² y Giancarlo Paganico²

¹Departamento de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar, Apdo. 89000, Caracas (1081A), Venezuela.

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise "G. Caporale", Teramo, Italia.

RESUMEN

Los tripanosomas africanos *T. equiperdum* y *T. evansi* son dos especies patógenas del caballo con una amplia distribución en los países en áreas tropicales y subtropicales de Africa, Asia y parte de Europa para los primeros y en Africa, Asia y América para los segundos. Estas especies son los agentes etiológicos de la Dourina o Morbo Coital Maligno y de la Surra o Derrengadera respectivamente, están morfológica y antigénicamente relacionadas. Sólo es posible diferenciar las dos especies por la sintomatología clínica y el mecanismo de transmisión de la infección, la cual es por vía coital la primera y por picadura de insectos hematófagos la segunda. Se prepararon hibridomas secretantes de anticuerpos monoclonales contra *T. equiperdum* y *T. evansi*. Se usó como antígenos hidrolizados totales de ambas especies y se inocularon intraperitonealmente en ratones hembras Balb/c, sin adjuvante. De la preparación de los hibridomas se clonaron y subclonaron siete hibridomas positivos para cada una de las especies de tripanosomas en estudio. Los anticuerpos monoclonales derivados de los hibridomas para ambas especies mostraron tener relativamente bajos títulos, (1:80), ser de la clase IgM, tener una alta reactividad cruzada con antígenos de ambas especies y ser incapaces de reaccionar frente antígenos separados por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes. Mostraron una adecuada capacidad de reacción frente antígenos acoplados a placas de microtitulación en ensayos de ELISA. Nuestros resultados demuestran y reafirman que ambas especies son antigénicamente semejantes, probablemente relacionada con la estructura de la parte glicosídica de las proteínas

variables de superficie. Estos anticuerpos monoclonales pueden ser útiles como herramientas para la identificación y detección de estas especies de tripanosomas donde ambas especies no se encuentran en infecciones mixtas (Europa del Este y América).

Palabras clave: *Trypanosoma equiperdum*, *Trypanosoma evansi*, Anticuerpos Monoclonales.

ABSTRACT

The African trypanosomes *T. equiperdum* and *T. evansi* are two pathogenic species in horses with a wide distribution in countries in tropical and subtropical areas of Africa, Asia and part of Europe in the first case and in Africa, Asia and America for the second. These species are the etiological agents of Dourine and Surra or Derrengadera respectively, both are morphologically and antigenically related. It is only possible to differentiate both species by the clinical symptoms and the mechanism of transmission of the infection, which is through coitus for *T. equiperdum* and by insect bites by hematophagous flies for *T. evansi*. Secreting hybrids of monoclonal antibodies were prepared against *T. equiperdum* and *T. evansi*. They were used a total hydrolyzed antigens for both species and injected in female Balb/c mice intraperitoneally without adjuvant. The hybridomas were cloned and subcloned and seven positive hybridomas were obtained for each trypanosome species. The monoclonal antibodies for both species proved to have relatively low titles (1:80); to be of the IgM class and to have a high cross reactivity with antigens of both species. They were unable to react against separated antigens in western blotting. They reacted appropriately against antigens in ELISA. Our results demonstrate that both species are antigenically very similar,

probably due to the structure of the glycosidic moiety of the VSG. These monoclonal antibodies can be useful as tools for the identification and detection of these *Trypanosoma* species where they do not occur in mixed infections (East Europe and America).

Key words: *Trypanosoma equiperdum*, *Trypanosoma evansi*, Monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis es una de las mayores enfermedades hemoparasitarias del hombre, de los animales domésticos y silvestres, en las regiones tropicales del mundo. En 1895, en un reporte dirigido a Sir Walter Hely-Hutchinson, Gobernador de Natal y Zululandia, David Bruce [8] hace una descripción de un hematozoario tripanosomatideo encontrado en la sangre de animales enfermos no previamente descritos en Africa.

Aún cuando, desde entonces, se ha progresado mucho en el conocimiento de estos parásitos, estamos lejos de poder erradicar los devastadores efectos que ellos causan, tanto en la salud humana como animal y por ende a la economía de los países donde la enfermedad es endémica. Varios factores inciden significativamente en el reto que impone esta enfermedad: los tripanosomas han desarrollado adaptaciones que le permiten evadir o modular la respuesta inmune del hospedador, por lo cual, los inmunoprolácticos están aún lejos de ser una realidad. Estos parásitos no son fácilmente controlables por vías quimioterapéuticas debido a sus peculiaridades metabólicas y pocas drogas existen que no constituyan un problema para el hospedador por sus efectos secundarios. En este aspecto, también las consideraciones económicas han sido parte de los factores condicionantes para la falta de desarrollo y progreso [27, 30].

Trypanosoma evansi produce la Surra, el Mal de Caderas o la Derrengadera. Es un tripanosoma patógeno de amplia distribución mundial con prevalencia en casi todos los países africanos, del Medio Oriente, del continente asiático y el sub-continente Latinoamericano. *T. evansi* es transmitido mecánicamente por moscas hematófagas de los géneros *Tabanus* y *Stomoxys* [11, 19, 24, 31, 46] y vampiros (*Desmodus rotundus*) [16]. Los caballos, burros, y camellos son los animales más severamente afectados, mientras que en los vacunos, suinos, ovinos y caprinos, la enfermedad es menos severa [20, 21, 33, 37, 45]. *T. evansi* puede infectar a una gran variedad de huéspedes de los cuales muchos son sólo reservorios, entre ellos venados (*Odocoileus gymnotis*, *O. chiri-quensis*, *Cervus timorensis russa*) y chigüires (*Hydrochoerus hydorchoeris*), [2, 9, 13, 16, 38, 39, 48].

T. equiperdum es el agente causal de la Durina o Morbo Coital Maligno, una enfermedad venérea transmitida sexualmente, la cual está distribuida tanto en países de las regiones tropical y subtropical del mundo [1] así como en sur y este de Europa. En Venezuela no se ha descrito su presencia en rebaños de caballos.

Estas enfermedades están separadas tanto por características clínicas como epidemiológicas, a pesar de la inherente similitud de los agentes causales. Sin embargo, es esta semejanza la que incide fuertemente en el diagnóstico parasitológico diferencial, por la dificultad de detectar el organismo aún en casos clínicamente bien definidos [32]. A partir de estos problemas se han desarrollado métodos de diagnóstico basados en coloraciones (QBC, quantitative buffy coat;) [3]; detección de anticuerpos [40]; detección de antígenos [28] y en reacción en cadena de polimerasa [36]. A pesar del desarrollo de métodos de diagnóstico, sólo es posible diferenciar la enfermedad mediante los signos clínicos, principalmente cuando estos están presentes en la fase aguda de la enfermedad. En el presente trabajo se describe la preparación de anticuerpos monoclonales y su potencial uso en la diferenciación de ambas especies en zonas donde las infecciones naturales no ocurren en forma concomitante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción y purificación de Tripanosomas

Sangre infectada con *T. equiperdum* (Cepa Instituto Zooprofilattico Sperimentale Dell'Abruzzo e Molise G. Caporale, Teramo, Italia) y *T. evansi* (Cepa obtenida de caballos salvajes del Edo. Apure, Venezuela, gentilmente donada por el Prof. Francisco García, Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV, Maracay) ambas mantenidas bajo nitrógeno líquido, fueron descongeladas a 37°C e inoculadas intraperitonealmente (IP) en ratas Wistar. La parasitemia fue determinada cada tres días, cuando al menos tres tripanosomas fueron visibles en un campo microscópico, las ratas fueron anestesiadas (Ketamina, Ketalar^R), sangradas y otras dos ratas fueron inoculadas IP, con la sangre proveniente de la primera. La infección de las ratas fue seguida determinando la parasitemia cada dos días, cuando la sangre estaba con alta parasitemia (10^8 a 10^{10} tripanosomas/mL) las ratas fueron anestesiadas y sangradas por punción cardíaca, usando citrato de sodio al 3,8% como anticoagulante.

La purificación de los tripanosomas fue realizada mediante el método descrito por Giardina y col. [25]. Brevemente, la sangre anticoagulada obtenida de las ratas fue centrifugada a 1000 x g por 10 minutos a 4°C, la capa blanca superior (buffy coat) fue separada junto con un tercio de la capa de glóbulos rojos. Esta capa blanca fue resuspendida en una solución tampón PBSG (57 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 43.8 mM NaCl, pH 8.0, 1% Glucosa) y centrifugada por dos o tres veces más separando cada vez la capa blanca con la mínima cantidad de glóbulos rojos posibles, utilizando, cada vez, tubos de centrifuga de menor diámetro. Finalmente, la capa blanca y los pocos glóbulos rojos contaminantes fueron resuspendidos en PBSG y cargados sobre una columna de cromatografía, conteniendo Dietil Aminoetil celulosa (DEAEc), como lecho de separación, previamente equilibrada con la misma solución tampón. La columna fue drenada con la misma solución tam-

pón, colectándose fracciones de 5 mL hasta que no se observaron más tripanosomas por microscopía de luz visible en contraste de fases. Las fracciones que contenían los tripanosomas fueron reunidas y centrifugadas como se describió anteriormente. El sedimento de tripanosomas fue resuspendido y lavado 2 veces en la misma solución tampón, separado en alícuotas, centrifugado, drenado el sobrenadante y conservado seco bajo nitrógeno líquido (-196°C) para ulteriores usos.

Producción de anticuerpos monoclonales (AcM)

Antígeno: El inóculo antigénico fue preparado resuspendiendo 10^7 *T. equiperdum* o *T. evansi* en 500 μ L de solución salina estéril (150 mM NaCl en H₂O destilada) y congelado y descongelado en una mezcla de hielo seco:acetona (-76°C) por cinco ciclos y luego homogeneizado pasándolo a través de una aguja de inyectora de calibre 25.

Ratones: Seis ratones singénicos Balb/c hembras, de seis semanas de edad, se dividieron en dos grupos: uno de cuatro, al que se inmunizó intraperitonealmente con el inóculo antes descrito y otro de dos, que se inoculó con solo solución salina estéril como control normal, para cada especie de *Trypanosoma*.

Sangrado de los ratones: Los ratones inmunizados y controles fueron sangrados por la cola. La cola de cada uno de ellos fue limpiada con alcohol y luego se realizó un pequeño corte bajo una de las venas caudales con un bisturí estéril. Cincuenta μ L de sangre fue sacada, la cual se incubó a 37°C por una hora y luego fue transferida a 4°C por 2 horas. El suero fue colectado y centrifugado a 1000 x g por 10 minutos a 4°C y finalmente ensayado para anticuerpos anti-tripanosoma por el método de ELISA.

Preparación de anticuerpos monoclonales: Los anticuerpos monoclonales fueron preparados de acuerdo a una modificación de los métodos descritos previamente [17, 23, 26]. Cuatro ratones hembras Balb/c fueron inmunizados, tal como se describió anteriormente, los días 0, 14, 28 y un reto final fue dado en las mismas condiciones el día 57, tres días antes de la fusión. En el día 60 el bazo fue removido quirúrgicamente y 10^8 células esplénicas lavadas, fueron fundidas con células de mieloma murino Sp2/0-Ag-14 en una proporción 1:4 con polietilenglicol (PEG 1500) al 50% (p/p). Las células fusionadas fueron transferidas a placas de microtitulación y mantenidas en medio de cultivo HAT (Hipoxantina, Aminopterina, Timina, Flow Laboratories, USA) por 14 días. El sobrenadante de cultivo de los pozos con hibridomas en crecimiento fueron ensayados por ELISA en placas activadas con un extracto total de *T. equiperdum* o *T. evansi*. Los hibridomas que reaccionaron con *T. equiperdum* o *T. evansi*, pero no con suero de rata, fueron clonados por dilución limitante [54].

Ensayo inmunoenzimático ELISA

Las placas para ELISA fueron activadas con 100 μ L de un extracto total de tripanosomas en solución tampón carbonato-bicarbonato, 50 mM, pH 9.6, con una concentración de pro-

teínas de 20 μ g/mL. Las placas fueron incubadas a 4°C durante toda la noche, luego fueron lavadas 3 veces con 300 μ L/pozo de tampón fosfato salino (PBS) conteniendo 0.1% de Tween 20 (PBST). Se colocaron 50 μ L de suero con diluciones entre 1:2 hasta 1:64 en PBST o sobrenadante de cultivo de hibridomas sin diluir en cada pozo más 1% de extracto de levadura como bloqueante (PBSTY). Se incubó 45 minutos a 37°C en cámara húmeda. Luego la placa de microtitulación fue lavada como se describió previamente. Se añadió un conjugado anti ratón-Peroxidasa en una dilución final de 1:1000 en PBSTY, se incubó 30 minutos a 37°C, se lavó 3 veces con PBST. La reacción antígeno-anticuerpo fue revelada al añadir 50 μ L OPD (Sigma Chem Co., St. Louis, MI, USA) disuelto en tampón 50 mM fosfato-citrato pH 5.0 a una concentración de 0.5 mg/mL y 0.02% de peróxido de hidrogeno como sustrato de la peroxidasa. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, la reacción fue detenida con la adición de 50 μ L de ácido sulfúrico 2N y la reacción fue leída en espectrofotómetro a 492 nm. Este ensayo fue usado tanto para medir la respuesta inmune de cada ratón (días 28 y 60 post-inóculo) como para medir la producción de anticuerpos monoclonales por los hibridomas correspondientes.

Isotipo de anticuerpos monoclonales

La determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales fue realizada usando un conjunto de reactivos (Kit) para la determinación del isotipo a anticuerpos de ratón [Immunopure Monoclonal Antibody Isotyping Kit I, Pierce, Rockford, IL, USA], mediante ELISA dependiente de antígeno, tal como lo recomienda el fabricante.

Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes en presencia de Sodio Dodecil Sulfato (SDS)

Muestras de ambas especies, conteniendo 10^7 tripanosomas, fueron resuspendidas en solución tampón de muestra para electroforesis (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.0% SDS, 2.0% -mercaptoetanol, 15% Glicerol y 0.01% Azul de Bromofenol), fueron calentadas a 100°C por 5 minutos y posteriormente enfriadas a 4°C en hielo. Esta preparación fue cargada en los bolsillos de un gel de poliacrilamida de concentración al 5% y uno de separación al 10% de acuerdo con el método descrito por Laemmli [30] (Miniprotean II, Bio Rad, USA). La separación electroforética fue realizada a 50 mA hasta que el colorante marcador alcanzó el polo positivo. El gel fue teñido con colorante Coomassie Brilliant Blue. Se usaron estándares de pesos moleculares de amplio rango para fines de comparación de los pesos moleculares de cada una de las bandas (Broad range molecular weight std, Bio-Rad, USA).

Inmunorreacción sobre papel de nitrocelulosa (Western immunoblotting)

La separación e inmunorreacción de los antígenos fue realizada de acuerdo al método descrito por Towbin y col., [51]. La mezcla antigénica consistió de una suspensión igual a

la descrita para la electroforesis en geles de poliacrilamida y separada por el mismo método. Después de la separación, las proteínas fueron transferidas a papel de nitrocelulosa con poro de 0,45 μm , a 100 V por 45 min en solución tampón de transferencia (25 mM Tris, 190mM glicina y 20% metanol). Posteriormente las membranas fueron bloqueadas por 2 horas con solución tampón A de bloqueo (solución fosfato salina 100 mM, pH 7.4, 0.05% Tween-20 conteniendo 1% polivinilpirrolidona, PVP-40, Sigma Chem Col., USA). El papel de nitrocelulosa transferido y bloqueado fue incubado con sobrenadante de cultivo de los hibridomas positivos sin diluir, determinados por ELISA, las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas 3 veces con la misma solución A y posteriormente incubadas con un conjugado anti ratón-Peroxidasa (Sigma, Chem, Co., USA) diluido 1:3000. Las membranas fueron otra vez lavadas extensamente y posteriormente incubadas con una solución conteniendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chem. Co, USA) en tampón Tris 50 mM pH 7.5 y 25 μL de peróxido de hidrógeno al 30%, hasta que las bandas antigénicas se hicieron evidentes.

Estadística

La comparación estadística de las dos muestras se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA)[47] de los valores de Densidad Optica para cada una de las especies.

RESULTADOS

Respuesta inmune de ratones contra *T. equiperdum* o *T. evansi*.

La respuesta inmune de los ratones inoculados con *T. equiperdum* o *T. evansi* fue evaluada por ELISA utilizando extracto total de tripanosomas como antígeno para la activación de las placas. La respuesta inmune fue medida a los 28 y 60 días post-inóculo con el fin de proceder posteriormente al proceso de fusión y producción de hibridomas. A los 28 días tanto los ratones inoculados con *T. equiperdum* como los inoculados con *T. evansi* no superaron 0.8 unidades de D. O. medida a 492 nm con la mínima dilución (1:2), con un título mínimo de 1:32 para ambos grupos de ratones (No mostrados). A los 60 días los títulos de ambos grupos se incrementaron hasta alcanzar a 1:1280 para *T. equiperdum* y 1:5000 para *T. evansi*. Las curvas de D.O. vs dilución muestran una típica tendencia

asintótica hacia cero. Los sueros de los ratones control se mantuvieron negativos con títulos que no superaron a la dilución 1:8 para D.O. no superiores a 0.2 unidades (No mostrados). Con esta respuesta inmune los ratones fueron sacrificados a fin de obtener el bazo y poder realizar las fusiones correspondientes.

Aislamiento de células híbridas productoras de anticuerpos monoclonales contra *T. equiperdum* o *T. evansi*

La selección de los hibridomas en crecimiento se realizó en un medio rico en hipoxantina, aminopterina y timina (HAT). Los puntos de crecimiento de los híbridos fueron vistos a los 8 días aproximadamente y los sobrenadantes fueron ensayados cada tres días para anticuerpos anti tripanosomas. Se aislaron 5 clones positivos para *T. equiperdum* y 14 para *T. evansi*, de la misma forma se encontraron clones parcialmente positivos, cuya secreción de anticuerpos anti-tripanosoma era muy baja, los cuales fueron descartados al igual que los clones negativos (TABLA I) Los híbridos positivos se clonaron de acuerdo con la técnica de dilución limitante y con el fin de aumentar la probabilidad de crecimiento de clones simples, las células fueron diluidas para permitir crecimiento hasta alrededor del 40% de los pozos solamente, lo que equivale estadísticamente a una célula por pozo. De la subclonación de los híbridos positivos se obtuvieron 7 anticuerpos monoclonales para cada especie, los cuales aparecen descritos en la TABLA II. Estos anticuerpos monoclonales se utilizaron ulteriormente para determinar su reactividad frente antígenos homólogos (la misma especie de la cual se deriva) y heterólogos, es decir, la otra especie de tripanosoma y suero de ratas.

Titulación de anticuerpos monoclonales. Reacciones cruzadas

Con el fin de conocer el título y las reacciones cruzadas entre ambas y los anticuerpos monoclonales seleccionados se procedió a determinar la reactividad de cada AcM contra antígenos de ambas especies y proteínas séricas de rata (TABLA III) y el título (FIGS. 1A, 1B y 1C). En la TABLA III se puede observar que los valores máximos de D.O. alcanzados de los AcM producidos contra *T. equiperdum* oscilan en un rango que varía entre 1.2 y 0.29 unidades de D.O. cuando se usa como antígeno un extracto total del propio parásito mientras que es-

TABLA I
NÚMERO DE HIBRIDOMAS POSITIVOS, PARCIALMENTE POSITIVOS Y NEGATIVOS CONTRA ANTÍGENOS DE *T. equiperdum* (TEQ) Y *T. evansi* (TEV) OBTENIDOS POR SELECCIÓN EN MEDIO HAT. LOS CLONES POSITIVOS PARA CADA ESPECIE FUERON SUBCLONADOS, MIENTRAS QUE LOS PARCIALMENTE POSITIVOS Y LOS NEGATIVOS FUERON DESCARTADOS

Antígeno	Hibridomas			Totales
	Positivos	Parcial	Negativos	
Teq	5	14	5	24
Tev	14	7	3	24

tos valores varían entre 1.6 y 0.55 cuando se utilizan antígenos producidos por extracto total de *T. evansi*. Todos los valores fueron superiores con antígenos heterólogos a excepción de los AcM N° 38 y 48. Los AcM anti *T. equiperdum* reaccionan contra suero de rata a un nivel equivalente al control negativo sin antígeno. El suero policlonal reacciona contra antígeno homólogo a un valor promedio de lo que reaccionan los diferentes monoclonales. Los AcM producidos contra *T. evansi* presentaron un alto título, todos superaron 2 unidades de D.O. frente a antígenos homólogos, mientras que sus valores oscilaron entre 0.69 y 1.9 unidades contra antígenos de la especie heteróloga. Al igual que con los AcM anti *T. equiperdum*, los AcM anti *T. evansi* reaccionan contra suero de rata en forma equivalente a como reaccionan en el control negativo contra PBS, sin antígeno.

Las FIGS. 1A, 1B y 1C se muestran los títulos de los AcM contra antígenos de la especie homóloga y heteróloga. En los sobrenadantes de cultivo de hibridomas producidos contra *T. equiperdum* y ensayados contra Ags homólogos y heterólogos (AcM: 1, 11, 42, 38, 19, 48 y 17) no supera el título de 1:80 (FIGS. 1A y 1B). Los sobrenadantes, de los cultivos de hibridomas producidos contra *T. evansi* alcanzaron títulos de 1:243 en todos los casos tanto contra antígenos homólogos como heterólogos FIGS. 1B y 1C. Los controles negativos alcanzaron títulos de 1:8.

Determinación de isotipo de los anticuerpos Monoclonales

Todos los anticuerpos monoclonales seleccionados fueron clasificados en términos de la clase de inmunoglobulina mediante ELISA antígeno dependiente, utilizando anticuerpos anti-ratón isotipo-específico. Los resultados demostraron que todos pertenecían al isotipo IgM con cadena ligera tipo kappa.

Determinación de la especificidad de reconocimiento de moléculas antigénicas

Intentos repetidos (5 veces) para demostrar la especificidad de reconocimiento específico de moléculas antigénicas mediante la reacción antígeno-anticuerpo en membrana de nitrocelulosa después de la separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes en presencia de SDS fueron infructuosas, a pesar de que las moléculas separadas en geles de poliacrilamida mostraron una clara definición de las bandas, FIG. 2.

DISCUSIÓN

El presente estudio fue diseñado con el fin de desarrollar anticuerpos monoclonales contra componentes celulares de *T. equiperdum* y *T. evansi* con el propósito de utilizarlos como reactivos diagnósticos y para posibles estudios de estructura función.

Se obtuvieron diecinueve hibridomas secretantes positivos, 5 para *T. equiperdum* y 14 para *T. evansi*, a partir de cua-

TABLA II
ANTICUERPOS MONOCLONALES, SUBCLON Y ESPECIE DE TRIPANOSOMA DE LA CUAL SE DERIVA

AcM N°	Especie
1	<i>T. equiperdum</i>
11	<i>T. equiperdum</i>
42	<i>T. equiperdum</i>
38	<i>T. equiperdum</i>
19	<i>T. equiperdum</i>
48	<i>T. equiperdum</i>
17	<i>T. equiperdum</i>
3	<i>T. evansi</i>
36	<i>T. evansi</i>
40	<i>T. evansi</i>
56	<i>T. evansi</i>
51	<i>T. evansi</i>
53	<i>T. evansi</i>
54	<i>T. evansi</i>

renta y ocho hibridomas totales TABLA I, de los cuales se subclonaron siete para cada una de las especies TABLA II.

La reactividad de los AcM se ensayó mediante ELISA utilizando antígeno homólogo, de la misma especie de tripanosoma que le dio origen, o heterólogos, es decir, antígenos de la otra especie en estudio o suero de rata. Los anticuerpos monoclonales desarrollados contra *T. equiperdum* (N° 1, 11, 42, 38, 19, 48 y 17) mostraron una relativa baja reactividad contra antígenos homólogos TABLA III. De la misma forma todos reaccionaron contra antígenos de la especie *T. evansi*. Llama la atención el hecho que la reacción es más alta, en términos de D.O., contra antígenos de la especie heteróloga que contra los antígenos homólogos, cuando se comparan uno a uno (0.808 ± 0.311 vs 1.018 ± 0.335 respectivamente). La comparación estadística mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) de los valores de D.O. para cada una de las especies, muestra que no hay diferencias entre ambos grupos (F=1.472221; p=0.2483), ni dentro de los grupos. Los AcM desarrollados contra *T. evansi* (N° 3, 36, 40, 56, 51, 53 y 54) mostraron una alta reactividad frente a antígenos homólogos, con una absorbancia ≥ 2 en todos los casos y una relativa baja reactividad contra antígenos de la especie *T. equiperdum*. La comparación estadística mediante ANOVA muestra que la diferencia entre los dos grupos es altamente significativa (F=1.32985; p=0.0011). Como es bien conocido, los tripanosomas incorporan proteínas y otros factores séricos, los cuales son utilizados tanto en los procesos metabólicos para la generación de energía como en los de división celular, por lo tanto se incorporó la reactividad de los AcM contra suero de rata a fin de descartar la posibilidad de que la reactividad cruzada entre antígenos homólogos y heterólogos fuese debida a componentes de origen hospedero. Los resultados muestran que

TABLA III

REACTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA ANTÍGENOS HOMÓLOGOS (AG DE TRYPANOSMA DE LA MISMA ESPECIE) Y HETERÓLOGOS (AG DE TRIPANOSOMA DE LA ESPECIE CONTRARIA Y SUERO DE RATA). LA REACTIVIDAD FUE MEDIDA POR ELISA A UNA CONCENTRACIÓN DE 20 mGG/mL DE AG. LOS VALORES DE MUESTRAS TRIPLICADAS, PARA ANTÍGENOS DE TRYPANOSOMAS, ESTÁN EXPRESADAS CON DO₄₉₂ MENOS DO₄₉₂ DE PBS CONTROL. LOS CONTROLES NEGATIVOS SON LA REACTIVIDAD DE LOS ACM CONTRA SUERO DE RATA Y DEL GRUPO DE RATONES INMUNIZADOS CON SOLUCIÓN SALINA ESTÉRIL CONTRA EL ANTÍGENO CONTRA EL CUAL SE PRODUJO EL ACM

AcM N°	Producido Contra	Reactividad contra Ag de		Suero	Controles	
		<i>T. equiperdum</i>	<i>T. evansi</i>			Negat
11	Teq	0,864 ± 0,10	1,133 ± 0,30	ND		0,04
1	Teq	0,653 ± 0,07	0,910 ± 1,00	0,067		
42	Teq	1,264 ± 0,04	1,598 ± 1,10	0,062		
38	Teq	0,934 ± 0,89	0,887 ± 0,27	0,058		
19	Teq	1,015 ± 0,53	1,225 ± 0,16			
48	Teq	0,632 ± 0,60	0,554 ± 0,38			
17	Teq	0,299 ± 0,14	0,824 ± 0,10	0,062		
3	Tev	1,260 ± 0,21	>2	0,060		
36	Tev	1,928 ± 0,58	>2	0,065		
40	Tev	0,691 ± 0,10	>2	ND		0,07
56	Tev	1,625 ± 0,12	>2	0,067		
51	Tev	1,357 ± 2,38	>2	0,063		
53	Tev	1,476 ± 1,19	>2	0,065		
54	Tev	0,891 ± 0,45	>2	0,070		

NEG: Control sin antígeno. Reactividad contra PBS.

la reactividad de los AcM desarrollados por nosotros no reconocen componentes antigénicos provenientes del suero de rata (TABLA III).

Con el fin de llevar a cabo su caracterización se procedió a titular los AcM obtenidos contra su propio antígeno (homólogo) y contra el antígeno heterólogo, como control se utilizó un suero de ratón contra solución de fosfato salino tamporada (PBS). Los resultados se muestran en las FIGS. 1A, 1B y 1C. En ellas puede observarse que los AcM obtenidos carecen de especificidad de especie por cuanto reaccionan tanto contra antígenos homólogos como contra los heterólogos. En general, en la respuesta inmune humoral de los ratones contra antígeno de *T. equiperdum*, el título máximo obtenido no supera a 1:80. La respuesta inmune humoral contra *T. evansi*, medida por ELISA con antígeno homólogo, fue muy superior a la que se observó contra antígenos heterólogos (*T. equiperdum*), sin embargo, es apreciable la reactividad cruzada de estos anticuerpos monoclonales contra antígenos heterólogos. La respuesta inmune control es semejante a la respuesta medida con sueros de ratones negativos. La respuesta inmune humoral contra tripanosomas africanos ha sido ampliamente estudiada, debido fundamentalmente a dos fenómenos asociados con ésta, la variación antigénica [15] y la inmunosupresión [12, 34, 46, 53]. La respuesta inmune mediada por anticuerpos

está dirigida fundamentalmente contra las proteínas variables de superficie (VSG), una glicoproteína única [4, 22, 43, 52] que recubre casi a toda la población de tripanosomas en un momento dado, dando lugar a la aparición de oleadas de parasitemias de diferentes tipos antigénicos variables (VATs) en una infección *in vivo* [14]. Cuando las diferentes moléculas de VSG son expresadas en la superficie de parásitos vivientes, éstas no reaccionan cruzadamente. Sin embargo, cuando están purificadas o aisladas [5, 6] hay reacción cruzada en determinantes antigénicos localizados en la estructura de carbohidratos del C terminal de las moléculas de glicoproteínas [10] lo que estaría en concordancia con la clase de AcM obtenidos por nosotros, ya que se sabe que la reacción contra carbohidratos es fundamentalmente del tipo IgM. A su vez el amino ácido del C terminal está unido covalentemente a etanolamina y ésta a un oligosacárido que contiene galactosa, manosa y glucosamina y todo anclado a glicosil-fosfatidil-inositol, GPI [18, 36, 37]. Cuando los tripanosomas son lisados, la VSG anfifílica, que contiene un extremo hidrosoluble y el otro liposoluble, se transforma en la forma soluble en agua [10] debido a la acción de la fosfolipasa C endógena, la cual corta el dimiristil (C_{14:0}) glicerol del glicolípido, liberando la VSG soluble [27]. Esta liberación de la VSG está asociada con la aparición de un determinante formado por Inositol-P₀ que reaccionan cruzadamente entre las diferentes VSGs [45].

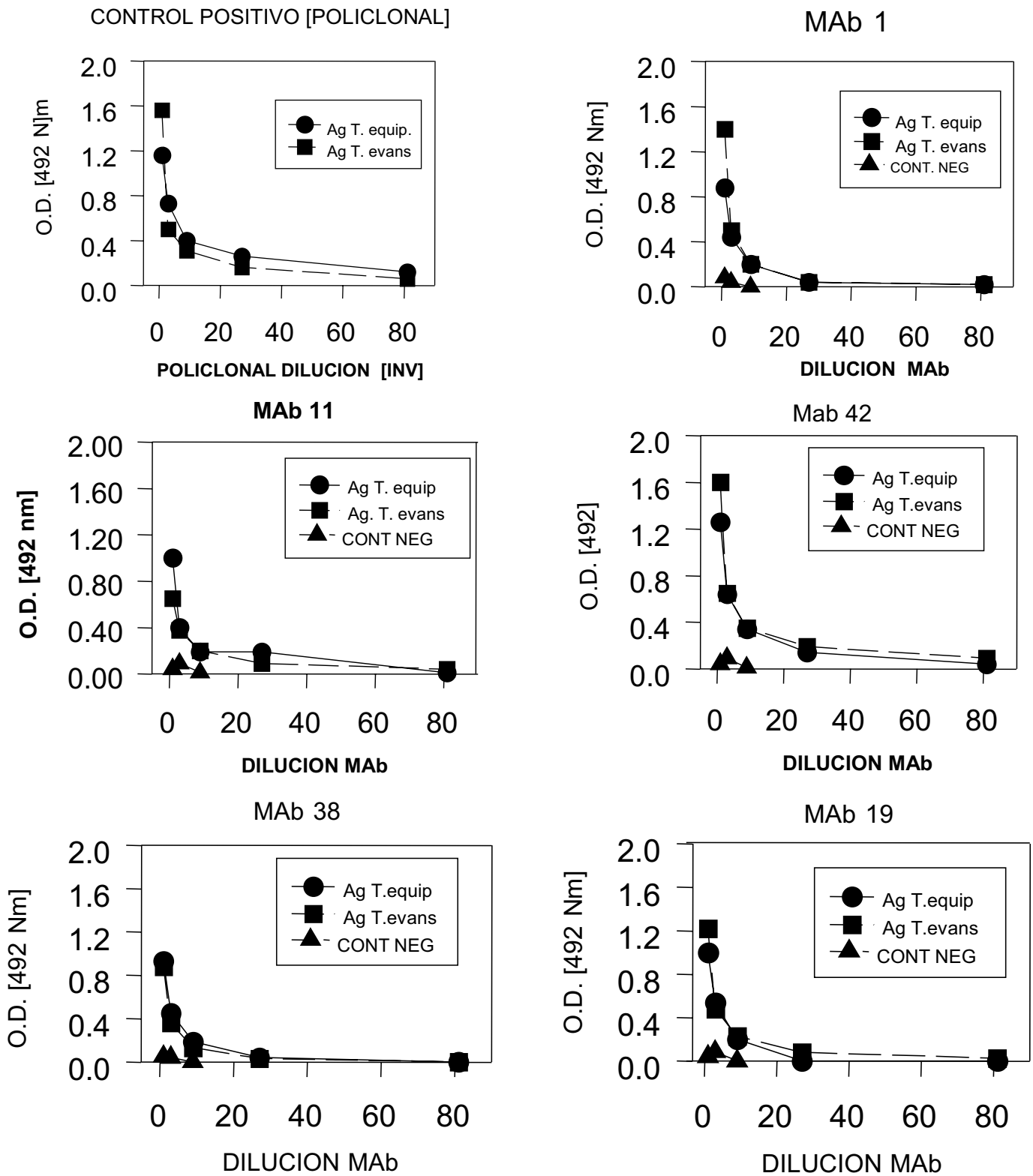


FIGURA 1A. REACCIÓN CRUZADA Y TÍTULO DE LOS ACM CONTRA ANTÍGENOS DE *T. equiperdum* Y *T. evansi* DETERMINADOS MEDIANTE ELISA. MAB 1, 11, 42, 38 Y 19: ACM ANTI *T. equiperdum*. DILUCIÓN MAB: INVERSO DEL TÍTULO. CONTROL POSITIVO: CORRESPONDE AL SUERO POLICLONAL DE RATÓN ANTI TRIPANOSOMA. MAB: ANTICUERPO MONOCLONAL (ACM).

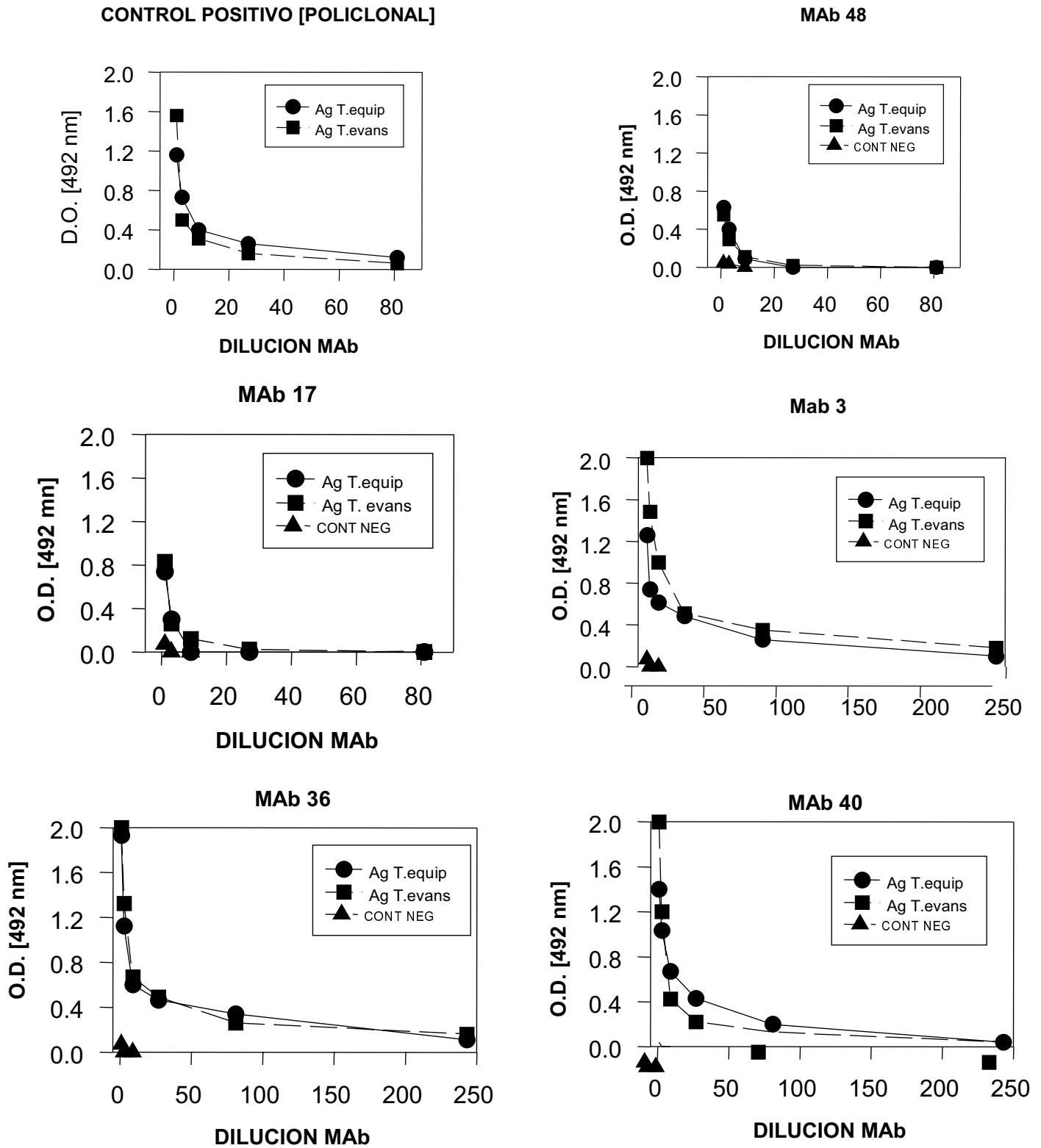


FIGURA 1B. REACCIÓN CRUZADA Y TÍTULO DE LOS ACM CONTRA ANTÍGENOS DE *T. equiperdum* Y *T. evansi* DETERMINADOS MEDIANTE ELISA. MAB 48 Y 17: ACM ANTI *T. equiperdum*; MAB 3, 36 Y 40 ACM ANTI *T. evansi*. DILUCIÓN MAB: INVERSO DEL TÍTULO. CONTROL POSITIVO: SUERO POLICLONAL DE RATÓN ANTI TRIPANOSOMA. MAB: ANTICUERPO MONOCLONAL (ACM).

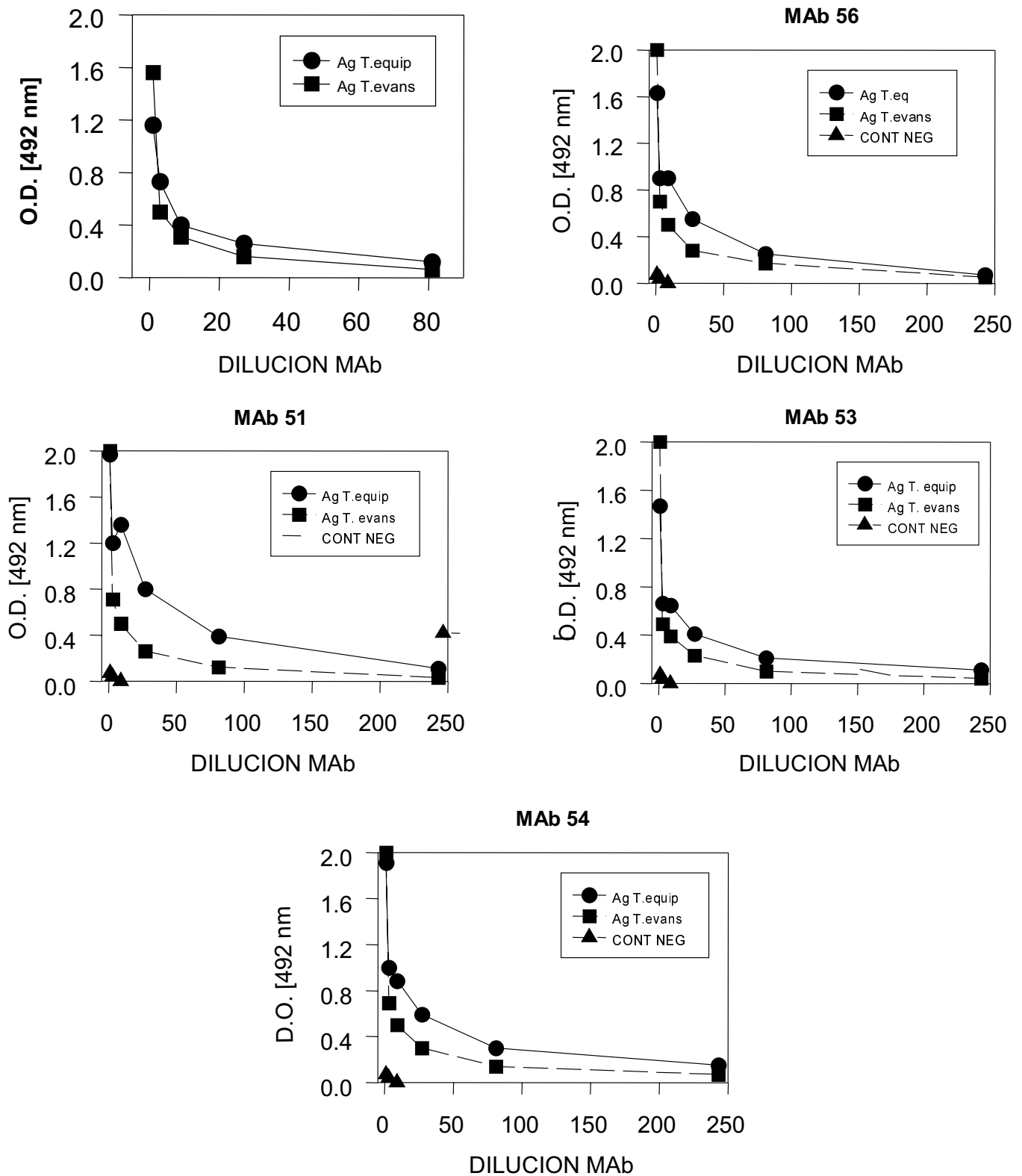


FIGURA 1C. REACCIÓN CRUZADA Y TÍTULO DE LOS ACM CONTRA ANTÍGENOS DE *T. equiperdum* Y *T. evansi* DETERMINADOS MEDIANTE ELISA. MAB 56, 51 53 Y 54: ACM ANTI *T. evansi*. DILUCIÓN MAB: INVERSO DEL TÍTULO. CONTROL POSITIVO: CORRESPONDE AL SUERO POLICLONAL DE RATÓN ANTI TRIPANOSOMA. MAB: ANTICUERPO MONOCLONAL (ACM).

No fue posible estudiar la respuesta inmune específica contra las diferentes proteínas que conforman la mezcla compleja de antígenos debido a que, a pesar de los repetidos intentos, no hubo reacción inmune con las proteínas separadas por electroforesis FIG. 2, y electrosferidas a papel de nitrocelulosa, probablemente debido a que los epitopos fueron destruidos durante el calentamiento a 100°C por 5 minutos en presencia de detergentes, lo cual, parece ser común con algunos anticuerpos monoclonales [7].

Nuestros resultados demuestran que ambas especies de tripanosomas africanos son inmunológicamente semejantes, que, por ende, son semejantes a nivel molecular de los antígenos [25], lo cual hace aún más urgente la búsqueda de sistemas de diagnóstico diferenciales necesarios en ambientes en los cuales ambas parasitosis ocurren concomitantemente, especialmente en países de la Cuenca Mediterránea, Africanos y Asiáticos. Sin embargo, en poblaciones de equinos de América Latina, donde *T. evansi* es uno de los principales problemas de salud animal equina, los AcM producidos pueden ser útiles en el diagnóstico de la Surra o Derrengadera. Estudios para su uso en el diseño de sistemas de diagnóstico están en curso en nuestro laboratorio.

CONCLUSIONES

De los resultados aquí presentados se concluye que *T. equiperdum* y *T. evansi* están inmunológicamente relacionados debido a las reacciones cruzadas que presentan los anticuerpos monoclonales preparados contra ellos.

Los anticuerpos monoclonales producidos son útiles para el diagnóstico de cualquiera de las dos especies en zonas donde la infección natural no ocurre en forma concomitante.

Es importante desarrollar nuevos métodos de diagnóstico que permitan discriminar infecciones naturales debidas a ambas especie.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero del proyecto BTS-53 de Conicit-Bid. SG agradece a Conicit-Bid la beca concedida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARELLANO-CHAVEZ, S. Mexico free from Dourine negative reports of Dourine in Chihuahua. **Proc. First Symposium on New World Trypanosomes**. Georgetown, Guyana, 45-46. 1996.
- [2] ARIAS, J.F.; GARCÍA F.; RIVERA, M.; LOPEZ, R. *Trypanosoma evansi* in capybara from Venezuela. **J. Wildl Dis.** 33(2):359 – 361. 1997.

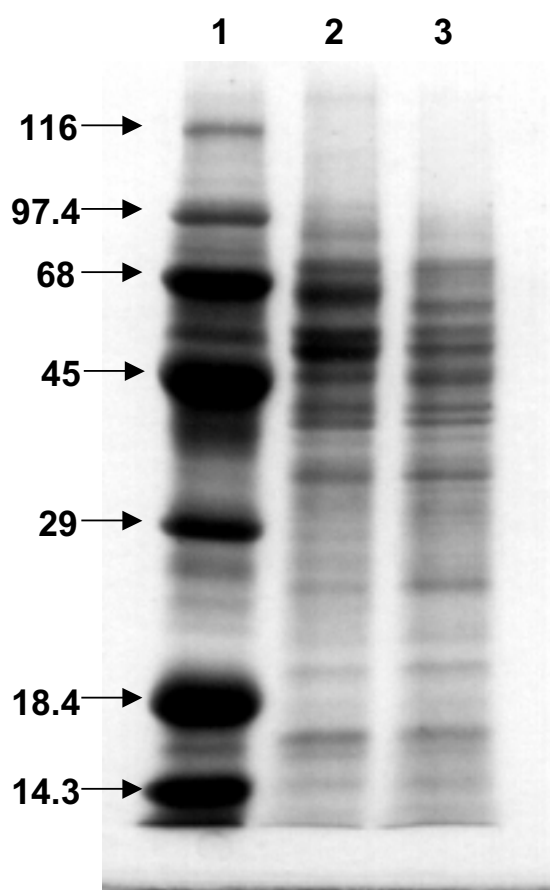


FIGURA 2. ELECTROFEROGRAMA DE LA MEZCLA COMPLEJA DE PROTEÍNAS USADAS COMO ANTÍGENOS, SEPARADAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN SDS, TEÑIDAS CON COOMASSIE BRILLIANT BLUE. 1: ESTÁNDAR DE PESOS MOLECULARES, 2: *T. equiperdum*. 3: *T. evansi*.

- [3] BAILEY, J.W.; SMITH, D.H. The use of acridine orange QBC technique in the diagnosis of african trypanosomiasis. **Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg.** 86: 630-633. 1992.
- [4] BALTZ, T.; GIROUD, C.; BRINGAUD, F.; EISEN, H.; JACQUEMOT, C.; ROTH, C.W. Exposed epitopes on a Trypanosome equiperdum variant surface glycoprotein altered by point mutations. **EMBO J.** 10(7):1653 – 1659. 1991.
- [5] BARBET, A.F.; MCGUIRE, T.C. Cross-reacting determinants in variant-specific surface antigens of African Trypanosome. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 75: 1989-1993. 1978.
- [6] BARBET, A.F.; MUSOKE, A.J.; SHAPIRO, S.Z.; MPIMBAZA, G.; MCGUIRE, T.C. Identification of the fragment containing cross-reacting antigenic determinants in the variable surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*. **Parasitology.** 83: 623-637. 1981.
- [7] BHATTI, A.R.; WONG, J.P.; WOODS, D.E. Production and partial characterization of hybridoma clones secret-

- ing monoclonal antibodies against Francisella tularensis. **Hybridoma** 12(2):197-202.1993.
- [8] BRUCE, D. Preliminary report on the Tsetse fly disease or Nagana in Zululand. Citado por Vickerman K. (1997). Landmarks in Trypanosome research. In **Trypanosomiasis and Leishmaniasis, Biology and Control**. Hide, Mottram, Coombs and Holmes (Editores). Cab international. 1-38. 1895.
- [9] BRUN, R.; HECKER, H.; LUN, Z.R. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum* distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Vet. Parasitol.** 79(2):95 – 107. 1998.
- [10] CARDOSA DE ALMEIDA, M.L.; TURNER, M.J. The membrane form of variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. **Nature** 302: 349-352. 1983.
- [11] CLARKSON, M.J.; MC CABE, W.; COLINA, H. Bovine trypanosomiasis in Venezuela. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 257-258. 1971.
- [12] CLAYTON, C.E.; SACKS, D.L.; OGILVIE, B.M.; ASKONAS, B.A. Membrane fractions of trypanosomes mimic the immunosuppressive and mitogenic effects of living parasites on the host. **Parasite Immunol.** 1: 241-249. 1979.
- [13] CORONADO, A.; PÁEZ, V.; DELGADO, A.; CASTILLO A. Clinical findings in trypanosoma evansi infected guinea pigs. **Proc. First Symposium on New World Trypanosomes**. Georgetown, Guyana, 72 – 74. 1996.
- [14] CROSS, G.A.M. Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of Trypanosoma brucei. **Parasitology** 71: 393-417.1975.
- [15] CROSS, G.A.M. Cellular and genetic aspects of antigenic variation in trypanosomes. *Ann. Rev. Immunol.* 8: 83 – 110. 1990.
- [16] DESQUESNES. Origin and distribution of New World livestock trypanosomes and their affinity for some mammalian hosts. *Proc. First Symposium on New World Trypanosomes*. Georgetown, Guyana, 5-11. 1996.
- [17] FAZEKAS DE ST.; GROTH.; SCHEIDEGGER, D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. **J. Immunol. Methods.** 39:1-20. 1980.
- [18] FERGUSON, M.A.J.; HOMANS, S.W.; DWEK, R.A.; RADEMACHER, T.W. Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein to the membrane. **Science** 239: 753-759. 1988.
- [19] FOIL L.D. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitol. Today.* 5(3): 88-96.1989.
- [20] FRANKE, C.R.; GREINER, M.; MEHLITZ, D. Investigation on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (Hydrochaeris hydrochaeris) in Pantanal de Pocomo (Matto Grosso, Brasil). **Acta Tropica** 58:159 - 169. 1994A.
- [21] FRANKE, C.R.; GREINER, M.; MEHLITZ, D. Monitoring of clinical, parasitological and serological parameters during and experimental infection of capybaras (Hydrochaeris hydrochaeris) with *Trypanosoma evansi*. **Acta Tropica** 58:171-174. 1994B.
- [22] FROMMEL, T.O.; BALBER, A.E. *Trypanosoma brucei brucei*, *T. brucei gambiense* and *T. brucei rhodesiense*: common glycoproteins an glycoprotein oligosaccharide heterogeneity identified by lectin affinity blotting and endoglicosidase H treatment. *Exptl. Parasitol.* 63(1): 32 – 41. 1987.
- [23] GALFRÉ, G.; MILSTEIN, C. Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. **Methos Enzymol.** 73:1-45.
- [24] GARDINER, P.R.; WILSON, A.J. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. **Parasitol. Today.** 3(2): 49-52.1987.
- [25] GIARDINA, S.; PAGANICO, G.; URBANI, G.; ROSSI, M.; GIANANTE, D.; MERCANTE, T.A. rapid method for *Trypanosome equiperdum* and *T. evansi* purification. Biochemical and immunological comparative study. (Somedito). 2001.
- [26] GODING, J.W. Antibody production by hybridomas. **J. Immunol. Methods** 39:285-308. 1980.
- [27] HERELD, D.; KRAKOW, J.L.; BANGS, J.D.; HART, G.W.; ENGLUND, P.T. A phospholipase C from *Trypanosoma brucei* which selectively cleaves the glycolipid on the variant surface glycoprotein. **J. Biol. Chem.** 261: 13813-13819. (1986).
- [28] TIRAD, J. Presentation generale et biologie de Trypanosoma vivax, *T. evansi* et *T. equiperdum*. In: **First Intl Seminaron Non-Tsetse transmitted animal trypanosomes**. Annecy, Francia, 22 pp.1992.
- [29] KOMBA, E.K.; ODIIT, M.; MBULAMBERI, D.B.; CHINFEMBE, E.C.; NANTULYA, V.M. Multicentre evaluation of an antigen detection ELISA for the diagnosis of *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness. **Bull. WHO** 70:57-61.1992.
- [30] LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680 - 685.1970.
- [31] LUCKINS, A.G. Trypanosome evansi and T. Equiperdum: an overview. In: **First Intl Seminaron Non-Tsetse transmitted animal trypanosomes**. Annecy, Francia, 18 pp.1992.
- [32] MIHOK, S.; MARAMBA, O.; MUNYOKI E.; KAGOIYA, J. Mechanical transmission of trypanosoma spp by African

- Stomoxys* (Diptera: Muscidae). *Trop. Med. Parasitol.* 46:103-105.1995.
- [33] NANTULYA, V.M. Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. **Rev. Sci. Tech.** 9(2):357-67. Review. 1990.
- [34] ONAH, D.N.; HOPKINS, J.; LUCKINS, A.G. Haematological changes in sheep experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Parasitol. Res.** 82:659 - 663.1996.
- [35] OYEJIDE, A.; MOULTON, J.E.; WALCOTT, J.A. Immunosuppression in experimental trypanosomiasis: effects of *Trypanosoma equiperdum* on the pathogenesis of influenza virus infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). **Vet Immunol Immunopathol.** 10:253-263.1985.
- [36] PAYS, E, et al. Conservation of a variant-specific surface antigen gene in different trypanosome species and subspecies. **Mol Biochem Parasitol.** 4(5-9). 1981.
- [37] PAYS, E, et al. Structure and expression of a *Trypanosoma brucei gambiense* variant specific antigen gene. *Nucleic Acids Res.* 10:3149-3163.1982.
- [38] PEREIRA DE ALMEIDA, P.J.; NDAO, M.; GOOSSENS, B.; OSAER, S. PCR primer evaluation for the detection of trypanosome DNA in naturally infected goats. **Vet Parasitol** 80(2):111-116.1998.
- [39] QUIÑÓNEZ, MATEU M.E.; FINOL, H.J.; SUCRE, L.E.; TORRES, S.H. Muscular changes in Venezuelan wild horses naturally infected with *Trypanosoma evansi*. **J. Comp. Pathol.** 110(1):79 - 89.1994.
- [40] REID, S.; HUSEIN, A.; HUTCHINSON, G.; COPEMAN, D. A possible role for rusa deer (*Cervus timorensis russa*) and wild pigs in spread of *Trypanosoma evansi* from Indonesia to Papua New Guinea. **Mem Inst.Oswaldo Cruz.** 94(2):195-197.1999.
- [41] REVERON, I.; ASO, P.M.; HERRERA, E.A.; GIARDINA, S.; SANSO, B.; BADARACCO, M.T. Isolation and serological studies of *Trypanosoma evansi* from capybara (*Hydrochoerus Hydrochoeris*). In: **First Intl Seminaron Non-Tsetse transmitted animal trypanosomes.** Annecy, Francia, 44 pp. 1992.
- [42] REYNA-BELLO, A.; GARCIA, F.A.; RIVERA, M.; SANSO, B.; ASO, P.M. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. **Vet. Parasitol.** 80(2):149-57.1998.
- [43] RICHARDS, F.F. The surface of the African trypanosomes. **J. Protozool.** 31:60-64.1984.
- [44] SACKS, D.L.; BANCROFT, G.; EVANS, H.; ASKONAS, B.A. Incubation of trypanosomes-derived mitogenic and immunosuppressive products with peritoneal macrophages allows recovery of biological activities from soluble parasites fractions. **Infect. Immun.** 36:160-168.1982.
- [45] SHACK, S.; DAVITZ, M.A.; WOLINSKY, M.L.; NUSSENZWEIG, V.; TURNER, M.J.; GURNETT, A. Partial characterization of the cross-reacting determinant, a carbohydrate epitope shared by decay accelerating factor and the variant surface glycoprotein as the African *Trypanosoma brucei*. **J. Immunol.** 140: 2046-2050.1988.
- [46] SILENGHEM, M.; NORMAN, J.; DARJI, A.; DE BAETSELIER, P.; NAESSENS, J. African Trypanosomiasis. En **Parasitic Infections and the Immune system.** F. Kierszbaum (Editor). Academic Press Inc, New York, 1-52. 1994.
- [47] SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry.** W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA. 1969.
- [48] SOODAN, J.S.; SOOD, N.K.; KHAHRA, S.S.; SINGH, K.B.; JUYAL, P.D. Clinico-pathological studies in donkeys experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Indian J. An. Sci.** 66:443-448.1996.
- [49] SUMBA, A.L.; MIHOK, S.; AYIEKE, F.A. Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. Congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model. **Med. Vet. Entomol.** 12(4):417 - 422.1998.
- [50] SWARNKAR, C.P.; RAISINGHANI, P.M.; KUMAR, D.; SINGH, L. Haematological changes in rats immunized with killed *Trypanosoma evansi*. **Indian Vet. J.** 73:261-264.1996.
- [51] TOWBIN, J.; STAHELIN, T.; GORDON J.; Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.1979.
- [52] VICKERMAN, K.; LUCKINS, A.G. Localization of variable antigens in the surface coat of *Trypanosoma brucei* using ferritin-conjugated antibody. **Nature** 224: 1125-1126.1969.
- [53] YAMAMOTO, K.; ONDERA, M.; KATO, K.; KAKINUMA, T.; RICHARDS, F.F. Involvement of suppressor cells induced with membrane fractions of trypanosomes in immunosuppression of trypanosomiasis. **Parasite Immunol.** 7: 95-106.1985.
- [54] ZIMMERMANN, J.; TROMMER, W.E. Monoclonal antibodies to gelonin: Production and Characterization. **Hybridoma** 10(1):65-76.1991.