

Tesis de Posgrado

Caracterización de clones de trypanosoma cruzi : Un nuevo enfoque en la investigación básica de la enfermedad de Chagas

Engel, Juan Carlos

1983

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Engel, Juan Carlos. (1983). Caracterización de clones de trypanosoma cruzi : Un nuevo enfoque en la investigación básica de la enfermedad de Chagas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1816_Engel.pdf

Cita tipo Chicago:

Engel, Juan Carlos. "Caracterización de clones de trypanosoma cruzi : Un nuevo enfoque en la investigación básica de la enfermedad de Chagas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1816_Engel.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARACTERIZACION DE CLONES DE TRYPANOSOMA CRUZI:
UN NUEVO ENFOQUE EN LA INVESTIGACION BASICA DE
LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

AUTOR: JUAN CARLOS ENGEL
DIRECTOR: DRA. ELSA L. SEGURA

INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO E INVESTIGACION DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS "DR. MARIO FATALA CHABEN".

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1816
v 1
Ej. 2

¡Dios mío! - ¡He conseguido lo que nadie ha logrado hasta ahora! - Ya tengo un microbio aislado, con el cual no puede chocar ningún otro. Ahora voy a ver si se divide en dos microbios hijos. - SPALLANZANI -

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elsa L. Segura que ha dirigido mi Trabajo de Tesis, por su apoyo constante y enseñarme a ver la realidad bajo otro punto de vista.

Al Dr. Franklin A. Neva, Jefe del Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (N.I.H.), U.S.A., que me permitió realizar este Trabajo de Tesis en su laboratorio.

Al Dr. James A. Dvorak, investigador principal, N.I.H., quien además de dirigir mi Trabajo de Tesis y ser un amigo, me enseñó que para permanecer en este negocio hay que luchar y exigirse.

A la Organización Mundial de la Salud (UNDP/World Bank/WHO, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases), por otorgarme una beca que me permitió continuar mi entrenamiento y trabajo de investigación en el extranjero.

Al Ministerio de Salud Pública y Medio Ambiente, que a través de sus distintos programas apoyó la realización de este trabajo.

Al personal del Laboratorio de Enfermedades Parasitarias (LPD/NIAID/NIH) y del I.N.D.I.E.CH. por su desinteresada colaboración.

INTRODUCCION

Conceptos generales	1
Ciclo de vida del <u>Trypanosoma cruzi</u>	3
Mantenimiento de <u>T. cruzi</u> en el laboratorio	6
Origen de las cepas o aislamientos de <u>T. cruzi</u>	13
Objetivos	16

MATERIALES Y METODOS

1.1 Origen de los clones de <u>T. cruzi</u>	18
1.2 Técnica de clonado	19
1.3 Mantenimiento de los clones en medio LIT	22
1.4 Mantenimiento de los clones en cultivo celular	22
1.5 Infección de los cultivos celulares con parásitos cultivados en medio LIT	23
1.6 Técnica de congelación	23
1.7 Cinética de crecimiento en medio LIT y volumen modal	25
1.8 Ciclo intracelular	27
1.9 Infección de la cámara de cultivo	29
1.10 Contenido total de ADN (DNA)/parásito y estudio del ciclo celular por una técnica citométrica por Flujo Laminar (Flow Cytometry)	30
1.11 Crecimiento y preparación de los clones de <u>T.</u> <u>cruzi</u> para Citometría por Flujo Laminar	32
1.12 Instrumentación y análisis del Citómetro de Flujo Laminar	34
1.13 Calibración externa mediante un material biológico	35
1.14 Calibración interna de la electrónica del Citómetro de Flujo Laminar	36

1.15	Calibración externa del Citómetro de Flujo Laminar	36
1.16	Cuantificación de DNA total, DNA nuclear y DNA extranuclear o kinetoplástico (k-DNA) por parásito mediante Microespectrofluorimetría	39
1.17	Origen de los cultivos de amastigotes de <u>T. cruzi</u>	40
1.18	Cinética de crecimiento de los cultivos de amastigotes en medio LIT	42
1.19	Coloración de Giemsa	42
1.20	Análisis del desarrollo de los cultivos de amastigotes por Citometría por Flujo Laminar	43
1.21	Incubación de amastigotes y epimastigotes en presencia de complemento	43

RESULTADOS

1.	Evolución de los aislamientos unicelulares de <u>Trypanosoma cruzi</u>	45
2.	Cinética de crecimiento de los 19 clones de <u>Trypanosoma cruzi</u>	45
3.	Volumen modal de clones de <u>T. cruzi</u> en el pico de desarrollo exponencial de crecimiento	48
4.	Estudio del ciclo intracelular de clones de <u>T. cruzi</u>	51
5.	Análisis del contenido de DNA(ADN) total por organismo para clones de <u>T. cruzi</u> , obtenido por Citometría por Flujo Laminar	55
6.	Estudio de las formas amastigotes en cultivo axénico	59
	Cinética de crecimiento de amastigotes del clon Miranda/83 de <u>T. cruzi</u> en medio de cultivo acelular	60
	Resistencia de los amastigotes a la lisis por complemento	63
	Análisis del ciclo celular de los amastigotes	63

<u>DISCUSION</u>	66
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	87
<u>INDICE DE TABLAS Y FIGURAS</u>	Volumen 2

INTRODUCCION

Conceptos generales

En el año 1909, Carlos Chagas describió una nueva tripanosomiasis en base a sus observaciones realizadas en una zona rural de Minas Gerais, Brasil, que se iniciaron con el hallazgo de un insecto hematófago de habitat domiciliario parasitado frecuentemente en el tubo digestivo por un tripanosoma.

Posteriormente, aisló tripanosomas a partir de muestras de sangre de pacientes de la región, enfermos con fiebres de etiología desconocida. El estudio experimental del ciclo evolutivo de estos parásitos, tanto en el huésped invertebrado como en el huésped vertebrado, le permitió demostrar que el parásito flagelado aislado del tubo digestivo del insecto y de la sangre de pacientes era el mismo. Carlos Chagas denominó Schizotrypanum cruzi al agente etiológico de esta nueva parasitosis humana.

En su monografía del año 1909 (1), C. Chagas describió los aspectos generales de la enfermedad denominada posteriormente Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana. Las descripciones del agente etiológico, de los ciclos evolutivos del parásito en su huéspedes vertebrado e invertebrado, del aislamiento del T. cruzi a partir de sangre de pacientes

y de la evolución del parásito en cultivos "in vitro", sirvieron de base para los estudios posteriores de la Enfermedad de Chagas.

A pesar de haber transcurrido más de 70 años desde su descubrimiento, la Enfermedad de Chagas es actualmente la parasitosis humana de mayor incidencia en América, afectando a un número estimado en 20 millones de personas, mientras que se estima en 100 millones de personas (2) a la población de zonas rurales endémicas potencialmente bajo riesgo de ser infectadas por Trypanosoma cruzi, lo que crea un problema sanitario y social de tal magnitud que existen programas a niveles nacionales e internacionales entre los países afectados. La Organización Mundial de la Salud apoya programas de investigación básica y aplicada en la lucha contra la Enfermedad de Chagas (3), siendo el estudio de la biología del parásito uno de los temas de importancia.

Históricamente, la ubicación sistemática del parásito protozoo causante de la Enfermedad de Chagas no ha variado mayormente, según Hoare (1966) (4). Pertenece a la Clase Mastigophora (Diesing, 1866), orden Kinetoplastida (Honinberg, 1963), Familia Trypanosomatidae (Doflein, 1901), Género Trypanosoma (Gruby, 1843), Sección Stercoraria, Subgénero Schizotrypanum (Chagas, 1909), Especie Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi (Chagas, 1909).

Trypanosoma cruzi es un parásito digenético cuyo ciclo de vida involucra la alternancia de dos huéspedes, un huésped mamífero y un insecto hematófago que representa al huésped intermediario o vector. El ciclo evolutivo de T. cruzi en el huésped invertebrado fue descrito originalmente por C. Chagas y posteriormente ampliado por diversos investigadores, E. Días (5), C. Brack (6) y N. Alvarenga (7) entre otros. T. cruzi parasita el intestino de un gran número de especies (8) de triatomíneos pertenecientes a la Subfamilia Triatominae, Familia Reduviidae, Orden Hemiptera, siendo Triatoma infestans (Klug) (9,10), un insecto de habitat domiciliario, el principal vector de la Enfermedad de Chagas en la República Argentina.

Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi

La infección del huésped invertebrado por T. cruzi ocurre durante la ingesta del insecto, siendo las formas sanguíneas del parásito (tripomastigotes) ingeridas juntamente con la sangre del huésped mamífero. En el tracto digestivo del insecto, los tripomastigotes sufren una serie de transformaciones morfológicas y fisiológicas, dando inicialmente origen a formas amastigotes (esferomastigotes) y posteriormente a epimastigotes. Este estadio del parásito es el responsable de la reproducción y del mantenimiento de la infección en el huésped invertebrado. Eventual-

mente, los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos. Este estadio no reproductivo del parásito es la forma infectante para el huésped vertebrado y es eliminado con las heces del vector que pueden ser depositadas sobre la piel o mucosas del vertebrado, ya que el vector defeca durante la ingesta o pocos minutos después de la misma (11). Así se posibilita la penetración de los tripomastigotes metacíclicos en células del huésped vertebrado, con lo que se inicia el ciclo evolutivo del parásito en el huésped vertebrado. El conocimiento actual del ciclo evolutivo de T. cruzi en el insecto se basa en eventos morfológicos, desconociéndose los mecanismos de transformación del parásito en el intestino del insecto. Incluso ciertos aspectos del ciclo evolutivo de T. cruzi en el insecto son poco conocidos, como por ejemplo la formación de masas de organismos que se observan pocas horas después de la ingesta del insecto (12). La observación de las mismas llevó a sugerir la posibilidad de la existencia de fusión celular, aunque esta hipótesis no pudo ser posteriormente demostrada mediante microscopía electrónica. El origen de estos acúmulos de parásitos podría estar relacionado con el fenómeno de Adler (13) que se produce por el agregado de suero inmune inactivado a cultivos de epimastigotes, los cuales se agregan formando masas aparentemente sinciciales de organismos. Este mecanismo podría ocurrir en

forma natural en el intestino del insecto por efecto de los anticuerpos ingeridos juntamente con la sangre.

Un aspecto poco conocido de la relación huésped-parásito se evidencia en la existencia de diferentes susceptibilidades de distintas especies de triatominos (14,15) a la infección por T. cruzi, las cuales pueden ser el resultado de peculiaridades biológicas del vector, de diferencias fisiológicas en el tubo digestivo de los vectores, del tipo de sangre ingerida, etc. Estos factores podrían afectar el ciclo de vida de T. cruzi en el insecto vector.

La infección en el mamífero se inicia habitualmente con la penetración de tripomastigotes metacíclicos a través de la piel o mucosas y la invasión de células subyacentes en las cuales los parásitos se reproducen intracelularmente (1,16). La infección se propaga a otros tejidos a partir de esa zona, presentándose un aumento concomitante de los niveles de parasitemia en sangre. Varios órdenes de mamíferos tanto silvestres como domésticos, son naturalmente receptivos a la infección por T. cruzi (17,18,19). Los mamíferos silvestres constituyen reservorios naturales del parásito, siendo prácticamente desconocida la evolución de la infección por T. cruzi en estos animales. Los conocimientos actuales de esta parasitosis se basan en la evolución de la infección natural y accidental del hombre y de la infección

experimental en animales de laboratorio (1,20,21).

La Enfermedad de Chagas presenta dos fases en su evolución clínica. La primera, denominada fase aguda de la enfermedad, comprende los primeros meses de infección por T. cruzi. La fase aguda de la enfermedad se caracteriza clínicamente por una sintomatología de intensidad y duración variables (22,23). Esta variabilidad es de tal magnitud que se estima que esta fase pasa totalmente desapercibida en un gran número de casos, mientras que en otros se produce la muerte del huésped (24).

A continuación de la fase aguda se desarrolla la fase crónica de la enfermedad (25,26) en la cual se diferencian clínicamente dos etapas, una latente asintomática y otra sintomática. La mayoría de los pacientes presentan una fase crónica asintomática, con parasitemias detectables sólo por técnicas parasitológicas indirectas (14) y en la cual se detectan altos niveles de anticuerpos específicos contra T. cruzi (27,28). El desarrollo progresivo de síndromes chagásicos durante la fase crónica de la enfermedad puede llevar a la muerte prematura del paciente. La fase crónica perdura durante toda la vida del huésped, desconociéndose la existencia de curas espontáneas.

Mantenimiento de T. cruzi en el laboratorio

La mayoría de los conocimientos actuales sobre T. cruzi

y la relación huésped-parásito han sido obtenidos mediante estudios realizados bajo condiciones de laboratorio debido a la posibilidad de mantener indefinidamente a este protozoo tanto "in vitro" como "in vivo" en cultivos y en animales de laboratorio, respectivamente. T. cruzi puede ser mantenido "in vivo" mediante pasajes seriados en animales de laboratorio susceptibles a la infección (29). El huésped más comúnmente utilizado es el ratón, debido al vasto conocimiento de su fisiología y genética y a la susceptibilidad de distintas cepas de ratón a T. cruzi (30). El ratón ha sido asimismo utilizado en modelos experimentales de la Enfermedad de Chagas, especialmente en estudios histopatológicos e inmunológicos del huésped (31,32).

T. cruzi puede ser mantenido en insectos en el laboratorio, disponiéndose de colonias de distintas especies de Reduidos, huéspedes naturales de T. cruzi, criados en insectarios (33). En general dichos huéspedes han sido utilizados para estudios del ciclo evolutivo del parásito en el huésped invertebrado o para diagnóstico parasitológico indirecto (xenodiagnóstico) (14). El xenodiagnóstico es una técnica en la cual el vector es utilizado como medio para la multiplicación del parásito.

En contraste con lo que sucede con otros parásitos que afectan al hombre y a animales, la mayoría de los es-

tadíos del ciclo de vida de T. cruzi pueden ser cultivados "in vitro" sin dificultad (34). Dichos cultivos pueden dividirse en dos categorías: 1) el cultivo de los estadíos de T. cruzi presentes en el huésped invertebrado, y 2) el cultivo de los estadíos de T. cruzi presentes en el huésped vertebrado.

Carlos Chagas informó por primera vez sobre la evolución de aislamientos de T. cruzi en medio de cultivo de Novy y Mac Neal, observando que una vez transcurrido un cierto lapso la forma predominante en cultivos libres de células era el epimastigote, el cual corresponde al estadio reproductivo del parásito en el mesenterón del huésped invertebrado. Actualmente existe un gran número de medios de cultivo bifásicos y monofásicos de composición semidefinida, que permiten el desarrollo de epimastigotes y el mantenimiento indefinido de T. cruzi por pasajes seriados. Debido a la facilidad con que se pueden cultivar y obtener altas concentraciones de parásitos por ml de medio de cultivo, la forma epimastigote de T. cruzi ha servido como base para estudios bioquímicos, inmunológicos, morfológicos, antigénicos, etc. En cultivos de epimastigotes de T. cruzi se observa normalmente un porcentaje variable de tripomastigotes metacíclicos (35,36) que constituyen las formas del parásito infectantes para el mamífero, presentes en el insecto. La importancia

del estudio de las formas metacíclicas ha motivado intentos tendientes a obtener cultivos puros de tripomastigotes metacíclicos a partir de cultivos de epimastigotes, mediante la utilización de distintos protocolos que favorecen la transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos, lográndose obtener hasta un 90% de formas metacíclicas durante la fase estacionaria del desarrollo de los cultivos (37,38).

El estadio multiplicativo de T. cruzi en el huésped vertebrado es obligatoriamente intracelular (1). La utilización de técnicas de cultivo de células ha posibilitado el mantenimiento "in vivo" de los estadios de T. cruzi presentes en el huésped vertebrado por medio de pasajes seriados de los parásitos. Las formas tripomastigotes sanguíneos de T. cruzi, productos del ciclo intracelular en células huéspedes, son no multiplicativas o sea células en G₀ (39). El estudio del ciclo intracelular de T. cruzi ha avanzado paralelamente al desarrollo de la metodología de cultivo de células. En el año 1935, Kofoid (40) informó sobre el primer éxito al cultivar T. cruzi en cultivo de tejidos, demostrando no sólo que es posible infectar células de vertebrados "in vitro", sino que el ciclo intracelular es probablemente similar al que ocurre "in vivo". El desarrollo de las técnicas de cultivo y la invención de cámaras de cultivo que permiten observar la evolución de la infección celular mediante la utilización de microscopios de alta resolución y en condiciones ambientales constantes (41), han per-

mitido el estudio de la interacción entre células de vertebrados y T. cruzi (42). La interacción entre T. cruzi y células del sistema retículoendotelial, como por ejemplo los macrófagos (43) y leucocitos polimorfonucleares (44), ha sido estudiada "in vitro" con el objeto de conocer el rol de estas células pertenecientes al sistema retículo-endotelial en la evolución de la Enfermedad de Chagas. Tanto los tripomastigotes metacíclicos como los tripomastigotes sanguíneos presentan la capacidad de penetrar células de vertebrados y reproducirse intracelularmente. La penetración de T. cruzi en una célula huésped va seguida por la transformación de la forma infectante en amastigote, la forma intracelular obligada de T. cruzi. La célula huésped puede ser infectada por uno o varios parásitos en forma simultánea o sucesiva. Los amastigotes permanecen en estado latente o quiescente durante un cierto período de tiempo denominado período lag, previo al comienzo de la multiplicación intracelular del parásito por división binaria. Los parásitos se multiplican exponencialmente en forma asincrónica durante un número constante de generaciones. A continuación del período multiplicativo, los amastigotes se transforman asincrónicamente en tripomastigotes, siendo liberados por muerte y ruptura de la célula huésped, pudiendo invadir nuevas células del huésped e iniciando un nuevo ciclo de vida intracelular (42). Los tripomastigotes derivados de cultivo celular o de la sangre de un animal infectado, son utilizados para infectar cultivos vírgenes de

células y mantener de este modo a los parásitos por cultivos seriados, indefinidamente.

Los estudios bioquímicos e inmunológicos de las formas amastigotes son escasos debido a las dificultades existentes para estudiar a los amastigotes "in situ". Sin embargo existen técnicas para aislar amastigotes a partir de tejidos musculares de animales infectados experimentalmente (45) o a partir de cultivos de células (46). En ambos casos las células huéspedes deben ser rotas por procedimientos físicos con el objeto de liberar las formas intracelulares de T. cruzi y los amastigotes deben ser posteriormente purificados con el objeto de eliminar los restos celulares. Los procesos de extracción y purificación pueden ser perjudiciales para los amastigotes. Además, la imposibilidad de eliminar totalmente la contaminación debida a las células huéspedes y los bajos rendimientos de amastigotes obtenidos han limitado considerablemente el conocimiento de las formas amastigotes (47,48). El hecho de que el amastigote sea el estadio reproductivo intracelular del parásito en el huésped vertebrado evidencia la importancia del desarrollo de metodología adecuada para el cultivo de amastigotes en medio libre de células, como primer paso para el estudio de la fisiología de este estadio.

La presencia de amastigotes en medios de cultivo libres de células fue originalmente observada en las primeras etapas de

desarrollo de hemocultivos (49). Cuando se cultivan tripomastigotes sanguíneos, tripomastigotes provenientes de cultivos de células o tripomastigotes metacíclicos obtenidos a partir de insectos, en medio axénico a 26°C, la mayoría de los tripomastigotes se transforman en amastigotes (50,51) los cuales se multiplican durante un cierto número de generaciones y luego se diferencian a su vez en epimastigotes, que son las formas predominantes en cultivos mantenidos en las condiciones mencionadas. Es posible observar el mismo fenómeno cuando se repican cultivos de epimastigotes en fase estacionaria de desarrollo. El origen de los amastigotes obtenidos por pasajes de cultivos en estado de desarrollo estacionario se debe a la transformación de tripomastigotes metacíclicos en amastigotes, los que eventualmente sufren una nueva transformación a epimastigotes. En todos los casos mencionados, los amastigotes de cultivo presentan la característica de tender a agruparse (1, 52), pudiendo llegar a formar masas multicelulares que pueden ser temporariamente disgregadas por agitación mecánica. Por otra parte, existen diversos trabajos en los cuales se comunican protocolos que posibilitan el mantenimiento de amastigotes en medios libres de células (53,54,55,56). Estos cultivos de amastigotes no han sido extensamente utilizados debido a la complejidad de los medios de cultivo utilizados y a su baja reproducibilidad. En este trabajo de tesis se expone un sencillo protocolo para el cultivo de la forma amastigote de T. cruzi,

utilizándose un medio de cultivo comunmente usado para el cultivo de epimastigotes de T. cruzi.

Origen de las cepas o aislamientos de T. cruzi

Las poblaciones de T. cruzi existentes en los laboratorios provienen de aislamiento a partir de diversas fuentes. Dichas fuentes pueden agruparse en dos categorías, a saber, I. de origen selvático, o sea parásitos provenientes de huéspedes vertebrados silvestres, como por ejemplo edentados, marsupiales, roedores, etc. y de huéspedes invertebrados relacionados con esos vertebrados. II. de origen domiciliario, que incluye parásitos aislados de humanos, animales domésticos e insectos domiciliarios y peridomiciliarios naturalmente infectados con T. cruzi.

Estos aislamientos están constituidos por un número variable y no cuantificado de parásitos. Dichos aislamientos, denominados "cepas" de T. cruzi, han sido mantenidos y expandidos en el laboratorio mediante diversos protocolos. Lamentablemente, el intento de llamar aislamientos a estas poblaciones no ha sido generalmente aceptado, continuándose con la denominación incorrecta de "cepas" (57). Mediante la utilización de diversos parámetros se ha demostrado que existen diferencias entre "cepas" de T. cruzi. Varios de estos parámetros han sido utilizados para caracterizar distintas cepas y han servido para intentar establecer criterios de clasificación en tipos o padro-

nes con características comunes. Dos criterios se han seguido para fundamentar una clasificación de las cepas de T. cruzi. El primer criterio se basa en la relación huésped-parásito, considerándose los siguientes parámetros: virulencia, patogenicidad, curvas de parasitemia, morfología de los parásitos en la sangre perisférica, tropismo tisular y cuadro histopatológico (58,59,60,61,62,63,64). Estos parámetros fueron analizados utilizándose distintas cepas de ratones como huésped. Por ejemplo, uno de los primeros criterios utilizados para clasificar las cepas ha sido el de agruparlas en retículo-trópicas o mitotrópicas, según la tendencia que presentan los parásitos a invadir dichos tejidos.

Otro criterio de clasificación de cepas de T. cruzi se basa en diferencias bioquímicas a nivel molecular. Mediante la comparación de perfiles enzimáticos de distintas cepas de T. cruzi se han podido agrupar en padrones, llamados zimodemos (65), dentro de los cuales es posible ubicar a la mayoría de las cepas. Mediante el uso de endonucleasas de restricción específica, es posible clivar los minicírculos de DNA mitocondrial (kinetoplasto) y comparar y caracterizar genotípicamente a las cepas de T. cruzi mediante el análisis de los perfiles de los productos (66).

La finalidad práctica de caracterizar cepas de T. cruzi, representantes de las poblaciones naturales, es la de establecer correlaciones entre poblaciones de T. cruzi y las distintas

manifestaciones clínicas y epidemiológicas de la Enfermedad de Chagas. Las diferencias observadas entre cepas implicarían que existen variaciones intra-específicas en T. cruzi, o sea en poblaciones de T. cruzi presentes en la naturaleza parasitando diversos huéspedes.

Uno de los mayores problemas que han surgido en el estudio y caracterización de cepas de T. cruzi ha sido la aparición de variaciones en características de las cepas, como por ejemplo, disminución de la capacidad infectante de cepas mantenidas en medios de cultivo (86), variaciones del ciclo intracelular (67), de los patrones isoenzimáticos (68), tropismo (58), etc. Para explicar estos cambios, se postuló que T. cruzi está compuesto en la naturaleza por una población heterogénea de organismos y que las condiciones utilizadas para mantener poblaciones de T. cruzi en el laboratorio pueden ejercer una presión selectiva sobre sub-grupos, causando la aparente inestabilidad de las cepas de T. cruzi (69). A pesar de que esta teoría sobre la heterogenicidad de T. cruzi fue generalmente aceptada, debido a la falta de evidencias que demostraran inequívocamente la presencia de subpoblaciones de T. cruzi en la naturaleza, no se podía descartar la posibilidad de que la inestabilidad de ciertas características de las cepas de T. cruzi mantenidas durante tiempo prolongado en el laboratorio, se debía a la selección de mutantes. La falta de marcadores genéticos y el

desconocimiento de la tasa mutacional de T. cruzi, impidieron verificar esta hipótesis.

Objetivos

En este trabajo de tesis se encara la caracterización "in vitro" de 19 clones de Trypanosoma cruzi provenientes de aislamientos unicelulares, que consecuentemente constituyen poblaciones homogéneas de parásitos, utilizándose a tal efecto cuatro parámetros distintos. a) Cinética de crecimiento de los clones de T. cruzi en medio de cultivo libre de células. 2) Cuantificación del volumen modal en el pico de la fase de crecimiento exponencial de parásitos pertenecientes a los distintos clones, en medio de cultivo libre de células. 3) Estudio del contenido de ADN (DNA) total/organismo de los clones mediante el análisis citométrico por flujo laminar y por microespectrofluorometría de epimastigotes obtenidos en fase exponencial y en fase estacionaria de crecimiento y de tripomastigotes obtenidos a partir de cultivo de células. 4) Análisis del ciclo intracelular de clones de T. cruzi en cultivo de células.

Se expone, además, un protocolo para la obtención y la caracterización de amastigotes en medio de cultivo libre de células.

Los resultados obtenidos a partir de estos estudios y del análisis de los parámetros han permitido demostrar la existen-

cia de heterogenicidad biológica en poblaciones de Trypanosoma cruzi provenientes de pacientes infectados crónicamente, introduciendo un nuevo aspecto en la relación huésped-parásito. Esta heterogenicidad podría explicar los diferentes perfiles patogénicos y geográficos que presenta la Enfermedad de Chagas en América.

MATERIALES Y METODOS

1.1 Origen de los clones de T. cruzi

Los organismos utilizados para el proceso de clonado provinieron de dos fuentes distintas. Según su origen, se denominó Miranda y Cepa Argentina-I (CA-I) a los dos grupos de clones. Los clones Miranda provienen de parásitos aislados de insectos utilizados en un xenodiagnóstico aplicado a un paciente de 26 años de edad con Chagas crónico asintomático, oriundo de la Provincia de Santiago del Estero. El grupo de clones CA-I proviene de una cepa de T. cruzi originalmente aislada de un xenodiagnóstico aplicado a un paciente de 45 años de edad con Chagas crónico, afectado de una miocarditis crónica determinada por estudios clínicos, electrocardiográficos y serológicos, oriundo de la Provincia de San Juan (70). El contenido intestinal parasitado de los insectos utilizados en el xenodiagnóstico fue inoculado, vía intraperitoneal, en ratones de la cepa Rockland, manteniéndose una línea por pasajes sucesivos en ratón, utilizándose un inóculo de 1 a 5×10^4 parásitos/ratón, durante un lapso de 5 años. Posteriormente, la cepa fue inoculada en un perro, al cual se le aplicó luego un xenodiagnóstico. Los parásitos fueron clonados a partir de los insectos utilizados para el xenodiagnóstico. En ambos casos los xenodiagnósticos se realizaron utilizando cuatro cajas conteniendo 10 ninfas del tercer estadio de Triatoma infestans que fueron aplicadas sobre la piel del paciente o

del perro durante una hora, permitiéndose la alimentación directa de los insectos. Posteriormente, las cajas conteniendo los insectos fueron retiradas y mantenidas a temperatura ambiente por un lapso no menor de 30 días para permitir la multiplicación de los parásitos. El clon Silvio X-10/5 (Miles, M.A., comunicación personal) fue aislado de las heces de Rodnius prolixus, en sus 5^{OS} estadios larvales, utilizados en un xenodiagnóstico realizado en un paciente con Chagas agudo en el Estado de Pará, Brasil (71).

1.2 Técnica de clonado

Los clones fueron obtenidos por el aislamiento de células individuales, mediante la adaptación de una técnica de micromanipulación (72) que se detalla a continuación. Los aislamientos se realizaron entre los 30-45 días post-infección de los insectos. Los insectos utilizados en el xenodiagnóstico fueron esterilizados externamente durante 30 minutos por inmersión en solución de White (73) (Cl₂Hg 0,25 gr, ClNa 6,50 gr, ClH 1,25 ml, Alcohol Etílico 250 ml, H₂O Destilada 750 ml). A continuación, el tubo digestivo fue disecado y colocado en una cápsula de Petri de 3,5 cm de diámetro, conteniendo 2 ml de medio de cultivo LIT, cuya composición química es: Infusión de hígado 5 gr/l, Triptosa 5 gr/l, ClNa 4 gr/l, ClK 0,4 gr/l, PO₄HNa 8 gr/l, Dextrosa 2 gr/l con el agregado de 10% (V/V) suero fetal bovino inactivado, Hemina 0.05%, Penicilina 100 U/ml y Estreptomina

100 $\mu\text{g/ml}$ (74), y el intestino seccionado con el objeto de liberar los parásitos contenidos en el mismo.

El medio fue centrifugado a 100 g durante 10 minutos en tubos de centrífuga cónicos con tapa a rosca, con el objeto de eliminar restos de tejido. El sobrenadante conteniendo los parásitos fue recentrifugado a 1500 g durante 10 minutos, para concentrar los parásitos. El pellet así obtenido fue resuspendido a una concentración final de 1 a 2×10^4 parásitos/ml.

En una cápsula de Petri plástica se realizó una perforación circular de un diámetro de 20 mm, que fue cubierta mediante la fijación de un cubreobjetos circular de 25 mm de diámetro. Sobre el cubreobjetos se colocaron 5 gotas de glicerina de aproximadamente 1 mm de diámetro, en forma equidistante una de otra. El cubreobjetos fue a continuación rociado con teflón y una vez seca la cobertura de teflón se procedió a lavarlo, eliminándose las gotas de glicerina. De esta manera el cubreobjetos repele el agua, salvo en los sitios en los cuales se encontraban las gotas de glicerina, lo que impide el desplazamiento de las muestras y permite su rápida localización, facilitando la operación de clonado. Las cápsulas de Petri fueron esterilizadas por luz U.V. previamente a su utilización. Sobre la cara interna del cubreobjetos se colocaron 5 gotas aisladas de la suspensión de parásitos en los sitios translúcidos por medio

de una microjeringa (Hamilton). La placa de Petri fue cubierta e invertida, quedando las gotas en posición suspendida. Las gotas fueron observadas mediante el microscopio a un aumento de 320 X, el cual posibilita la observación de la totalidad de la gota en el campo visual del microscopio. Aquellas gotas conteniendo un solo parásito fueron aspiradas individualmente por medio de una jeringa de tuberculina de 1 ml, previamente cargada con 0,1 ml de medio de cultivo (LIT). El contenido fue transferido a un tubo de plástico de 6 cm³ con tapa a rosca, conteniendo 1 ml de ágar nutricio (DIFCO), suplementado con 10% de sangre de conejo desfibrinada. La jeringa fue lavada dos veces con 0,1 ml de medio y el medio transferido al tubo para asegurar la transferencia del parásito, resultando un volumen final de 0,3 ml de medio líquido por tubo. Solamente las formas epimastigotes fueron seleccionadas para el clonado. Se realizaron 18 aislamientos del xenodiagnóstico del paciente Miranda y 15 aislamientos de la cepa CA-I. Los aislamientos se incubaron a 26°C, controlándose mensualmente para determinar el desarrollo de parásitos durante un año. Aquellos cultivos que evidenciaron crecimiento fueron identificados con las siguientes nomenclaturas: clones CA-I/59,64, 65,67,69,70,71,72 y 73 y clones Miranda/75,76,77,78,80,81,83, 84,88 y 91. En los aislamientos en los cuales se observó crecimiento se agregaron 2 ml de medio LIT, con el fin de aumentar el número de parásitos. Posteriormente, los parásitos fue-

ron expandidos en medio líquido (LIT). A tal efecto se utilizaron frascos plásticos de cultivo (Falcon) de 25 cm² de superficie, conteniendo 10 ml de medio de cultivo.

1.3 Mantenimiento de los clones en medio LIT

Los 19 clones de T. cruzi fueron mantenidos continuamente en estado de desarrollo exponencial, mediante pasajes seriados cada 7 días en frascos plásticos estériles de cultivo de 25 cm² de superficie conteniendo 10 ml de medio de cultivo LIT, a una concentración inicial aproximada de 5×10^5 parásitos/ml e incubados a $26^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$.

1.4 Mantenimiento de los clones en cultivo celular

Cultivos celulares primarios de músculo esquelético de feto bovino (BESM) (Flow Laboratories, CAT. N°01-304) fueron utilizados como células huésped. Los cultivos de células fueron mantenidos regularmente en frascos plásticos de cultivo de 75 cm² de superficie, conteniendo 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (75), suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado, e incubados a 37°C bajo 5% de CO₂. Los cultivos confluentes fueron divididos a razón de 1:10, utilizándose una solución de tripsina-EDTA (ácido etilén-diamino tetracético) cuya composición química es: Tripsina 2,5 gr/l, EDTA 1 gr/l en solución Dulbecco PBS (ClNa 8 gr/l; PO₄HNa₂ 0,46

gr/l; PO₄HK 0,2 gr/l, ClK 0,2 gr/l, H₂O destilada) para desprender las células adheridas. Los cultivos fueron mantenidos en las mismas condiciones anteriormente descritas.

1.5 Infección de los cultivos celulares con parásitos cultivados en medio LIT.

Cultivos de BESM parcialmente confluentes fueron infectados con formas de T. cruzi obtenidas en cultivo en medio LIT, utilizándose un inóculo inicial de 10⁷ parásitos/ml e incubándose durante un lapso de 24 horas a 37°C. Posteriormente, se realizaron dos cambios de medio RPMI-1640 para eliminar el exceso de parásitos en el sobrenadante. Los cultivos fueron reincubados en las condiciones ya descritas y observados diariamente bajo microscopio invertido de contraste de fase, con el fin de detectar células infectadas y controlar la evolución de las mismas. Una vez completado el ciclo intracelular, los tripomastigotes liberados fueron utilizados para infectar cultivos vírgenes de BESM, manteniéndose de esta manera los clones de T. cruzi por pasajes seriados en cultivo de células.

1.6 Técnica de congelación

Todos los clones de T. cruzi, cultivados tanto en medio líquido como provenientes de cultivo de células, fueron criopreservados en Nitrógeno líquido.

1. Criopreservación de epimastigotes de cultivo

Se criopreservaron muestras de los primeros pasajes de parásitos en fase de crecimiento exponencial. Los parásitos fueron lavados, centrifugados y resuspendidos en medio de cultivo LIT con 7,5% (V/V) de dimetil sulfóxido, a una concentración final de 2 a 5×10^6 parásitos/ml. La suspensión de parásitos se fraccionó a razón de 0,5 ml por vial (Viales de polipropileno, Intern.Med.Nunc, Dinamarca). La congelación se realizó en un equipo (Cryo Med.Mt. Clemens, Michigan) calibrado para disminuir la temperatura a razón de 1°C/minuto hasta una temperatura de -30°C y a una velocidad de 4°C/minuto a partir de -30°C hasta -70°C. Una vez estabilizadas a -70°C, las muestras fueron introducidas directamente en nitrógeno líquido para su conservación. Posteriormente, se retiró una muestra para determinar la viabilidad de los parásitos en medio LIT.

2. Criopreservación de tripomastigotes provenientes de cultivo de tejidos.

Tripomastigotes de los 19 clones de T. cruzi provenientes de cultivos celulares, fueron criopreservados mediante la utilización de la misma técnica anteriormente descrita, con la excepción de que los parásitos fueron resuspendidos en medio RPMI conteniendo 5% de suero fetal bovino inactivado y 7,5% de dimetil sulfóxido. La viabilidad de los tripomastigotes se controló posteriormente en base a su capacidad de infectar cultivos

de BESM y de desarrollar el ciclo intracelular completo.

1.7 Cinética de crecimiento en medio LIT y volumen modal.

El estudio de la cinética de crecimiento en medio LIT y del volumen modal de los 19 clones de T. cruzi se realizó utilizando la siguiente metodología. Se utilizaron parásitos en estado de crecimiento exponencial. Para cada clon, se prepararon frascos de cultivo por duplicado conteniendo 10 ml de medio LIT que fueron incubados a 26°C, partiendo de una concentración inicial de 10^6 parásitos/ml. El desarrollo de los cultivos fue monitoreado día por medio mediante un contador electrónico de partículas (Coulter Counter, modelo B ó ZBI, Coulter Electronics, Inc., Hialeah, Florida), en el cual se contaron muestras de los cultivos a intervalos regulares, a una dilución apropiada, desde el día cero de cultivo hasta alcanzarse la fase estacionaria de crecimiento de los parásitos. Las muestras de los cultivos fueron diluídas en una solución de electrolitos (Coulter Isotón II) a razón de 1/40 a 1/4000, dependiendo de la concentración de parásitos en los cultivos. Las diluciones fueron realizadas con el propósito de ajustar el rango de cuentas entre 5×10^3 y 4×10^4 células/ml para minimizar el error de conteo. Se realizaron al menos tres experimentos independiente para cada clon, con sus respectivos duplicados. La cepa Tulahuen (76)

de T. cruzi, mantenida en medio de cultivo LIT durante más de 20 años, fue incluida como control en cada experimento. Diariamente, se calculó la variación de la concentración de parásitos durante el desarrollo de los cultivos, la cual fue expresada como concentración de parásitos/ml/día. Los datos obtenidos fueron utilizados para alimentar una computadora Tektronix, modelo 4051 (Tektronix, Inc. Beaverton, Oregon), programada para generar curvas de crecimiento y suministrar además la pendiente de la curva, el coeficiente de correlación y el tiempo de duplicación de la misma. A partir de los datos sobre tiempo de duplicación de cada clon, provenientes de por lo menos 6 curvas de crecimiento resultantes de tres experimentos independientes para cada clon con sus respectivos duplicados, se calculó el tiempo de duplicación medio, la desviación standard y el error standard. El análisis estadístico de los tiempos de duplicación de clones y grupos de clones se realizó mediante el Test "t" de Student (77).

Diferencias entre datos para niveles de confianza superiores o iguales al 95% fueron consideradas estadísticamente significativas. El volumen modal fue calculado utilizándose un analizador de partículas (Coulter Channelyzer) en forma simultánea con el contador de partículas. La distribución de tamaños fue graficada mediante un graficador Coulter (Modelo X-Y Recorder II) acoplado al analizador de partículas. El pico de la curva está dado por la acumulación de 1000

células. El volumen de mayor frecuencia durante el desarrollo de la curva de crecimiento corresponde al volumen modal pico de los parásitos en su fase de desarrollo exponencial. El pico de la curva está dado por la acumulación de 1000 células, estando el eje de las X dividido en 100 canales, lo que posibilita localizar el canal en el que se encuentra el pico del histograma. Mediante el uso de esferas de diámetro conocido utilizadas como standard, se calculó el volumen (en μm^3) correspondiente a cada canal del aparato. El contador de partículas utilizado, permite visualizar electrónicamente el tamaño y distribución de tamaños de la muestra mediante dos osciloscopios. El primer osciloscopio de partículas da pulsos cuyas amplitudes están directamente relacionadas con los tamaños de las partículas analizadas. El segundo osciloscopio suministra el histograma de acumulación de frecuencias de los pulsos. Este histograma puede ser transferido al papel mediante un graficador incorporado al contador de partículas. El canal del pico modal del histograma es calculado directamente por el instrumento. Los valores obtenidos durante los distintos experimentos fueron analizados estadísticamente según el Test "t" de Student.

1.8 Ciclo intracelular

El estudio del ciclo intracelular se realizó en una cámara de cultivo diseñada por Dvorak y Stotler (41) (Nicholson Precision

Instruments, Inc., Gaithersburg, Maryland), que permite la observación continua de la interacción individual célula huésped/parásito a nivel celular y subcelular bajo condiciones ambientales controladas. La cámara se fija a la platina de un microscopio invertido, modelo Zeiss ICM. La platina se desplaza en sus ejes X e Y mediante dos motores eléctricos controlados manualmente. Los movimientos son registrados en una consola digital que permite ubicar la posición de las células a observar en la cámara de cultivo mediante sus correspondientes coordenadas. La cámara presenta dos conexiones; una de entrada conectada a una bomba de perfusión regulada para proveer un flujo de $1 \text{ cm}^3/\text{hora}$ de medio de cultivo RPMI 1640 con 5% de suero fetal bovino inactivado; la otra conexión es de salida a un erlenmeyer de 300 ml de capacidad, utilizado como depósito del medio de cultivo descartado. Dos incubadoras (Air Stream Incubator, NPI), que producen una cortina de aire, mantienen constante la temperatura de la cámara.

Para estos estudios se utilizaron células BESM. En una cápsula de Petri de 4 cm de diámetro, se colocó un cubreobjetos de 25 mm de diámetro el cual se cubrió con 2 ml de una suspensión de células (BESM), en medio RPMI con 5% de suero fetal bovino inactivado, a una concentración aproximada de 10^4 células/ml. Las células se incubaron durante 18 horas para permitir la adhesión al cubreobjetos. Posteriormente se armó la cámara de cultivo bajo condiciones de esterilidad. La cámara se llenó de

medio RPMI 1640 con una jeringa plástica estéril de 3 ml de capacidad. Las células se observaron al microscopio, controlándose su estado y la dispersión de las mismas. Sólo se utilizaron cámaras en las cuales las células se encontraban separadas unas de otras por una distancia no menor al diámetro de una célula.

1.9 Infección de la cámara de cultivo

Tripomastigotes provenientes de cultivos celulares fueron centrifugados, según lo anteriormente descrito, a una velocidad de 300 g, durante 10 minutos a 4°C, con el objeto de eliminar restos celulares. El sobrenadante conteniendo los parásitos fue recentrifugado a 1500 g, durante 10 minutos a 4°C. Los parásitos sedimentados se resuspendieron en medio RPMI 1640 con 5% de suero fetal bovino inactivado a una concentración aproximada de 5×10^5 parásitos/ml. La inoculación de la cámara se realizó con jeringa de 1 ml, bajo condiciones de esterilidad, siendo el inóculo de 0,5 ml. La interacción células-parásitos se mantuvo durante un lapso variable dependiente del clon de T. cruzi utilizado, con el objeto de evitar la infección de más del 20% de las células totales de la cámara de cultivo. El exceso de parásitos se eliminó por lavado con 5 ml de medio de cultivo, aproximadamente, conectándose luego una jeringa de 20 ml conteniendo medio de cultivo a una bomba de perfusión a un flujo continuo de $1 \text{ cm}^3/\text{hora}$. Posteriormente-

te se identificaron 25 a 30 células infectadas con 1-2 parásitos y se anotaron las coordenadas de referencia de cada célula. Los ciclos intracelulares de los clones estudiados fueron observados en forma continua durante las 24 horas del día, durante toda la extensión del ciclo celular. Se observaron al menos 16 ciclos intracelulares de los parásitos por clon, los que fueron analizados mediante curvas de crecimiento generadas a partir de los datos obtenidos por el conteo del número de amastigotes intracelulares durante el ciclo celular para cada célula individualmente, posibilitándose así el análisis estadístico de las diferencias individuales en el ciclo intracelular de cada clon de T. cruzi. La duración del ciclo intracelular fue determinada desde la infección de las células huéspedes hasta la liberación de los tripomastigotes para el 50% de las células infectadas. Este criterio se adoptó debido a las variaciones intracelulares que presentaron desviaciones de hasta 14 horas con respecto a la media.

1.10 Contenido total de ADN (DNA)/parásito y estudio del ciclo celular por una técnica citométrica por flujo laminar (Flow Cytometry) (78).

La técnica de Citometría por flujo laminar involucra los siguientes pasos:

- 1) Preparación de una suspensión acuosa monodispersa de células o partículas.
- 2) Marcado del componente subcelular de interés mediante una coloración específica.
- 3) Medición mediante un Citómetro de Flujo Laminar (Flow Cytometer).
- 4) Análisis cuantitativo de los datos mediante el uso de una computadora.
- 5) Interpretación de los resultados cuantitativos en términos de su significado biológico.

El concepto fundamental de la Citometría por Flujo Laminar se basa en el flujo, a alta velocidad, de una suspensión acuosa de células o componentes subcelulares a través de una región sensora, adonde se genera una señal óptica o electrónica. Estas señales son analizadas y acumuladas para su evaluación cuantitativa. Típicas tasas de flujo permiten la medición de alrededor de 2000 células/segundo. Las células son generalmente coloreadas con un fluorocromo. Un diagrama básico del Citómetro por Flujo Laminar está representado en la figura 1.1. Se utilizan métodos hidrodinámicos para forzar a las células a desplazarse siguiendo trayectorias casi idénticas y a una velocidad uniforme cercana a los 10 m/segundo, a través de un punto focal intensamente iluminado a una longitud de onda tal que excite al fluorocromo y produzca emisión de fluorescencia. La fuente de luz es generalmente un láser de argón o criptón. De

esta manera, cada célula recibe una iluminación uniforme por un período sumamente corto, de 1-3 micro segundos, y emite fluorescencia. Una fracción de la fluorescencia de cada célula es capturada por un dispositivo óptico y captada por un fotosensor que genera una señal eléctrica proporcional a la señal óptica. Las señales son amplificadas, medidas y acumuladas en una computadora para su posterior análisis.

1.11 Crecimiento y preparación de los clones de *T. cruzi* para Citometría por Flujo Laminar

Los estadíos epimastigote y tripomastigote de los clones de *T. cruzi* fueron utilizados para el análisis citométrico por flujo laminar. Los epimastigotes fueron cultivados de la manera descrita anteriormente. Se cosecharon cultivos de epimastigotes en estado de crecimiento exponencial a una concentración de 10^6 - 10^7 parásitos/ml. Los epimastigotes en estado estacionario se cosecharon cuando la densidad de los cultivos alcanzó los 10^8 parásitos/ml. El estadio tripomastigote, proveniente de cultivo de células, fue cosechado al final del primer ciclo intracelular con el objeto de disminuir el número de amastigotes presentes en la fase líquida que aumenta después del primer ciclo intracelular debido a la muerte de las células huéspedes por infección múltiple. La concentración, fijación y coloración (Dvorak, J.A., Comunicación personal, 79) de los parásitos se realizó

en forma estéril. Los parásitos de cultivo fueron cosechados en tubos de centrífuga de 15 ó 50 ml de capacidad y centrifugados a 2000 g durante 10 minutos a 4°C. A continuación se retiró todo el sobrenadante del tubo, a excepción de 0,1 ml. Se calculó previamente el volumen inicial de la suspensión de parásitos de cultivo, de modo tal que el volumen final de 0,1 ml contuviera 10^8 parásitos/ml. La suspensión de parásitos fue fijada por el agregado de 0,3 ml de una solución conteniendo 1% de Tritón X-100 (Packard Inst.Comp.Inc., Illinois) y 0,2 M de sacarosa en una solución tampón de 0,05 M de citrato de sodio-fosfato, a pH 3,0 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego de la fijación, la suspensión de parásitos se diluyó en una solución salina fosfato-tamponada de pH 7,2, conteniendo 0,15 M de NaCl y 125 mM de $MgCl_2$ (PBS-Mg). El resto de la técnica se desarrolló a 4°C, recubriéndose los tubos con papel de aluminio para mantener el material a oscuras, con el propósito de evitar la degradación del colorante por la luz. El DNA de los parásitos se coloreó "in situ", durante 30 minutos, por el agregado de 0,1 ml de una solución de 1 mg/ml de mitromicina (Polysciences Inc., Warrington, Pennsylvania). Este componente utilizado para colorear DNA (80) es un antibiótico de alto peso molecular, con alta afinidad por DNA helicoidal pero no por RNA. La mitromicina se une a la Guanina en presencia de un catión bivalente (81). La suspensión de parásitos coloreados para DNA fue diluída a razón de 1:10 (V/V) con PBS-Mg, dejándose equilibrar durante por lo

menos 18 horas previamente al análisis por Citometría por Flujo Laminar. Una suspensión de epimastigotes de la cepa Tulahuen de T. cruzi fue preparada conjuntamente con las preparaciones de parásitos para análisis citométrico por flujo laminar y utilizada como control standard de la coloración. Cada suspensión de parásitos fue filtrada a través de un filtro Nitex de 10 μm (Toble, Ernest and Traber Inc., New York, New York) para eliminar ocasionales acúmulos de parásitos.

1.12 Instrumentación y análisis del Citómetro de Flujo Laminar

El análisis del contenido de DNA total por parásito fue realizado con un instrumento EPICS-II "Flow Cytometer Cell Sorter". Este instrumento fue originalmente desarrollado por Particle Technology Inc., Los Alamos, New Mexico, siendo el predecesor del modelo EPICS-V actualmente producido por Coulter Electronics Inc. Este equipo tiene incluida una computadora digital Modelo PDP 8/E (Digital Equipment Corporation, Maynard, Massachusetts). A través de una interfase RS-232c agregada a la terminal Tektronix 4010 de la computadora PDP 8/E se posibilita el uso de un Graficador Digital Tektronix 4662 (Tektronix Inc., Beaverton, Oregon).

Para estabilizar el sistema, el rayo láser, los sensores electrónicos, la computadora y el sistema de flúidos son puestos en funcionamiento durante 45 minutos previamente al uso del instrumento. La estabilidad es controlada por la salida en los sen-

sores de dispersión de luz y del fotomultiplicador durante el flujo normal de la camisa con solución isotón en la cubeta de flujo. En este caso el rayo láser es operado a una longitud de onda de 457 nm, con una salida de 150 mW de luz estabilizada. Se utilizó un filtro barrera de 530 nm que excluye la luz del láser y permite el pasaje de la luz fluorescente emitida al fotomultiplicador (PMT). La información sobre el pico de los pulsos en el espectro de emisión es recolectada y mostrada como una distribución de frecuencias con una resolución de 512 canales. En esta distribución la localización del canal es directamente proporcional a la intensidad de emisión de fluorescencia. Por lo tanto, la frecuencia de distribución representa un histograma de DNA total/organismo versus número (cuentas) de células. El máximo número de cuentas por canal se fijó en 4096, ajustándose el índice de acumulación de modo tal que se examinaron aproximadamente 2000 parásitos/segundo.

1.13 Calibración externa mediante un material biológico

Se fijaron eritrocitos maduros de pollo con 10% de glutaraldehído, durante 30 minutos a temperatura ambiente, para estabilizar las células e inducir fluorescencia en las membranas celulares (Dvorak, J.A., comunicación personal, 79). Los glóbulos rojos fueron posteriormente lavados con solución salina buffer-fosfato y mantenidos a 4°C. Cada vez que se realizó un análisis

citométrico por flujo laminar, se diluyó una muestra de la suspensión de glóbulos rojos en solución Coulter Isotón II a una concentración tal que permitiera obtener 2000 cuentas/segundo, bajo las mismas condiciones utilizadas para el análisis del DNA total/parásito de los clones de T. cruzi.

1.14 Calibración interna de la electrónica del Citómetro de Flujo Laminar

La estabilidad y calibración de los elementos electrónicos utilizados en la detección de fluorescencia fue controlada periódicamente mediante una luz emitida por un diodo (LED) pulsado con una onda cuadrada de 0,68 KHz, generada por un generador de pulsos Wavetek, modelo 142 (Wavetek Inc., San Diego, California). La señal resultante detectada por el fotomultiplicador es acumulada bajo control computado, para determinar el canal en el cual se localiza el pico de las cuentas y el coeficiente de variación (CV) de los pulsos. El coeficiente de variación (CV) se define como $CV = S/\bar{x} \times 100$, donde S es la desviación standard y \bar{x} es la media de la distribución.

1.15 Calibración externa del Citómetro de Flujo Laminar

Se utilizaron microesferas fluorescentes de 10 μm de diámetro (Fluorepheres, lote 3045, Coulter Electronics Inc.) para evaluar la estabilidad del Citómetro de Flujo Laminar en condiciones

operativas (82). A intervalos regulares se determinó el CV mediante la frecuencia de distribución de los pulsos de fluorescencia de una muestra de microesferas. Para cada determinación individual de DNA total/parásito se recolectaron tres espectros. El primer espectro recolectado correspondió al de una muestra de eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído. A continuación, se obtuvo el espectro de la muestra de parásitos coloreada con mitromicina. Finalmente, se obtuvo un segundo espectro con eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído. Epimastigotes de la cepa Tulahuen de T. cruzi, preparados y coloreados simultáneamente bajo las mismas condiciones que los preparados de parásitos para el análisis de DNA total/organismo de los clones de T. cruzi, suministran el último espectro. Todos los espectros obtenidos fueron archivados en cintas magnéticas y transferidos al papel mediante un graficador Tektronix 4662. Los perfiles fueron determinados por la intensidad de fluorescencia en el eje de las abscisas, la cual es proporcional al contenido de DNA de la población de organismos, y por el número de células en el eje de las ordenadas. Por lo tanto, el espectro representa la distribución del contenido de DNA/organismo de una población. Como el contenido de DNA celular varía entre N y 2N durante el ciclo celular, se puede dividir al ciclo del DNA celular (83) de acuerdo al mismo. Consecuentemente, en una población celular dada, se encontrarán células que presentan contenido de DNA igual a N, las cuales se encuentran en el período G1 durante el cual

no hay síntesis de DNA; dicho período es seguido por el período de síntesis de DNA, durante el cual se produce la duplicación del mismo y que está representado por aquellas células que presentan contenidos de DNA intermedios entre N y 2N (período S); a continuación se observa un segundo período caracterizado por la ausencia de síntesis de DNA (período G2) que está representado por aquellas células que ya han duplicado su genoma (2N) y que culmina con el evento morfológico de la mitosis, completándose el ciclo celular. Los distintos métodos utilizados normalmente para definir G1, S y G2 no determinan el período mitótico M, que puede ser incluido en G2 o ser determinado separadamente (84).

De esta manera, es posible analizar y determinar gráficamente la localización del canal en el cual se encuentra el pico G1, una vez determinados los picos G1 para la cepa Tulahuen, para las muestras de parásitos a analizar y para los eritrocitos de pollo. Por lo tanto, el contenido de DNA total/ parásito se puede expresar en unidades arbitrarias, como por ejemplo $(G1(P) / X CE (P)) / (G1(T) / X CE (T))$, donde P es la muestra de parásitos que está siendo analizada, T es la de los epimastigotes de la cepa Tulahuen, G1(P) es la posición del canal que corresponde al pico G1 de la muestra de parásitos que está siendo analizada, X CE (P) es la media de la posición de los canales obtenidos del primer pico y segundo pico de los espectros de eritrocitos de pollo para el espectro P, G1 (T) es la

posición del canal que corresponde al pico G1 de la cepa Tula-huen y finalmente X CE (T) es la media de la posición de los canales correspondientes al primer pico y segundo pico de los espectros de eritrocitos de pollo para el espectro T. Se realizó un mínimo de tres determinaciones independientes del contenido de DNA total/parásito, espaciadas en el tiempo, para cada clon de T. cruzi estudiado. El estudio del ciclo de DNA celular de T. cruzi analizado por Citometría de Flujo Laminar, se realizó siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Las proporciones de células presentes en las fases G1, S y G2 se determinaron gráficamente mediante un Graficador Tektronix 4662, utilizándose una computadora Tektronix 4051 para integrar el área del espectro de la muestra de parásitos a analizar. Se determinó la ubicación del pico correspondiente a G1. El doble de la distancia entre el origen y G1 correspondió al pico G2. Habiéndose determinado gráficamente G1 y G2, se realizaron los cálculos de los porcentajes de células en G1, S y G2 (figura 1.2) integrándose desde el punto A al punto B para el eje de las Y, desde el punto B al punto C para el eje de las X y desde el punto C al punto D para el eje de las Z. Por lo tanto, $Y+X+Z = M$, siendo M igual al área total del espectro. Por lo tanto, $(G1 = 2.Y)$, $(G2 = 2.Z)$ y $(S=X=M-G1+G2)$.

1.16 Cuantificación del DNA total, DNA nuclear y DNA extranuclear o kinetoplástico (k-DNA) por parásito mediante Microespectrofluorometría.

Tripomastigotes derivados de cultivo celular en BESM fueron fijados y coloreados con mitromicina, utilizándose el mismo protocolo que para el análisis citométrico por flujo laminar, cuantificándose el ADN total/parásito, el DNA nuclear/parásito y el DNA-kinetoplástico/parásito en base a la intensidad relativa de fluorescencia por el Método de Microespectrofluorometría. Para este propósito se utilizó un microscopio Leitz Ortholux 2 MPV compacto. La longitud de onda de excitación del fluorocromo fue del rango de 390-490 nm. La luz de excitación fue eliminada del fotomultiplicador mediante un filtro barrera de 515 nm. El tiempo de exposición de la excitación fue de 0,25 segundos y se recolectaron un mínimo de 10 valores por clon para cada estructura analizada.

1.17 Origen de los cultivos de amastigotes de T. cruzi

Los cultivos de amastigotes fueron originados a partir de formas de cultivo en estado estacionario de crecimiento, en fase de desarrollo exponencial y a partir de tripomastigotes provenientes de cultivo de tejidos del clon Miranda/83. A tal efecto, se sembraron cultivos vírgenes con concentraciones de 10.000 a 50.000 parásitos/ml provenientes de cultivos axénicos en fase de crecimiento exponencial o en estado estacionario de desarrollo o con 10.000 tripomastigotes/ml provenientes de cultivo celular, durante un período de incubación de 50-70 horas bajo las mismas

condiciones de cultivo utilizadas para el mantenimiento de epimastigotes (temperatura, medio LIT de cultivo, frascos de cultivo, etc.). Finalizado el período de incubación, los cultivos fueron centrifugados a 1000 g durante un lapso de 10 minutos y los parásitos sedimentados fueron resuspendidos en medio de cultivo fresco y reincubados a 26°C durante un nuevo período de 50 - 70 horas.

A partir del segundo pasaje, el cambio de medio se realizó colocando el frasco de cultivo en posición vertical durante un período de 1 minuto, con lo cual los acúmulos de amastigotes sedimentaron más rápidamente que los epimastigotes que permanecieron en suspensión, extrayéndose a continuación aproximadamente el 90% del medio de cultivo con extremo cuidado de no producir agitación, el cual fue reemplazado con medio LIT fresco. Los pasajes subsiguientes, del 4° al 7°, se realizaron siguiendo esta sencilla metodología, manteniéndose estrictamente el intervalo de 50 - 70 horas entre subcultivos. El tiempo de sedimentación se redujo a aproximadamente 15 segundos en los pasajes sucesivos, siendo posible extraer prácticamente todo el medio de cultivo, debido a que la mayoría de los acúmulos de amastigotes permanecen adheridos al fondo del frasco de cultivo. Una vez establecido el cultivo de amastigotes, el mantenimiento se realizó por pasajes seriados a una concentración de 3×10^6 - 1×10^7 parásitos/ml.

El mismo protocolo fue utilizado para obtener cultivos de amastigotes de los clones Miranda/80, Miranda/91, CA-I/64 y de la

cepa Tulahuen de T. cruzi. El tiempo transcurrido entre los sucesivos pasajes fue aproximadamente igual al doble del tiempo de duplicación correspondiente. Todos los datos presentados sobre el estudio de los amastigotes extracelulares corresponden al clon Miranda/83, salvo indicación contraria.

1.18 Cinética de crecimiento de los cultivos de amastigotes en medio LIT

El desarrollo de los cultivos de amastigotes se monitoreó en forma semejante a la descrita anteriormente para cultivos de epimastigotes. Los cultivos monitoreados se iniciaron a partir de amastigotes de un cultivo madre de 3 días. Los cultivos se agitaron vigorosamente antes de la toma de cada muestra con el objeto de disgregar los acúmulos de amastigotes. Las muestras extraídas fueron diluídas en Solución Coulter Isotón II y agitadas nuevamente, como paso previo a la determinación del número de parásitos. Parte de la muestra se utilizó para el recuento de las formas amastigotes y epimastigotes presentes.

1.19 Coloración de Giemsa

La coloración de los distintos estadios de T. cruzi fue realizada mediante extendidos sobre portaobjetos secados a 120°C durante 3 minutos. Los parásitos fueron luego fijados con etanol o metanol durante 5 minutos y posteriormente coloreados con una so-

lución de colorante de Giemsa al 1,5% durante 30-60 minutos. A continuación se procedió a lavarlos con agua desionizada y se los secó a temperatura ambiente previamente al montaje. El recuento de los parásitos de los distintos estadios de T. cruzi en los preparados coloreados con Giemsa se realizó a 425 aumentos. Se contaron de 200 a 400 parásitos, diferenciándose los epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes según su morfología general y según las posiciones relativas del kinetoplasto con respecto al núcleo (85). Los datos se expresaron como porcentajes de los distintos estadios de T. cruzi presentes.

1.20 Análisis del desarrollo de los cultivos de amastigotes por Citometría por Flujo Laminar

Los amastigotes fueron fijados y coloreados para Citometría por Flujo Laminar, utilizándose a tal efecto el mismo protocolo descrito anteriormente para epimastigotes de T. cruzi. Las muestras de amastigotes fueron pasadas 10 veces sucesivas a través de una jeringa descartable de 1 cm³, con una aguja de 25 x 5/8", previamente al análisis de la muestra, con el objeto de asegurar la obtención de una suspensión monodispersa de amastigotes. El cálculo de las fases G1, S y G2 del ciclo celular fue realizado a partir de los perfiles obtenidos, según se ha descrito anteriormente.

1.21 Incubación de amastigotes y epimastigotes en presencia de complemento.

Epimastigotes y amastigotes provenientes de cultivos en medio LIT en estado de desarrollo exponencial, fueron lavados y resuspendidos en solución buffer de fosfato (PBS), a una concentración aproximada de 2×10^6 parásitos/ml, adicionándose a continuación un 25%(V/V) de suero normal humano como fuente de complemento e incubándose a 37°C durante 30 minutos. Se evaluó la acción del complemento sobre los organismos mediante la observación de una muestra de la suspensión de parásitos bajo microscopio de contraste de fase. La viabilidad de los parásitos luego de la incubación en presencia de complemento se evaluó mediante una curva de crecimiento, para lo cual se centrifugó a los parásitos a 1000 g durante 10 minutos a 4°C y se los resuspendió en medio LIT, incubándose los posteriormente a 26°C. El desarrollo de los cultivos fue determinado según se describió anteriormente.

RESULTADOS

1. Evolución de los aislamientos unicelulares de Trypanosoma cruzi

De los 31 aislamientos originales realizados mediante micro-manipulación, 10 (59%) de los aislamientos del paciente Miranda y 9 (64%) de los aislamientos provenientes de la cepa CA-I, desarrollaron a una densidad suficiente como para ser expandidos y mantenidos posteriormente por pasajes seriados. De los restantes 12 aislamientos, 2 fueron descartados por presentar contaminación bacteriana y los 10 restantes fueron descartados después de un año por no detectarse desarrollo de parásitos. Los primeros clones en los que se observaron formas de división de los parásitos fueron los clones CA-I/70 y CA-I/72, a los 30 días posteriores al aislamiento. El clon Miranda/91 fue el último en presentar desarrollo detectable a los 210 días post-aislamiento. El tiempo requerido para el crecimiento de los aislamientos fue independiente del origen de los aislamientos y de la tasa de crecimiento de los organismos.

2. Cinética de crecimiento de los 19 clones de Trypanosoma cruzi

Las curvas de crecimiento individuales de la cepa Tulahuen y de los clones fueron generadas a partir de los datos de concentración de parásitos/ml obtenidos durante la evolución de los cultivos. Ejemplos de las mismas se ven representados para la

cepa Tulahuen y los clones CA-I/69 y Miranda/84 en las Tablas 2.01 A , 2.03 A y 2.05 A; Figuras 2.01, 2.03 y 2.05. A partir de la región correspondiente a la fase exponencial de la curva de crecimiento se calcularon, en forma computarizada, el coeficiente de correlación (r) y el tiempo de duplicación de los parásitos, como se observa en las Tablas 2.02 A, 2.04 A y 2.06 A; Figuras 2.02, 2.04 y 2.06. Sólo se presenta la fase exponencial de una curva de crecimiento por clon, juntamente con los datos de concentración de parásitos/ml en función del tiempo (Tablas 2. 1 A-2.19 A y Gráficos 2.1-2.19). Los restantes datos de las curvas de crecimiento obtenidos para cada clon se encuentran resumidos en tablas individuales para cada clon y para la cepa Tulahuen. Dichas tablas (2.0 B-2.19 B) detallan el tiempo de duplicación e incluyen los parámetros estadísticos obtenidos a partir de los tiempos de duplicación derivados de los datos experimentales obtenidos para cada clon, a saber, valor medio del tiempo de duplicación (\bar{X}) y error standard.

Tanto las diferencias entre tiempos de duplicación de clones pertenecientes a un mismo origen, como las diferencias entre los dos grupos de clones, fueron analizadas estadísticamente mediante el Test "t" de Student. En la Figura 2.20 están representadas las curvas de crecimiento de las tres poblaciones en sus fases de desarrollo exponencial. Dichas curvas teóricas fueron generadas a partir de los respectivos valores medios. La

comparación de las medias de los tiempos de duplicación de los grupos CA-I (O) y Miranda (Δ) y de la cepa Tulahuen (*), no reveló relación estadística con respecto a sus tasas de crecimiento.

Las diferencias entre tiempos de duplicación de los 19 clones de T. cruzi se ven representadas gráficamente en la Figura 2.21. Se comparó individualmente el tiempo de duplicación medio de cada grupo con la media de cada clon perteneciente a ese grupo, determinándose que los clones CA-I/59, CA-I/70 y CA-I/71 difieren estadísticamente de la media del grupo CA-I, siendo los tiempos de duplicación de los clones CA-I/59 y CA-I/70 más altos que la media de duplicación del grupo de clones CA-I y el tiempo de duplicación del clon CA-I/71 significativamente menor que el del grupo CA-I. Las diferencias de tiempos de duplicación entre los clones CA-I/59 y CA-I/70 fueron analizadas por el Test de "t", comprobándose que sus tiempos de duplicación son estadísticamente distintos, los que demuestra que la cepa CA-I está compuesta de por lo menos cuatro subpoblaciones definidas por las tasas de crecimiento de epimastigotes en medio axénico. El mismo criterio fue utilizado para analizar las diferencias en tiempo de duplicación de los clones Miranda. En este grupo de clones, el clon Miranda/83 presenta un tiempo de duplicación significativamente menor que la media del grupo Miranda. Consecuentemente, el grupo de clones Miranda está constituido por dos subpoblaciones con respecto al crecimiento en cultivos axénicos.

El análisis comparativo de los valores de tiempo de duplicación de cada clon con respecto a la media del otro grupo de clones reveló que, el tiempo de duplicación del clon CA-I/59, cuya tasa de crecimiento es significativamente menor con respecto al grupo de clones al cual pertenece, es similar al del grupo Miranda. Inversamente, el clon Miranda/83 presenta un tiempo de duplicación similar al del grupo CA-I, difiriendo significativamente de su grupo. Los clones CA-I/70 y CA-I/71 constituyen subpoblaciones aisladas por presentar tasas de crecimiento que difieren significativamente de las de las tres poblaciones estudiadas. La tasa de crecimiento del clon CA-I/70 presenta una posición intermedia entre el grupo CA-I y el grupo Miranda. El clon CA-I/71 presenta un tiempo de duplicación intermedio entre el grupo CA-I y la cepa Tula-huen. Considerando los 19 clones de T. cruzi en conjunto, estos clones constituirían cuatro grupos integrados como se detalla a continuación: 1) CA-I/71 constituye el grupo de mayor tasa de crecimiento. 2) CA-I/64, CA-I/65, CA-I/67, CA-I/69, CA-I/72, CA-I/73 y Miranda/83. 3) CA-I/70. 4) CA-I/59, Miranda/75, Miranda/76, Miranda/77, Miranda/78, Miranda/80, Miranda/84, Miranda/88 y Miranda/91 constituyen el grupo con menor tasa de crecimiento.

3. Volumen Modal de clones de T. cruzi en el pico de desarrollo exponencial de crecimiento

Durante la evolución de un cultivo de células en estado asincrónico de desarrollo, la distribución de los volúmenes celulares de la población aumenta hasta alcanzar un valor máximo. Posteriormente, la población entra en su fase de desarrollo estacionario y el volumen celular disminuye (84). Los datos obtenidos de los picos de volumen modal de los 19 clones y de la cepa Tulahuen de T. cruzi en los distintos experimentos realizados, se encuentran resumidos mediante tablas individuales para cada clon. En dichas tablas se expresa el pico del volumen modal obtenido para cada experimento, la media y el error standard (Tablas 3.0 A - 3.19 A). Las diferencias existentes en los volúmenes modales de los 19 clones y la cepa Tulahuen de T. cruzi se encuentran gráficamente representadas en la Figura 3.1. El análisis estadístico de las diferencias observadas en el volumen modal de los dos grupos de clones fue analizado mediante el Test "t". El volumen modal en el pico de desarrollo de cada clon fue comparado con la media del volumen modal del grupo de clones al cual pertenece. Se determinó que los clones CA-I/69 y CA-I/70 difieren significativamente respecto a la media del grupo CA-I, siendo las células de estos clones de menor volumen que el resto de los clones de T. cruzi analizados. El análisis estadístico de las diferencias en el volumen modal del grupo de clones Miranda demuestra que el volumen modal del clon Miranda/83 es significativamente menor que el obtenido para el grupo Miranda, y en cambio no difiere de la media del grupo CA-I. El pico del volumen modal del

grupo Miranda es significativamente mayor que el del grupo CA-I. Sin embargo, las medias aritméticas de los volúmenes modales de los dos grupos de clones no difieren significativamente de la media de la cepa Tulahuen. Debido a la dispersión en el volumen modal pico de los clones, no existe una clara separación entre los grupos Miranda y CA-I, presentándose una distribución superpuesta representada por los clones CA-I/59 ($27,6 \pm 1,5 \mu\text{m}^3$), CA-I/64 ($28,6 \pm 0,8 \mu\text{m}^3$), CA-I/72 ($28,3 \pm 1,3 \mu\text{m}^3$), Miranda/88 ($29 \pm 0,6 \mu\text{m}^3$) y Miranda/91 ($27,5 \pm 0,7 \mu\text{m}^3$). Por lo tanto, considerando las medias aritméticas del volumen modal pico como criterio de clasificación podemos distinguir tres subpoblaciones en el grupo de clones CA-I, constituyendo el clon CA-I/70 la subpoblación de menor volumen modal del grupo CA-I, el clon CA-I/69 la segunda subpoblación con un volumen modal intermedio y estando integrada la tercera subpoblación por el resto de los clones del grupo CA-I. El grupo Miranda está constituido por dos subpoblaciones, utilizándose como criterio el volumen modal pico de la media aritmética de los clones que los constituyen; una subpoblación está representada por el clon Miranda/83 y el resto de los clones Miranda constituye la segunda subpoblación, que es la de mayor volumen modal.

La variabilidad inter-experimental de estos parámetros, crecimiento y volumen modal pico, fue del 0,2 al 6% para la tasa de crecimiento y del 1,6 al 6,7% para el volumen modal pico. Este grado de variación para ambos parámetros es despreciable y se

encuentra dentro del error experimental, demostrando la estabilidad de los clones de T. cruzi durante el transcurso de este estudio. Dos clones CA-I/64 y Miranda/83, mantenidos por pasajes seriados bisemanales durante 148 pasajes, fueron estudiados con respecto a estos parámetros durante el transcurso de un año y medio sin mostrar variaciones inter-experimentales superiores a las mencionadas anteriormente.

4. Estudio del ciclo intracelular de clones de T. cruzi

El estadio reproductivo de T. cruzi en el huésped vertebrado se desarrolla intracelularmente en la célula huésped. El propósito de este estudio fue determinar si existen diferencias entre las distintas fases del ciclo intracelular entre clones de T. cruzi y si existe correlación entre el tiempo de duplicación de los amastigotes intracelulares y el tiempo de duplicación de los epimastigotes en medio de cultivo líquido, y por otra parte confirmar la heterogenicidad de T. cruzi mediante la utilización de otro parámetro biológico.

En este estudio se utilizaron cinco clones de T. cruzi, analizándose los siguientes parámetros: período quiescente (lag), que es el lapso que transcurre desde la penetración del tripomastigote hasta el inicio del período multiplicativo del amastigote; fase multiplicativa del parásito por la cual es posible calcular el tiempo de duplicación y el número de generaciones y finalmente la transformación del amastigote a tripomastigote, última etapa

del ciclo intracelular del parásito que culmina con la liberación de los tripomastigotes por ruptura de la célula huésped. Los datos obtenidos sobre la evolución temporal de un parásito, desde su penetración en la célula huésped hasta la liberación de tripomastigotes, para cada uno de los clones se ejemplifican en las tablas (4.1, 4.3, 4.5, 4.7). Los mismos se encuentran expresados en horas post-infección/Nº de parásitos. De los datos tabulados se generaron curvas de crecimiento (Figuras 4.1, 4.3, 4.5, 4.7) a partir de las cuales se determinaron las fases de desarrollo exponencial correspondientes a cada ciclo intracelular. Los datos utilizados para graficar las fases exponenciales de los ciclos intracelulares se presentan en las Tablas (4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 4.9). A partir de las curvas correspondientes a las fases exponenciales generadas se calcularon el período lag o quiescente, el tiempo de duplicación de los amastigotes y el coeficiente de correlación para cada célula huésped infectada (Figuras 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 4.9). El resumen de los datos de los ciclos intracelulares se expone en las Tablas (4.1 A, 4.3 A, 4.5 A, 4.7 A, 4.9 A y 4.1B, 4.3 B, 4.5 B, 4.7 B, 4.9 B) que detallan en forma individual el período lag y el tiempo de duplicación, respectivamente. Asimismo, dichas tablas detallan las medias y errores standard de los períodos lag y del tiempo de duplicación. Las medias de los valores de los tiempos de duplicación de epimastigotes en medio LIT y de amastigotes intracelulares, período lag, ciclo intracelular total y número de generaciones de los clones

estudiados se encuentran tabulados en la Tabla (4.10). Las diferencias observadas entre los tiempos de duplicación de los clones estudiados son estadísticamente significativas. El estudio estadístico de los períodos lag o de quiescencia no reveló diferencias significativas entre los clones CA-I/72 y CA-I/73, mientras que las diferencias observadas entre los restantes clones resultaron estadísticamente significativas. El lapso transcurrido entre la visualización de los primeros cambios morfológicos de los amastigotes en su transformación a tripomastigotes y la liberación de los mismos fue de aproximadamente 24 horas para todos los clones estudiados. El número de generaciones estimado por el número total de parásitos por célula es de 6 a 7 generaciones para los clones CA-I/72 y CA-I/73, mientras que el clon Miranda/78 presenta de 8 a 9 generaciones y el clon Miranda/80 de 7 a 8 generaciones de parásitos por ciclo intracelular. A pesar de las dificultades encontradas para determinar con exactitud el número de generaciones intracelulares, debidas a errores de conteo del número final de parásitos por célula huésped, se pudo determinar que existen diferencias con respecto al número de generaciones intracelulares entre los clones, de hasta 3 generaciones como máximo y de una generación intracelular como mínimo.

La duración del ciclo intracelular fue clon dependiente, correspondiendo al clon CA-I/72 el ciclo de menor duración (4,5 días), con excepción del clon Silvio X-10/5, mientras que

el clon Miranda /80 presentó el ciclo de mayor duración (9 días). En la tabla (4.10) se observa que existe una relación directa entre el tiempo de duplicación intracelular de los distintos clones y la duración de sus ciclos intracelulares. O sea, a mayor tiempo de duplicación de los amastigotes mayor es la duración del ciclo intracelular. Una relación similar se deduce de la comparación entre los tiempos de duplicación intracelulares y los períodos lag de los clones correspondientes. Asimismo a partir de los datos detallados en la Tabla (4.10) y de la Figura (4.11) se puede apreciar que existe una relación entre los tiempos de duplicación de los estadios epimastigote y amastigote. Es posible definir una correlación mediante el cálculo teórico de la curva que mejor se ajuste a los valores experimentales. Mediante computación se graficó el tiempo de duplicación de los amastigotes intracelulares (abscisas) versus tiempo de duplicación de los epimastigotes en medio LIT (ordenadas), analizándose la correlación entre los datos experimentales y la curva teórica definida por la ecuación: $(y = a + b/x)$, en la cual el parámetro y corresponde al tiempo de duplicación en horas de los epimastigotes, a y b son constantes y finalmente el parámetro x corresponde al tiempo de duplicación en horas de los amastigotes intracelulares. De la ecuación anterior, se deduce que: $x = b/(y-a)$, o sea que dado el tiempo de duplicación en horas de los epimastigotes es posible calcular el tiempo de duplicación de los amastigotes

intracelulares, siendo los valores de las constantes $a = 83,2$ y $b = -526,36$, respectivamente. Esta curva que mejor se ajusta a los valores experimentales presenta un coeficiente de correlación $r = 0.988$ (Fig. 4.11 A).

La relación observada entre el período lag y el tiempo de duplicación (Fig. 4.12) se analizó en forma similar, graficándose el tiempo de duplicación de los amastigotes intracelulares versus el período lag. En este caso, la curva que mejor se ajusta a los datos experimentales está definida por la ecuación $y = x / (a + bx)$, en la cual el parámetro y corresponde al período lag en horas, siendo x el tiempo de división en horas de los amastigotes, a y b son constantes que definen la curva. De la ecuación anterior, se deduce que: $x = y.a / (1 - yb)$. O sea: x (tiempo de duplicación de los amastigotes) = y (período lag). $a / (1 - y.b)$. Los valores obtenidos para ambas constantes son $a = 0,36$ y $b = 0,012$, respectivamente, siendo el coeficiente de correlación $r = 0,982$ (Figura 4.12 A).

5. Análisis del contenido de DNA (ADN) total por organismo para los clones de T. cruzi, obtenido por Citometría por Flujo Láminar.

La distribución del DNA de una población celular en crecimiento asincrónico contiene información detallada sobre su cinética de crecimiento. Los respectivos perfiles de DNA se caracterizan por presentar demarcaciones que los distinguen; el pico

mayor, con un contenido de DNA expresado en unidades relativas, se debe a las células que se encuentran en la fase G1 del ciclo celular; el pico menor, que se encuentra ubicado en un contenido de DNA del doble del pico G1, corresponde a células en fase G2-M. La distribución continua entre ambos picos corresponde a aquellas células que se encuentran transitando la fase S. Esta distribución del DNA no varía durante el crecimiento exponencial de una población celular. En cambio, durante la fase estacionaria, el pico correspondiente a G1 aumenta proporcionalmente a la disminución del pico de las células que se encuentran en G2 y S. En poblaciones de T. cruzi se observó el mismo comportamiento anteriormente detallado. En la Figura 5.1 se observa la distribución del DNA en poblaciones de T. cruzi; los dos perfiles superiores corresponden a cultivos de epimastigotes en fase exponencial de crecimiento, mientras que el perfil inferior izquierdo corresponde a un cultivo de parásitos en fase estacionaria de crecimiento y el perfil inferior derecho corresponde a tripomastigotes derivados de cultivo de células. La existencia de un pico único en este último caso, confirma que el estadio tripomastigote es una célula arrestada en forma continua en G1 o en G₀.

La localización del canal correspondiente al pico G1 de cada uno de los clones de T. cruzi fue constante para parásitos en fase exponencial o fase estacionaria de desarrollo y para tripomastigotes derivados de cultivos celulares. Consecuentemente, este parámetro es independiente de la posición del parásito en

su ciclo de desarrollo o del estadio evolutivo del mismo.

La intensidad de fluorescencia emitida por glóbulos rojos de pollo fijados con glutaraldehído fue de magnitud similar a la fluorescencia correspondiente al pico G1 de muestras de T. cruzi coloreadas con mitromicina. Por lo tanto, el pico único de los histogramas derivados de eritrocitos de pollo resulta ser un excelente estándar para comparar los picos G1 de los histogramas de DNA derivados de parásitos coloreados con mitromicina. La localización, con respecto al pico único de glóbulos rojos de pollo, del canal correspondiente al pico G1 para parásitos coloreados con mitromicina fue constante para cada clon de T. cruzi. Sin embargo, la posición del canal correspondiente al pico G1 con respecto al estándar fue distinta para cada uno de los clones de T. cruzi estudiados. Las diferentes localizaciones de los picos correspondientes a G1 de los clones CA-I/64 y Miranda/80 se encuentran representadas gráficamente en la Figura 5.2, obtenida por la superposición de los respectivos perfiles de distribución del DNA.

En la figura 5.3 se muestran las diferencias obtenidas en el contenido total/organismo entre clones. El grupo CA-I y el grupo Miranda pueden separarse estadísticamente (límite de confianza del 95%) en base a las medias relativas del contenido total de DNA/organismo de cada grupo. La diferencia es de aproximadamente un 12%, siendo la diferencia máxima del DNA total/organismo de los 19 clones de T. cruzi superior al 20%.

El clon Miranda/78 presenta un contenido de DNA total/organismo significativamente menor que la media del contenido de DNA total/organismo del grupo de clones Miranda. Las diferencias en el contenido total de DNA total/organismo entre los clones del grupo CA-I no fueron significativas con respecto a la media del grupo.

En la figura 5.4 se encuentran representadas las medias de las intensidades de fluorescencia del núcleo, kinetoplasto y DNA total/tripomastigote de cuatro clones de T. cruzi: CA-I/71, CA-I/72, Miranda/75 y Miranda/88, medidos por espectrofluorometría. La media de la intensidad de fluorescencia del DNA total/organismo del clon CA-I/72 fue 4,6% más alta que la del clon CA-I/71. De manera semejante, la media del clon Miranda/88 fue 4,2% más alta que la del clon Miranda/75. Los datos obtenidos por microespectrofluorometría discrepan con los datos obtenidos por Citometría por Flujo Laminar, en los cuales el contenido de DNA total/organismo para el clon CA-I/71 fue 1,3% mayor que para el clon CA-I/72, mientras que para el clon Miranda/88 fue 4,5% mayor con respecto al clon Miranda/75. Esta discrepancia se debe probablemente al reducido número de muestras analizadas por espectrofluorometría. Sin embargo, las diferencias en contenido de DNA total/organismo entre los clones de los grupos CA-I y Miranda medidas por Citometría por Flujo Laminar (21%) fueron confirmadas por Microespectrofluorometría (27%). Se encontró que las diferencias de DNA interclonales se deben tanto a

diferencias de contenido de DNA del núcleo como del kinetoplasto. La mayor diferencia interclonal en la intensidad de fluorescencia media para el núcleo fue del 36%, mientras que la mayor diferencia interclonal encontrada para el kinetoplasto fue del 25%, para los cuatro clones analizados por espectrofluorometría. Sin embargo, la razón entre el contenido de DNA del núcleo y del kinetoplasto es de 2,07 y 1,97 para los clones CA-I/71 y CA-I/72, respectivamente. Para los clones Miranda/75 y Miranda/88 la razón fue de 3,53 y 3,20, respectivamente.

6. Estudio de las formas amastigotes en cultivo axénico

La obtención y el mantenimiento de amastigotes en medio de cultivo libre de células se basó en el estricto cumplimiento del protocolo descrito en Materiales y Métodos, cuyo fundamento es el pasaje seriado a intervalos regulares determinados por el tiempo de duplicación de los parásitos. La evolución de los cultivos fue similar, independientemente del origen de los mismos.

En los cultivos de amastigotes originados a partir de cultivos de epimastigotes, el número de epimastigotes decrece en los sucesivos pasajes al ser eliminados los epimastigotes en suspensión con cada cambio de medio. En cambio el número y tamaño de los acúmulos de amastigotes aumenta progresivamente, al-

canzando diámetros de hasta 0,1-2 mm (Fotos 1,2). La Foto 3 corresponde a un cultivo de amastigotes dispersados previamente por agitación. En cultivos originados a partir de tripomastigotes provenientes de cultivo de células se observó que la mayoría se transforman en amastigotes, observándose acúmulos y ocasionalmente formas flageladas en los primeros pasajes. La pureza de los cultivos de amastigotes obtenidos y el desarrollo de los mismos dependió del período de tiempo transcurrido entre pasajes sucesivos, siendo el lapso óptimo de 50-70 horas para el clon Miranda/83. Se han mantenido cultivos de amastigotes del clon Miranda/83 con una pureza no menor de 99,9% durante más de un año y medio, en más de 15 experimentos independientes realizados en ese lapso. El mismo protocolo utilizado con los clones Miranda/80, Miranda/91, CA-I/64 y con la cepa Tulahuen de T. cruzi permitió la obtención de cultivos de amastigotes cuyas purezas, en el pasaje 15, oscilaron entre el 98% para los clones y el 70% para la cepa Tulahuen. En todos los casos, el lapso transcurrido entre sucesivos repiques fue aproximadamente igual al doble del tiempo de duplicación de los epimastigotes respectivos.

Cinética de crecimiento de amastigotes del clon Miranda/83 de T. cruzi en medio de cultivo acelular.

El desarrollo de los amastigotes fue estudiado a partir de cultivos puros de amastigotes, realizándose cultivos de

epimastigotes del mismo clon en forma simultánea bajo idénticas condiciones experimentales. En la Figura 6.1 se representa gráficamente el desarrollo de epimastigotes del clon Miranda/83 en fase de crecimiento exponencial, según se describió anteriormente (ver Sección 2 de Resultados). Los datos correspondientes se detallan en las Tablas 6.1 A y 6.1 B. La evolución de los cultivos de amastigotes durante 21 días sin cambio de medio de cultivo (cultivos no perturbados de amastigotes) se ve representada gráficamente por las curvas de crecimiento de la Figura 6.2 (Tablas 6.2 A y 6.2 B), caracterizadas por presentar tres fases: una primera fase de crecimiento exponencial, con una duración aproximada de tres días y un tiempo de duplicación medio de 33,12 horas (Tabla 6.2 C), en la cual se registra un aumento de cuatro veces la concentración inicial de parásitos, equivalente a dos generaciones. A continuación se observa una fase de aproximadamente 10 días de duración, denominada fase de transformación, caracterizada por el bajo incremento del número de parásitos, que presenta un tiempo de duplicación de 262 horas, seguida finalmente por una segunda fase de crecimiento exponencial cuyo tiempo de duplicación es intermedio entre los tiempos de duplicación de la primera y segunda fases de crecimiento exponencial. Esta segunda fase de crecimiento exponencial es variable en cuanto a su duración y al tiempo de duplicación de los parásitos, siendo dependiente de la concentración inicial de parásitos en el cultivo. Esta

atípica curva de crecimiento se debe al hecho de que durante el desarrollo de la misma se produce la transformación de los amastigotes en epimastigotes (Figura 6.4). Se observa que durante la primer fase de crecimiento exponencial, todos los parásitos son amastigotes, observándose un 100% de formas amastigote hasta el día 3. Subsecuentemente, los amastigotes se transforman en epimastigotes. Esta transformación involucra al 85% de los amastigotes, ya que al final de esta segunda fase se contabiliza un 15% de amastigotes y el leve incremento observado en el Número de tripanosomas/ml se debería a la iniciación de la división de los epimastigotes, siendo éstos los responsables de la segunda fase de crecimiento exponencial.

El comportamiento de cultivos de amastigotes en las dos primeras fases del desarrollo fue similar, independientemente de las concentraciones iniciales de parásitos estudiadas (5×10^5 a 2×10^7 amastigotes/ml). Si el cultivo de amastigotes es repicado al final de la primera fase exponencial, o sea antes de la iniciación de la transformación de los parásitos a epimastigotes, la transformación no se produce y los amastigotes desarrollan una nueva fase exponencial que involucra dos nuevos ciclos celulares. De esta manera es posible mantener cultivos puros de amastigotes por pasajes seriados (Fig. 6.3). A partir de cultivos de amastigotes a concentraciones iniciales de 10^6 parásitos/ml, se obtienen concentraciones de alrededor de 6×10^7 parásitos/ml de amastigotes en tres pasajes sucesivos. A concentracio-

nes iniciales mayores de amastigotes, posibles factores nutricionales afectan a los cultivos que alcanzan la fase estacionaria de crecimiento. Un hecho similar ocurre con los epimastigotes. Por lo tanto, los cultivos de amastigotes deben ser mantenidos a concentraciones iniciales de 1×10^6 hasta 1×10^7 amastigotes/ml.

Resistencia de los amastigotes a la lisis por complemento

Los amastigotes incubados en presencia de complemento no mostraron diferencias en su desarrollo con respecto a amastigotes no tratados, al ser incubados posteriormente en medio LIT a 26°C, a diferencia de los epimastigotes que sufrieron un 100% de lisis, no observándose desarrollo posterior de formas epimastigotes en medio LIT.

La lisis diferencial observada por acción de complemento fue utilizada para purificar experimentalmente cultivos mixtos de amastigotes y epimastigotes, obteniéndose cultivos puros de amastigotes (87).

Análisis del ciclo celular de los amastigotes

El estudio mediante Citometría de Flujo Laminar de la distribución de la población de organismos en las fases G1, S y G2 durante las primeras 40 horas de desarrollo de un cultivo de amastigotes, mostró cambios secuenciales en los patrones de DNA (Figura 6.5). A tiempo cero del cultivo, el perfil de DNA de la po-

blación (Perfil 1) es semejante a los perfiles de DNA de poblaciones en fase estacionaria de crecimiento, en las cuales la mayoría de las células se encuentran arrestadas en G1. Los datos obtenidos, expresados porcentualmente, son G1 = 64,4%, S = 10% y G2 = 25,6%, respectivamente. Subsecuentemente, la población originariamente arrestada en G1 inicia su ciclo de duplicación del DNA, lo que se evidencia por el aumento de la proporción de células en el período S (Perfil 2) (G1 = 50,4%, S = 31,4% y G2 = 18,2%). A las 16 horas de la evolución del cultivo (Perfil 3) parte de la población continúa pasando de G1 a S (G1 = 35,2%, S = 29,3% y G2 = 35,3%), mientras que las células que se encontraban sintetizando DNA inician el período G2, aumentando consecuentemente la proporción de células en G2. Este aumento del porcentaje de células en G2 continúa progresivamente, con una paralela disminución del porcentaje de células en fase S (Perfil 4) (G1 = 38,9%, S = 15,5% y G2 = 45,6%). A las 32 horas, parte de la población ha completado el ciclo celular, aumentando nuevamente la proporción de células en G1 (Perfil 5) (G1 = 41,2%, S = 22,8% y G2 = 36,0%). Este proceso continúa hasta las 40 horas de desarrollo del cultivo, observándose un progresivo aumento de células en S (Perfil 6) (G1 = 41,1%, S = 31,6% y G2 = 27,6%), correspondiente a células que inician el segundo ciclo de replicación del DNA. Al finalizar el segundo ciclo, la población de amastigotes se encuentra nuevamente en fase G1. Los perfiles de

DNA obtenidos de muestras de amastigotes a los días 4 y 5 indican que la población de amastigotes permanece arrestada en G1.

La evolución de los perfiles de DNA de amastigotes en fase de crecimiento exponencial difieren de los obtenidos para poblaciones de epimastigotes, evidenciando una semi-sincronización celular en la población de amastigotes. Por el contrario, los perfiles de DNA de una población de epimastigotes son similares durante todo el período de crecimiento exponencial, siendo los porcentajes de células en G1, S y G2 prácticamente constantes, lo que evidencia la ausencia de sincronización en la población celular.

DISCUSION

El conocimiento adquirido en los últimos 75 años con respecto a los múltiples aspectos de la biología del Trypanosoma cruzi se debe en gran parte a la facilidad con que los distintos estadios morfológicos de este parásito pueden ser mantenidos, tanto "in vitro" como "in vivo", en el laboratorio. En los estudios experimentales se han utilizado poblaciones de parásitos aislados de distintas fuentes y zonas geográficas de América. Estos aislamientos denominados comúnmente cepas, cuyas constituciones genéticas son desconocidas, representan muestras de poblaciones naturales de T. cruzi y presentan características propias que han permitido el agrupamiento en distintas categorías según los parámetros analizados, indicando la existencia de heterogenicidad en T. cruzi. Sin embargo, las cepas de T. cruzi evidenciaron inestabilidad con respecto a algunos parámetros biológicos durante el mantenimiento de los parásitos en condiciones artificiales en el laboratorio. Las razones esgrimidas para justificar la inestabilidad de cepas de T. cruzi se basaban en la hipótesis de que las cepas son muestras de poblaciones heterogéneas de parásitos, pudiendo producirse variaciones en el perfil genético de los aislamientos durante la adaptación y posterior mantenimiento de los mismos en condiciones de laboratorio. Consecuentemente, se evidenció la indudable necesidad de disponer de poblaciones de parásitos cuyas carac-

terísticas biológicas fuesen estables en el transcurso del tiempo bajo distintas condiciones de mantenimiento, hecho factible si dichas poblaciones son genéticamente homogéneas. Este ha sido el criterio adoptado en este Trabajo de Tesis, en el cual se utilizaron clones de T. cruzi para estudiar la variabilidad existente en poblaciones del parásito. El concepto de clon como población genéticamente homogénea de parásitos originada por división asexual de un solo organismo, tiene un significado especial en especies como Trypanosoma cruzi en la cual no existen evidencias de intercambio genético. Por lo tanto, cada individuo se encuentra genéticamente aislado y su progenie constituye un clon, lo que permite suponer que T. cruzi estaría constituida por clones en la naturaleza (57).

En este Trabajo de Tesis se demuestra la existencia de heterogenicidad en T. cruzi en base a la caracterización de poblaciones genéticamente homogéneas. Se consideró detenidamente la elección y aplicación de la técnica de clonado, eligiéndose una técnica de micromanipulación que permite la individualización y el aislamiento de un solo organismo, asegurando además la selección del estadio. Se escogieron únicamente epimastigotes, por ser este estadio de T. cruzi la forma multiplicativa del parásito tanto en el insecto como en cultivos axénicos. Las causas de las diferencias observadas en la duración de los períodos transcurridos entre el aislamiento

y la detección de desarrollo no fueron estudiados, pero presumiblemente se pueden atribuir a diferencias en el estado fisiológico de los organismos aislados, pudiendo algunos parásitos haberse encontrado arrestados en G1, siendo variables los períodos lag previos a la fase de desarrollo, y otros transitando el ciclo celular. Este concepto se ve reforzado por la ausencia de correlación entre la duración de los períodos transcurridos entre el aislamiento y la observación de desarrollo y las tasas de crecimiento exponencial de los clones.

El estudio del desarrollo de 19 clones de T. cruzi en medio de cultivo axénico ha permitido demostrar la existencia de heterogenicidad en poblaciones de T. cruzi. La diversidad biológica observada entre clones pertenecientes al grupo Miranda indica claramente que la heterogenicidad estaba presente en la población original en el huésped y constituye la demostración de la coexistencia de subpoblaciones de T. cruzi en un huésped infectado crónicamente. El origen de esta coexistencia puede ser el resultado de una infección única con una población heterogénea de T. cruzi o ser debida a infecciones múltiples (88).

Se ha demostrado que las cepas de T. cruzi pueden retener cierta heterogenicidad biológica durante largos períodos de tiempo, bajo condiciones rutinarias de laboratorio. Por ejemplo, la cepa Y aislada en 1953 (89) y mantenida bajo condiciones de laboratorio durante 28 años, fue clonada recientemente, demostrándose diferencias significativas de hasta un doble en

las tasas de crecimiento de los clones (38). Por lo tanto, las presiones selectivas impuestas por las condiciones de mantenimiento sobre dichas poblaciones heterogéneas, pueden modificar la proporción relativa de cada subpoblación sin llegar a ser lo suficientemente intensas como para eliminar la heterogenicidad. La cepa CA-I, de la cual se aislaron los clones CA-I utilizados en este trabajo, fue mantenida por pasajes seriados en animales de laboratorio durante un lapso de cuatro años, previamente al clonado. La proporción de cada subpoblación puede haber sufrido variaciones con respecto a la presente en el paciente crónico. Sin embargo, la dispersión encontrada en las tasas de crecimiento de nueve clones derivados de la cepa CA-I demuestra que la cepa CA-I está constituida al menos por cuatro poblaciones estadísticamente distintas. En la descripción original de la cepa CA-I (70), existen evidencias indirectas de que se pueden haber inducido cambios en la población de parásitos durante la mantención rutinaria en el laboratorio. Los autores describen que cuando la cepa CA-I fue transferida del tercer pasaje en ratón a medio de cultivo bifásico, el tiempo de duplicación fue de 48 horas durante los primeros pasajes, decreciendo subsecuentemente a 30 horas. Este cambio en el tiempo de duplicación puede atribuirse a la selección de subpoblaciones con alta tasa de crecimiento. Los tiempos de duplicación de siete de los nueve clones CA-I aislados oscilaban alrededor de 31 horas, mien-

tras que dos clones presentaban un tiempo de duplicación superior a 41 horas. Este hecho sugiere que un cambio similar pudo haber ocurrido en la cepa CA-I durante el lapso de cuatro años en que fue mantenida en ratón previamente al clonado. Podemos suponer que la heterogenicidad observada en la cepa CA-I se debe a la existencia de una población heterogénea en el paciente crónico del cual se aisló la cepa.

Los parámetros biológicos estudiados en los 19 clones de T. cruzi fueron estables durante un período de dos años, durante el cual se realizó la caracterización de los mismos. La estabilidad de varios clones con respecto a sus tasas de crecimiento en medio LIT fue demostrada en este laboratorio por períodos de hasta cuatro años (Dvorak, comunicación personal, 90). La manipulación de los clones en distintas condiciones de cultivo y la posterior reimplantación a las condiciones de cultivo originales, no alteraron la estabilidad de los clones con respecto a las características biológicas analizadas, demostrando la reproducibilidad de los datos experimentales obtenidos con clones de T. cruzi durante lapsos prolongados e indicando que los parámetros analizados corresponden a características intrínsecas estables de los organismos que constituyen los clones.

El crecimiento celular, así como el tiempo de duplicación de una población de células en crecimiento exponencial, es un parámetro resultante de la integración de los valores individuales de los organismos constituyentes de esa población.

Actualmente se considera que el ciclo celular estaría constituido por dos ciclos, un ciclo de crecimiento celular y un ciclo del DNA; por lo tanto, durante la proliferación celular no sólo se replica el DNA sino que también se duplica el tamaño celular, estando ambos ciclos normalmente asociados. Una corroboración de esta relación es que durante la proliferación de una población celular el tamaño promedio se mantiene constante (91). La proliferación celular está controlada internamente por los genes y sus productos y externamente por factores nutricionales y ambientales. El volumen celular es consecuentemente un parámetro que posibilita medir el crecimiento celular, que es continuo durante el transcurso del ciclo celular, excepto en la mitosis en que se evidencia una sensible caída de la síntesis de RNA y proteínas, en la mayoría de los casos.

El volumen modal de una población celular es indicativo del estado fisiológico de la población. Por lo tanto, la fase de crecimiento exponencial de un cultivo de células puede definirse por su tasa de crecimiento y su volumen modal. Las diferencias significativas halladas en el volumen modal entre los clones CA-I y Miranda demuestran que el volumen modal es una característica de subpoblaciones de T. cruzi que puede ser utilizada para clasificar clones de T. cruzi. La falta de correlación entre la tasa de crecimiento y el volumen modal implica que ambas características son independientes. Sin embargo, las diferencias en volumen modal encontradas corroboran la existencia de subpoblaciones de parási-

tos en poblaciones de T. cruzi:

Las formas infectantes de Trypanosoma cruzi tienen la habilidad de reconocer y penetrar activamente células de mamífero para desarrollar sus ciclos de vida intracelulares. Se ha demostrado experimentalmente que el parásito presenta un tropismo tisular "in vivo", o sea una preferencia por invadir células de determinados tejidos (92). Sin embargo, todos los tejidos del mamífero son potencialmente susceptibles de ser infectados, con la única excepción hasta el presente del glóbulo rojo. Se ha observado "in vitro" que existen diferencias en la capacidad de atraer parásitos y en la susceptibilidad a la infección de distintas líneas celulares (93, 94). Un reciente estudio, realizado "in vitro", sobre la capacidad de penetración de tripomastigotes derivados de cultivo de células de dos clones del grupo CA-I y dos clones del grupo Miranda demostró la existencia de diferencias significativas en el índice de penetración de los clones, siendo la diferencia máxima encontrada de aproximadamente 70 veces (95). El desarrollo intracelular de T. cruzi no se ve aparentemente afectado por la célula huésped, excepto en células del sistema retículoendotelial (43, 96), indicando que las diferencias fisiológicas que puedan existir entre células distintas no son suficientes como para inducir variaciones en el desarrollo del parásito.

El ciclo de vida intracelular de T. cruzi se caracteriza por presentar una secuencia definida de eventos independien-

tes de la célula huésped, que culminan con la liberación de los tripomastigotes por muerte y ruptura de la célula huésped. Los 19 clones de T. cruzi estudiados presentaron la capacidad de infectar células de cultivo, siendo sus ciclos intracelulares cualitativamente iguales a los descritos anteriormente para cepas (42), lo que indica que el clonado no afectó la infectividad de los parásitos.

En los estudios de los ciclos intracelulares de clones de T. cruzi se consideraron los siguientes parámetros: el período lag, el período replicativo, el número de generaciones y la duración del ciclo intracelular total.

El período lag fue originalmente descrito en estudios realizados con la cepa Ernestina de T. cruzi (42), presentando una duración de 41 horas. Estudios posteriores realizados con las cepas House 510 y Limbo Tree Platform, coincidieron con los resultados obtenidos con respecto al período lag de la cepa Ernestina, si bien se observaron diferencias en los tiempos de duplicación de las cepas (67). En cambio, el análisis del período lag de los clones de T. cruzi permitió establecer que el período lag no es una propiedad constante del ciclo intracelular de T. cruzi, sino que es característico de la subpoblación considerada, evidenciándose una correlación directa entre el período lag y el tiempo de duplicación de los amastigotes intracelulares. La extrapolación de valores fuera del rango establecido experimentalmente de esta relación no pierde a priori significado biológico. Por ejemplo,

el período lag presentaría una duración de 12 horas para un tiempo de duplicación de los amastigotes de 5 horas, mientras que para tiempos de duplicación de amastigotes de 200 horas, correspondería un período lag de 72 horas. Esta correlación indicaría que el período lag, lapso durante el cual se produce el pasaje de una célula arrestada en G1 o Go a una célula multiplicativa (97, 98), depende al menos en parte de la duración del ciclo celular. La discordancia entre la constancia del período lag comunicada para cepas y las diferencias encontradas para clones de T. cruzi podría atribuirse a la menor dispersión de los datos experimentales obtenidos del análisis de poblaciones genéticamente homogéneas.

La utilización de clones de T. cruzi ha permitido establecer la existencia de diferencias en los tiempos de duplicación del estadio multiplicativo del parásito en el huésped mamífero, que a su vez se reflejan en la duración del ciclo de vida intracelular, debido a la relación hallada entre la tasa de crecimiento y el ciclo intracelular. La diferencia de un duplo observada entre las duraciones de los ciclos intracelulares de los clones CA-I/72 y Miranda/80 se debe principalmente a la diferencia en los tiempos de duplicación. La infección de las células de mamífero por T. cruzi está modulada tanto por el parásito como por la célula huésped (95, 97). La aparente falta de modulación del ciclo de vida intracelular del parásito por parte de la célula huésped (42, 98) sugiere que el ciclo intracelular estaría bajo estricto-

to control genético del parásito. Se ha demostrado también que el número de generaciones es característico de las subpoblaciones de T. cruzi. El rango del número de generaciones para los clones estudiados fue de 6-9, lo que implica la liberación de 64-516 tripomastigotes al finalizar los ciclos intracelulares respectivos.

Es de destacar que el único parámetro con respecto al cual no se han observado diferencias interclonales en el ciclo intracelular, es el período de diferenciación de amastigote a tripomastigote, el cual presentó una duración constante de aproximadamente 24 horas en la totalidad de los clones de T. cruzi estudiados.

La correlación directa existente entre las tasas de crecimiento de los estadios epimastigotes y amastigotes de T. cruzi, confirma que los tiempos de duplicación son parámetros intrínsecos y característicos de las poblaciones de T. cruzi, siendo la cinética de crecimiento una propiedad que permite definir y caracterizar clones de T. cruzi. Consecuentemente, el conocimiento de uno de los parámetros anteriormente mencionados permite la estimación del otro; dado el tiempo de duplicación en LIT se pueden calcular los parámetros que definen el ciclo intracelular, siendo el coeficiente de correlación de 0,988, para el rango de tiempos de duplicación de epimastigotes de 20-60 horas. Fuera de este rango, la correlación establecida pierde significado biológico y se deberán establecer

nuevas correlaciones, especialmente para tiempos de duplicación de epimastigotes superiores a las 60 horas, debido a la existencia de clones de T. cruzi con tiempos de duplicación cercanos a las 220 horas (90). Los límites inferiores dados por la presente correlación se encuentran mejor definidos y concuerdan con las tasas más altas de crecimiento de epimastigotes de cultivo de cepas de T. cruzi comunicadas hasta el presente, que oscilan en las 20 horas. A pesar de las limitaciones de la presente correlación es la primera vez, a mi conocimiento, que se establece una correlación entre las tasas de crecimiento de los dos estadios multiplicativos de T. cruzi.

Un factor relevante que corrobora la heterogenicidad existente en cepas de Trypanosoma cruzi se evidenció como resultado del análisis del contenido total de DNA por parásito de los distintos clones. El desarrollo de la Técnica de Citometría por Flujo Laminar ha permitido la rápida cuantificación de numerosos parámetros físico-químicos de células eucarióticas, con un alto nivel de precisión. Esta técnica ha sido utilizada para cuantificar diferencias intra específicas en el contenido de DNA por organismo de Acanthamoeba spp (99). Los datos presentados del análisis de DNA total por organismo de clones de T. cruzi, constituyen el primer estudio de un protozoo parásito realizado con esta tecnología. Se encontraron sorprendentes diferencias en el contenido de DNA total/parásito entre los clones Miranda y CA-I. Considerando la totalidad de los dos grupos de clones la

diferencia en el contenido de DNA/parásito entre clones es superior al 20%. En contraste, las diferencias en el DNA total entre fibroblastos humanos que presentan genotipos 45, XO y 49, XXXXY son de sólo un 9,5%. El estudio de un mayor número de clones de T. cruzi, con respecto al contenido total de DNA/parásito, reveló diferencias superiores al 40% (79). La magnitud de las diferencias intraespecíficas en contenido total de DNA-parásito encontradas en subpoblaciones de T. cruzi es del mismo orden que la de diferencias interespecíficas encontradas en *Acanthamoeba* spp. La presencia del clon Miranda/78 con un contenido total de DNA/organismo significativamente menor que la media del grupo Miranda permite inferir la coexistencia de subpoblaciones en poblaciones de T. cruzi, utilizando el contenido total de DNA/organismo como parámetro de caracterización. El análisis por microespectrofluorimetría de cuatro de los clones estudiados permitió confirmar las diferencias encontradas en el contenido total de DNA-parásito mediante la utilización de la Técnica de Citometría por Flujo Laminar. La utilización de microespectrofluorimetría permitió establecer que las diferencias interclonales de DNA total se deben a diferencias en contenido de DNA tanto del núcleo como del kineoplasto. Estas diferencias en el contenido de DNA, tanto mitocondrial como nuclear, implican que el contenido de DNA en ambas estructuras es variable en Trypanosoma cruzi. Sin embargo, la mayor contribución a estas diferencias en DNA total/

parásito se debería al DNA nuclear que comprende aproximadamente el 70 a 80% del DNA total del organismo, por lo cual potencialmente la diversidad genética en T. cruzi puede ser muy grande. Las diferencias interclonales de T. cruzi con respecto al contenido de DNA total-organismo son estables e independientes del estadio evolutivo de los parásitos y de la posición de los mismos en la fase de crecimiento del ciclo celular. La existencia de diferencias cuantitativas en el contenido de DNA/organismo en la especie T. cruzi parece deberse a variaciones discretas, indicando que no serían debidas a poliploidía. El análisis de DNA total/organismo utilizando Citometría por Flujo Laminar no permite discriminar entre distintos tipos de DNA. Sin embargo, independientemente del hecho de que las diferencias en el contenido de DNA total se deban a DNA funcional o estructural, estas diferencias pueden ser usadas para identificar poblaciones de T. cruzi. Desconocemos totalmente el origen de estas diferencias en el contenido de DNA total en subpoblaciones de T. cruzi, así como su significado biológico. Hasta el presente, la ausencia de correlación entre el contenido total de DNA/ organismo y otros parámetros estudiados no han permitido dilucidar el significado biológico de estas diferencias. Sin embargo, el hallazgo de diferencias de esta magnitud en contenido de DNA total en este protozoo, en el cual no se conoce intercambio genético es indicativo de la heterogenicidad exis-

tente en T. cruzi y plantea la posibilidad de la existencia de divergencia evolutiva entre sus poblaciones.

Es un hecho conocido que los tripomastigotes transferidos a medios de cultivo a 26-28°C o los naturalmente ingeridos por un vector, sufren una transformación a amastigotes, los cuales después de multiplicarse durante un cierto período de tiempo se transforman a su vez en epimastigotes, siendo esta última forma la que eventualmente predomina. Este fenómeno ha sido observado tanto con tripomastigotes sanguíneos y metacíclicos (49,50) como por tripomastigotes obtenidos a partir de cultivo de tejidos. El lapso transcurrido hasta la transformación en epimastigotes de las formas amastigotes de cultivo es diferente para distintas cepas de T. cruzi (49). La literatura publicada con respecto a este fenómeno se limita a la observación morfológica del mismo. La utilización de poblaciones homogéneas de parásitos ha permitido desarrollar un protocolo experimental que posibilita el mantenimiento de la forma intracelular del parásito en medio axénico durante tiempo indefinido. La caracterización de los amastigotes de cultivo permitió comprender su cinética de crecimiento, claramente distinta de la de epimastigotes bajo las mismas condiciones de cultivo. La fase de crecimiento exponencial de un cultivo de epimastigotes está condicionada por la depleción de nutrientes y la acumula-

ción de catabolitos producidos por los organismos. Por lo tanto, el número de generaciones en la fase exponencial de un cultivo estático de epimastigotes está influenciado por la concentración inicial de organismos. Por el contrario, los amastigotes presentan una fase exponencial durante la cual el número de parásitos se cuadruplica, lo que representa aproximadamente 2 generaciones. Este fenómeno fue independiente de las concentraciones iniciales de parásitos estudiadas. En consecuencia, la concentración máxima final resultante del desarrollo exponencial es directamente proporcional al inóculo inicial. Esta cinética de crecimiento indica que el desarrollo de los amastigotes no estaría condicionado por el medio de cultivo, sino regulado por características intrínsecas de los amastigotes. Una vez finalizada la etapa de crecimiento de los amastigotes se produce la transformación de este estadio evolutivo en epimastigote. Este fenómeno se desencadena aparentemente en ausencia de un estímulo externo; en cambio, la reiniciación de la fase de crecimiento de los amastigotes sería la respuesta a un estímulo externo, en este caso el cambio de medio de cultivo. La transformación de los amastigotes intracelulares a tripomastigotes y la transformación de los amastigotes extracelulares a epimastigotes indicarían la pluripotencialidad de este estadio de T. cruzi. Una vez producida la transformación de los amastigotes en epimastigotes, la fase multiplicativa subsecuente de estos últimos fue variable en cuanto al tiempo de duplicación de los parásitos y

a su duración total. Sin embargo, estos epimastigotes transferidos a un medio de cultivo fresco no mostraron diferencias de crecimiento con respecto a epimastigotes en crecimiento exponencial, lo que sugiere que la variabilidad observada podría deberse a cambios producidos en las condiciones del cultivo.

El análisis de los perfiles de DNA total/organismo de la población durante la evolución de cultivos de amastigotes, reveló una variación continua de la proporción de organismos en G1, S y G2. El pasaje de una parte de las células originalmente en G1 a la fase S, durante las primeras horas de evolución del cultivo, indicaría la ausencia de un período lag, a diferencia de lo que ocurre en el ciclo intracelular de T. cruzi. En este último caso, el período lag se debe por lo menos en parte a la transformación del tripomastigote en amastigote (100). La variación secuencial de las proporciones de la población en las distintas fases G1, S y G2 del ciclo celular demuestra la existencia de una sincronía parcial durante el primer ciclo celular (101). Esta sincronía es menos evidente durante el segundo ciclo celular. Una vez completado el mismo, los organismos permanecen arrestados en G1, produciéndose la transformación en epimastigotes. Se desconocen las razones que inducen a los amastigotes arrestados en G1 a continuar el ciclo como consecuencia del cambio de medio de cultivo. A priori, esta estimulación presenta similitudes con métodos utilizados para sincronizar cultivos de bacterias y levaduras mediante la inanición de los mismos y el posterior agregado

de medio nutritivo (91). Este método también se utiliza para sincronizar cultivos de células de mamíferos con buenos resultados cuando se deplecionan del medio algunos componentes claves, como por ejemplo, isoleucina y glutamina (91). Generalmente, el primer ciclo celular posterior a la adición de nutrientes específicos es más prolongado que el ciclo normal debido a un aumento de la duración del período G1 ó a la existencia de un período lag, hecho que no pudo ser demostrado para los amastigotes de cultivo. Si alguno de los metabolitos del medio de cultivo utilizado fuese limitante para el desarrollo de los amastigotes, sería factible observar variaciones del número de generaciones según el inóculo inicial de parásitos. Este fenómeno parece en cambio sugerir que el arresto de los amastigotes en la fase G1 del ciclo replicativo, después de transcurridas dos generaciones, se puede deber a la ausencia de una "proteína iniciadora" de la síntesis de DNA, o sea a un mecanismo de regulación interna (102). Por lo tanto, el cambio de medio de cultivo estimularía la síntesis de esta "proteína iniciadora". Aunque los amastigotes de cultivo y los amastigotes intracelulares difieren con respecto al número de generaciones, es posible que el mecanismo que regula los ciclos celulares y la posterior diferenciación sean similares. Por lo tanto, los amastigotes de cultivo podrían ser utilizados como modelo, no sólo para el conocimiento de mecanismos básicos en Biología Celular, sino también para el estudio de drogas tripanomicidas que alte-

ren o bloqueen el ciclo celular o la transformación de T. cruzi, interrumpiendo de esta manera el ciclo de vida del parásito en el huésped mamífero. A pesar de que se requiere una mayor caracterización y comparación de los amastigotes intracelulares y extracelulares, el hecho de que ambos sean resistentes a la acción lítica por activación del complemento por vía indirecta, sumado a la demostración de que ambos tipos de amastigotes no presentan afinidad por un anticuerpo monoclonal (102) que se une a epimastigotes del clon Miranda/80, constituyen pruebas indirectas de la existencia de homologías entre ambos tipos de amastigotes. Por lo tanto, se podría disponer de una fuente de alta producción de amastigotes "in vitro" en un sistema libre de contaminación por células o restos celulares del huésped mamífero.

La demostración de la heterogenicidad existente en poblaciones de T. cruzi, mediante la caracterización de 19 clones, tiene aplicación directa en los estudios básicos y aplicados de la enfermedad de Chagas. Es evidente que en toda enfermedad parasitaria la relación huésped-parásito va a estar definida por las características genéticas tanto del huésped como del parásito. Históricamente, se han utilizado cepas de T. cruzi para estudiar los mecanismos involucrados en la infección por este tripanosoma. Hoy sabemos que las cepas de T. cruzi pueden ser poblaciones heterogéneas y los resultados observados ser posiblemente el producto de la integración de las respuestas resultantes de la relación establecida entre el huésped y cada una de las sub-

poblaciones de parásitos con las cuales está infectado. El solo hecho de la existencia de subpoblaciones de parásitos con ciclos intracelulares de distinta duración permite presumir esta hipótesis. No es difícil suponer que parásitos con una alta tasa de reproducción en el huésped vertebrado puedan inducir una respuesta distinta que parásitos con una baja tasa de reproducción en el huésped. Si concomitantemente consideramos otros parámetros en los cuales se han demostrado diferencias entre clones de T. cruzi, como ser: la habilidad de infectar células de mamíferos (95), que podría indicar diferencias en los receptores presentes en el parásito responsables del reconocimiento y penetración de la célula huésped, o bien diferencias antigénicas, demostradas tanto por técnicas inmunolectroforéticas (104) como mediante la utilización de anticuerpos monoclonales (102), que tienen implicancias directas con respecto a la respuesta inmunológica del huésped (105), se concluye que el nivel de complejidad existente en una cepa impide analizar las causas de la diversidad de manifestaciones que caracterizan a la enfermedad de Chagas. Los clones de T. cruzi, al presentar un fondo genético homogéneo, constituyen un modelo ideal para el análisis de la relación huésped-parásito. En parte, esta aseveración ha sido demostrada por estudios realizados "in vivo" con dos clones de T. cruzi provenientes del mismo origen inoculados en ratones endocriados, uno de los cuales produce una infección aguda fatal mientras que el otro produce una infección no letal(106). Extrapolando estos datos experimentales se podría

asumir que existen en el hombre subpoblaciones de T. cruzi responsables de la infección aguda y otras de la infección crónica sin fase de infección aguda prepatente, dependiendo de las características genéticas de la población presente en el paciente. Un razonamiento similar podría utilizarse para justificar la existencia de individuos asintomáticos y sintomáticos infectados por T. cruzi. Lógicamente, sería un razonamiento simplista atribuir la diversidad de manifestaciones de la enfermedad de Chagas exclusivamente a características genéticas del parásito, pero indudablemente un mayor conocimiento del rol que cumple la heterogenicidad inter e intra-poblacional de T. cruzi es fundamental para develar la relación huésped-parásito en la enfermedad de Chagas.

Los datos expuestos en este Trabajo de Tesis tienen, además, un valor práctico en el estudio de drogas tripanomicidas. Por ejemplo, de drogas cuya acción sea específica en algún punto del ciclo celular. En una población en crecimiento asincrónico, la droga será efectiva cuando todos los individuos de esa población hallan alcanzado la zona del ciclo celular en que la droga actúa. Esto implica que los niveles de droga deben ser mantenidos durante lapsos suficientes como para permitir a la totalidad de los parásitos recorrer el ciclo celular y alcanzar el sitio de acción de la droga. Por lo tanto, la duración del tratamiento estará en relación directa con la duración del ciclo celular. Las diferencias observadas en las tasas de desarro-

llo de clones de T. cruzi permiten inferir que las poblaciones con ciclos celulares cortos serán rápidamente afectadas por la droga, en cambio es posible que los niveles suministrados y la duración del tratamiento sean insuficientes para eliminar subpoblaciones de T. cruzi con bajas tasas de desarrollo. La correlación hallada entre los tiempos de duplicación de epimastigotes y de amastigotes intracelulares permiten realizar evaluaciones de drogas utilizando epimastigotes de cultivo y extrapolar los datos para las formas intracelulares del parásito. La evaluación final de una droga tripanomicida debe realizarse teniendo también en cuenta la posibilidad de la existencia de diferencias en la susceptibilidad de distintas subpoblaciones de T. cruzi. Una evidencia de esta presunción se puede inferir de la obtención experimental de una cepa de T. cruzi resistente al Lampit (107).

Las evidencias que avalan la meta propuesta en este Trabajo de Tesis de verificar la hipótesis de la existencia de poblaciones heterogéneas de T. cruzi en pacientes naturalmente infectados son, a nuestro parecer, concluyentes. Asimismo, fue posible demostrar que cepas de T. cruzi mantenidas bajo condiciones de laboratorio pueden conservar un determinado grado de heterogenicidad.

La utilización de clones de T. cruzi abre la posibilidad de comprender la magnitud y complejidad de la heterogenicidad presente en esta especie y su significado e importancia en la enfermedad de Chagas.



BIBLIOGRAFIA

1. Chagas C.
Nova Tripanosomiasis Humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, N. Gen., N. Sp., agente etiológico da nova entidade mórbida do homen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1: 159-219. 1909.
2. Acha P.N. and Szyfres B.
Parasitic zoonoses and communicable diseases common to man and animals.
Pan American Health Organization. Publication 354. 1980.
3. Fifth Annual Report. 1 July 1980-30 June 1981.
Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. UNDP/World Bank/WHO.
4. Hoare C.A.
The classification of mammalian trypanosomes.
Ergebn. Mikrobiol., 39: 43-63. 1966.
5. Dias E.
Estudos sobre o Schizotrypanum cruzi.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 28: 1-110. 1934.
6. Brack C.
Elektronmikroskopische untersuchungen zum lebenszyklus vov Trypanosoma cruzi. Unter besonderes berucksichtigung der entwicklungsformen im ubertrager Rhodnius prolixus.
Acta Tropica, 25: 289-356. 1968.
7. Alvarenga N.J.
Evolucao do Trypanosoma cruzi no trato digestivo de Triatoma infestans.
Tese, 55p
Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. 1977.

8. Zeledón R.
Los vectores de la Enfermedad de Chagas en América.
Simp. Inter. sobre Enf. de Chagas.
Buenos Aires, Diciembre, 327-345. 1972
9. Mazza S.
Comprobaciones de Triatoma platensis, Eutriatoma oswaldoi,
Pastrongylus seai y Psammolestes coreodes en la provincia
de Santiago del Estero, todas ellas sin infestación y de
Eutriatoma sordida con infestación por S. cruzi. Otros da-
tos sobre infestación esquizotripanósica natural silvestre
de Triatoma infestans.
Prensa Médica Argentina, 30: 1583-1590. 1943
10. Jorg M.E.
Límite Sud de la dispersión geográfica de Triatoma infestans
y su infestación por Trypanosoma cruzi en Argentina.
Primeras Jorn.Entomoepid.Argentinas 1: 157-162. 1959.
11. Wood S.F.
Importance of feeding and defecation times of insect vectors
in transmission of Chagas'Disease.
J. Econ. Entomol., 44: 52-54. 1951.
12. Brener Z.
A new aspect of Trypanosoma cruzi life cycle in the invertebra
host.
J. Protozool., 19: 23-27. 1972.
13. Adler S.
The action of specific serum on a strain of Trypanosoma cruzi.
Ann. Trop. Med. Parasitol., 52: 282-301. 1958.

14. Cerisola J.A., Rohwedder R.W. y Prado del C.E.
Rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica humana utilizando ninfas de diferentes especies de Triatomíneos.
Bol. Chil. Parasitol., 26: 57-58. 1971.
15. Zeledón R.
Host-parasite relationship in the vector.
Symposium on New Approaches in American Trypanosomiasis Research.
Ed. Pan American Health Organization.p. 9-13. 1976.
16. Romaña C.
Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la Enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral. (Hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad).
MEPRA, 22; 16-28. 1935.
17. Barreto M.P.
Reservorios do Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, Chagas, 1909.
Simp. Intern. sobre Enfermedad de Chagas
Buenos Aires, Diciembre, 357-370. 1972.
18. Mazza S. y Miyara S.S.
Sobre el hallazgo de un nuevo edentado, huésped natural de Schizotrypanum cruzi en la Provincia de Mendoza.
MEPRA, 22: 11-16. 1935.
19. Mazza S.
Frecuencia e importancia de la infección natural de perros y gatos por T. cruzi y la cuestión de la herencia del mismo

en los primeros animales.

Novena Reunión de la Soc. Arg. Patol., 1: 412-417. 1935.

20. Koberle R.

Chagas'Disease and Chagas'Syndromes: the pathology of
American Trypanosomiasis.

Adv. Parasitol., 6: 63-116. 1968.

21. Andrade Z.A. y Andrade S.G.

Patología en Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.

Ed. Brener, Zigman and Andrade, Zilton.

Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, pp. 214-248. 1979.

22. Chagas C.

Tripanosomiase Americana: forma aguda da molestia.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 8(2): 37-60. 1916.

23. Lugones H.S., Ledesma O.S., Peralta F.A., Marteleu A.E.A.,
Vozza P., Falendy S.Z. y Barbieri G.

Enfermedad de Chagas

Anales Nestlé 132: 124-135. 1979.

24. Mazza S.

La Enfermedad de Chagas en la República Argentina

Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 47: 273-288. 1949.

25. Amorim D.S., Manço J.C., Gallo L. y Marín Neto J.A.

Clínica: forma crónica cardíaca. Cap. 8, p.256.

En: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Ed. Brener Z.,
Andrade Z.

Guanabara Koogan S.A., Brazil. 1979.

26. Rezende J.M.
Clínica: Manifestações Digestivas. Cap. 9. p. 312.
En: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Ed. Brener Z.,
Andrade Z. Guanabara Koogan S.A., Brazil. 1979.
27. Cerisola J.A., Alvarez M. y Rissio A.M.
Imunodiagnostico da doença de Chagas. Evolução serológica
de pacientes com Doença de Chagas.
Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 12: 403-411. 1970.
28. Vatuone N.H., Szarfman A. y González-Cappa S.M.
Antibody response and immunoglobulin levels in humans with
acute or chronic Trypanosoma cruzi infections (Chagas'Disease).
J. Trop. Med. Hyg., 76: 45-47. 1973.
29. Pizzi T.
Inmunología de la Enfermedad de Chagas.
Universidad de Chile, Santiago. pp. 39. 1957.
30. Trischmann T.M. and Bloom B.R.
Genetics of murine resistance to Trypanosoma cruzi.
Infect. Immunol., 35: 546-551. 1982.
31. Laguens R.P., Cabeza Meckert P., Basombrio M.A., Chambó
G.J., Cossio P.M., Arana R.M. y Gelpi R.
Infección crónica del ratón con Trypanosoma cruzi. Modelo
experimental de Enfermedad de Chagas.
Medicina, 40 (supl.1) 33-39. 1980.
32. Bijovsky A.T., Elizari M.V., Muller L.A., Katzin V.J. and
González-Cappa S.M.
Chronic infection in mice with Trypanosoma cruzi
Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 2: 207-214. 1983.

33. Perlowagora-Szumlewiçs A.P.
Laboratory colonies of Triatominae. Biology and population dynamics in: New approaches in American Trypanosomiasis Research.
Pan. Am. Health Org., Sc. Publ. Ner. 318, p. 63-82. 1976.
34. Taylor A.E.R. and Baker J.A.
The cultivation of parasites "in vitro".
Blackwell Scientific Publications. 1968.
35. Camargo E.P.
Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media.
Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 6: 93-100. 1964.
36. Chiari E.
Growth and differentiation of Trypanosoma cruzi culture forms kept in laboratory for different periods of time.
Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 16: 81-87. 1974.
37. Castellani O., Ribeiro L.V., Fernández J.F.
Differentiation of Trypanosoma cruzi in culture.
J. of Protozool., 14: 447-451. 1967
38. Crane M.St.J. and Dvorak J.A.
Trypanosoma cruzi: Spontaneous transformation by a Y strain variant in liquid medium.
Experimental Parasitol., 54: 87-92. 1982.
39. Lastha L.G.
On the concept of the cell cycle
J. Cell Comp. Physiol., 62: 143-144. 1963.

40. Kofoid C., Wood F. and McNeil E.
The cycle of Trypanosoma cruzi in tissue culture of embryonic heart muscle.
University of California. Publications in Zoology, 41: 23-24. 1935.
41. Dvorak J.A. and Stotler W.A.
Controlled-environment culture system for high resolution light microscopy.
Experimental Cell Research, 68: 144-148. 1971.
42. Dvorak J.A. and Hyde T.P.
Trypanosoma cruzi: Interaction with vertebrate cells "in vitro"
I, Individual interaction at the cellular and subcellular levels.
Experimental Parasitology, 34: 268-283. 1973.
43. Nogueira N. and Cohn Z.
Trypanosoma cruzi: Mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells.
J. Exp. Medicine, 143: 1402-1420. 1976.
44. Olabuenaga S.E., Cardoni R.L., Segura E.L., Riera N.E., de Bracco M.M.E.
Antibody-dependent cytolysis of Trypanosoma cruzi by human polymorphonuclear leucocytes.
Cell Immunol., 45: 85. 1979.
45. Gutteridge W.E., Cover B. and Gaborak M.
Isolation of blood and intracellular forms of Trypanosoma cruzi from rats and other rodents and preliminary studies of their metabolism.
Parasitology, 76: 159-176. 1978.

46. Carvalho R.M.G., Meirelles M.N.L., de Souza W. and Leon W.
Isolation of the intracellular stage of Trypanosoma cruzi
and its interaction with mouse macrophages "in vitro".
Infect. Immunol., 33: 546-554. 1981.
47. Gutteridge W.E., Gaborak M.
A re-examination of purine and pyrimidine synthesis in the
three main forms of Trypanosoma cruzi.
Int. J. Biochem., 10: 415-422. 1959.
48. Araujo F.G. and Remington J.S.
Characterization of stages and strains of Trypanosoma cruzi
by analysis of cell membrane components.
J. of Immunol., 127: 855-859. 1981.
49. Brener Z., Chiari E.
Aspects of early growth of different Trypanosoma cruzi strains
in culture medium.
J. Parasitol., 51: 922-926. 1965.
50. Kimura E., Lay W.H. and Fernandes J.F.
Extracellular "in vitro" evolution of metacyclic trypomasti-
gotes isolated from Trypanosoma cruzi cultures.
Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 20: 133-138. 1978.
51. Piras M.M., Henriquez D. y Piras R.
Transformación "in vitro" de tripomastigotes de Trypanosoma
cruzi en amastigotes extracelulares: cambios en la infecti-
vidad y efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas.
Acta Cient. Venezolana, 31 (Supl.1), 197. 1981.
52. Noble E.R.
The morphology and life cycles of trypanosomes.
Quart. Rev. Biol., 30: 1-28. 1955.

53. Pan S.C.
Cultivation of the leishmaniform stage of Trypanosoma cruzi in cell-free media at different temperatures.
American J. of Trop. Med. and Hygiene, 17: 823-832. 1968.
54. Pan S.C.
Trypanosoma cruzi: "in vitro" interactions between cultured amastigotes and human skin-muscle cells.
Experimental Parasitol. 45: 274-286. 1979.
55. Lanar D.E.
Growth and differentiation of Trypanosoma cruzi cultivated with a Triatoma infestans embryo cell line.
J. Protozool., 26: 457-462. 1979.
56. Villalta F. and Kierszenbaum F.
Growth of isolated amastigotes of Trypanosoma cruzi in cell-free medium.
J. Protozool., 29: 570-576. 1982.
57. Hoare C.A.
The Trypanosomes of Mammals.
Blackwell Scientific Publications. Oxford. 1972.
58. Taliaferro W.H. and Pizzi T.
Conective tissue reactions in normal and immunized mice to reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi.
J. Infect. Dis., 96: 199-227. 1955.
59. Brener Z.
Comparative studies of different strains of Trypanosoma cruzi
Ann. Trop. Med. Parasitol., 59: 19-26. 1965.

60. Watkins R.
Comparison of infection produced by two strains of Trypanosoma cruzi in mice.
J. Parasitol., 52: 958-961. 1966.
61. Brener Z.
The behavior of slender and stout forms of Trypanosoma cruzi in the blood stream of normal and immune mice.
Ann. Trop. Med. Parasitol., 63: 215-220. 1969.
62. Bice D.E. and Zeledón R.
Comparison of infectivity of strains of Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909).
J. Parasitol., 56: 663-670. 1970.
63. Andrade S.G.
Tentative for grouping different Trypanosoma cruzi strains in some types.
Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 18: 140-141. 1976.
64. Melo R.C. and Brener Z.
Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains.
J. Parasitol., 64: 475-482. 1980.
65. Miles M.A., Souza A., Pova M., Shaw J.J., Lainson R., Toye P.J.
Isozymic heterogeneity of Trypanosoma cruzi in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil.
Nature, 272: 819-821. 1978.
66. Morel C., Chiari E., Camargo E.P., Mattei D.M., Romanha A.J. Simpson L.
Strains and clones of Trypanosoma cruzi can be characterized

by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 77: 6810-6814. 1980.

67. Luban N.A., Dvorak J.A.
Trypanosoma cruzi: Interaction with vertebrate cells in vitro. III. Selection for biological characteristics following intracellular passage.
Experimental Parasitology, 36: 143-149. 1974.
68. Romanha A.J., da Silva Pereira, A.A., Chiari E., Kilgour U.
Isoenzyme patterns of cultured Trypanosoma cruzi: changes after prolonged subculture.
Comp. Biochem. Physiol., 62: 139-142. 1979.
69. Lambrecht F.L.
Biological variations in Trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' Disease.
Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 7: 346-352. 1965.
70. González-Cappa S.M., Chiale P., del Prado G.E., Katzin A.M., de Martini G.W., de Isola E.D., Orrego L.A. y Segura E.L.
Aislamiento de una cepa de Trypanosoma cruzi de un paciente con miocarditis chagásica crónica y su caracterización biológica.
Medicina, 40: 63-68. 1980.
71. Silveira F.T., Días M.G., Pardal P.P., de Oliveira Lobão A., de Britto Melo G.
Mono, caso autóctone de Doença de Chagas registrado no Estado do Pará, Brazil (Nota previa)
Hileia Med. Belém, 1: 61-62. 1979.

72. Van Meirvenne N., Janssens P.G. and Magnus E.
Antigenic variation in syringe passaged populations of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei. I. Rationalization of the experimental approach.
Ann. Soc. Belge Med. Trop., 55: 1-23. 1975.
73. White G.F.
Production of sterile maggots for surgical use (abstract)
Journal of Parasitol., 18: 133. 1932.
74. Boné G.J. and Steinert M.
Isotopes incorporated in the nucleic acids of Trypanosoma mega.
Nature, 178: 308-309. 1956.
75. Moore E., Gerner R. and Franklin A.
Culture of normal human leukocytes.
J. Am. Med. Assoc., 199: 519-524. 1967.
76. Pizzi T.
Inmunología de la Enfermedad de Chagas.
Universidad de Chile, Santiago, p.37. 1957.
77. Fisher R.A.
Statistical methods for research workers.
(Oliver and Boyd, Edinburg, 1934).
78. Melamed M.R., Mullaney P.F. and Mendelsohn M.L., Eds.
Flow Cytometry and Sorting.
John Wiley and Sons., New York. 1979.
79. Dvorak J.A., Hall T.E., Crane M.St.J., Engel J.C., Mac Daniel J.P. and Uriegas R.

Trypanosoma cruzi: Flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence.

J. Protozool., 29: 430-437. 1982.

80. Crissman H.A. and Tobey R.A.
Cell cycle analysis in 20 minutes.
Science, 184: 1297-1298. 1974.
81. Ward D.C., Reich E., Goldberg I.H.
Base specificity in the interaction of polynucleotides with antibiotic drugs.
Science, 149: 1259-1263. 1965.
82. Rabinovitch P.S., O'Brien K, Simpson M., Callis S.B., Hoehn H.
Flow cytogenetics. II. High-resolution ploidy measurements in human fibroblastic cultures.
Cytogenet. Cell. Genet., 29: 65-76. 1981.
83. Howard A. and Pelc S.R.
Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage.
Heredity, Lond., 6: 261-273. 1953.
84. Mitchison J.M.
The biology of the cell cycle.
Cambridge University Press, London. 1971.
85. Hoare C.A. and Wallace F.G.
Developmental stages of Trypanosomatid Flagellates: a new terminology.
Nature, 212: 1385-1389. 1966

86. Chiari E.
Growth and differentiation of Trypanosoma cruzi culture forms kept in laboratory for different periods of time.
Rev. Inst.Med. Trop. São Paulo, 16: 81-87. 1974.
87. Nogueira N., Bianco C. and Cohn Z.
Studies on the selective lysis and purification of Trypanosoma cruzi.
J. Exp.Med.,142:224-229. 1975.
88. Rabinovich J.E., Leal J.A., Feliciangeli D.
Domiciliari biting frequency and blood ingestion of the Chagas' Disease vector Rhodnius prolixus Stal. in Venezuela.
Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.,73:272-283. 1979.
89. Silva L.H.P. y Nussenzweig V.
Sobre una cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco.
Folia Clin.Biol., 20:191-207. 1953.
90. Dvorak J.A., Hartman D.L. and Miles M.A.
Trypanosoma cruzi: Correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources.
J. Protozool., 27:472-474. 1980.
91. Prescott D.M.
Initiation of DNA synthesis and progression through the S period. Section III. The cell cycle. p. 355-364
Cell growth. Ed. Claudio Nicolini. Plenum Press, New York.1982.
92. Hanson and Roberson E.
Density of parasites in various organs and the relation to number of trypomastigotes in the blood during acute infections

- of Trypanosoma cruzi in mice.
J. Protozool., 21:512-517. 1974.
93. Dvorak J.A. and Howe C.L.
The attraction of Trypanosoma cruzi to vertebrate cells
in vitro.
J. Protozool., 24:534-537. 1976.
94. Hyde T.P. and Dvorak J.A.
Trypanosoma cruzi: Interaction with vertebrate cells in vitro.
II. Quantitative analysis of the penetration phase.
Experimental Parasitol., 34:284-294. 1973.
95. Doyle P.S., Dvorak J.A. and Engel J.C.
Trypanosoma cruzi: Quantification and analysis of the
infectivity of cloned stocks.
J. Protozool. (in press). 1983.
96. Dvorak J.A. and Schmuñis G.A.
Trypanosoma cruzi: Interaction with mouse peritoneal
macrophages.
Experimental Parasitology, 32:298-300. 1972.
97. Dvorak J.A. and Crane M.St.J.
Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites.
Science, 214:1034-1036. 1981.
98. Crane M.St.J. and Dvorak J.A.
Trypanosoma cruzi: Interaction with vertebrate cells. DNA
synthesis and growth of intracellular amastigotes and their
relationship to host DNA synthesis and growth.
J. Protozool., 26:599-604. 1979.

99. Coulson P.B. and Tyndall R.
Quantitation by Flow Microfluorometry of total
cellular DNA in *Acanthamoeba*.
J.Histochem.Cytochem., 26:713-718. 1978.
100. Crane M.St.J. and Dvorak J.A.
Trypanosoma cruzi: Pattern of RNA synthesis
following infection of vertebrate cells.
J.Protozool., 27:336-338. 1980.
101. Gray J.W., Dean P.N. and Mendelsohn M.L.
Quantitative cell-cycle analysis. Ch.21,p.399
In: *Flow Cytometry and Sorting*
Ed. Melamed M.R., Mullaney P.F. and Mendelsohn M.L.
John Wiley and Sons, New York. 1979.
102. Cooper S.
The continuum model: Application to G1 arrest
and G(o). Section III. The cell cycle, p.315-336
Cell Growth, Ed. Claudio Nicolini.
Plenum Press, New York. 1982.
103. Kirchhoff L.V., Engel J.C., Dvorak J.A. and Sher A.
Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* differ in
their expression of surface antigen identified by
a monoclonal antibody.
Mol.Biochem.Parasitol.(in press). 1983.
104. Bongertz V. and Dvorak J.A.
Trypanosoma cruzi: Antigenic analysis of cloned
stocks.
Am.J.Trop.Med.Hyg., 32:716-722. 1983.

105. Kuhn R.E.
Immunology of Trypanosoma cruzi infections.
Ch.3,p.138-161. Parasitic Diseases. Vol.1
Ed. J.H. Mansfield. Marcel Dekker Inc.
New York. 1981.
106. Postan M., Dvorak J.A. and Mc Daniel J.P.
Studies of Trypanosoma cruzi clones in inbred
mice. I. A comparison of the course of infection
of C3H/HEN- mice with two clones isolated from
a common source.
Am.J.Trop.Med.Hyg.,32: 497-706. 1983.
107. Dvorak J.A. and Howe C.L.
The effect of Lampit (Bayer 2502) on the inter-
action of Trypanosoma cruzi with vertebrate
cells 'in vitro'.
Am.J.Trop.Med.Hyg., 26:58-63. 1977.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARACTERIZACION DE CLONES DE TRYPANOSOMA CRUZI:
UN NUEVO ENFOQUE EN LA INVESTIGACION BASICA DE
LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

AUTOR: JUAN CARLOS ENGEL
DIRECTOR: DRA. ELSA L. SEGURA

INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO E INVESTIGACION DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS "DR. MARIO FATALA CHABEN".

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1816
v 2
Ej. 2

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Figura 1.1	1
Figura 1.2 (leyenda p.2)	3
Figura 2.01 (leyendas p.4)	5
Tabla 2.01A	6
Figura 2.02 (leyendas p.7)	8
Tabla 2.02A	9
Figura 2.03 (leyendas p.10)	11
Tabla 2.03A	12
Figura 2.04 (leyendas p.13)	14
Tabla 2.04A	15
Figura 2.05 (leyendas p.16)	17
Tabla 2.05A	18
Figura 2.06 (leyendas p.19)	20
Tabla 2.06A	21
Tabla 2.0B (leyendas p.22)	23
Figura 2.1	24
Tabla 2.1A	25
Tabla 2.1B	26
Figura 2.2	27
Tabla 2.2A	28
Tabla 2.2B	29
Figura 2.3	30
Tabla 2.3A	31
Tabla 2.3B	32
Figura 2.4	33
Tabla 2.4A	34
Tabla 2.4B	35
Figura 2.5	36
Tabla 2.5	37
Tabla 2.5B	38

Figura 2.6	39
Tabla 2.6A	40
Tabla 2.6B	41
Figura 2.7	42
Tabla 2.7A	43
Tabla 2.7B	44
Figura 2.8	45
Tabla 2.8A	46
Tabla 2.8B	47
Figura 2.9	48
Tabla 2.9A	49
Tabla 2.9B	50
Figura 2.10	51
Tabla 2.10A	52
Tabla 2.10B	53
Figura 2.11	54
Tabla 2.11A	55
Tabla 2.11B	56
Figura 2.12	57
Tabla 2.12A	58
Tabla 2.12B	59
Figura 2.13	60
Tabla 2.13A	61
Tabla 2.13B	62
Figura 2.14	63
Tabla 2.14A	64
Tabla 2.14B	65
Figura 2.15	66
Tabla 2.15A	67
Tabla 2.15B	68
Figura 2.16	69
Tabla 2.16A	70
Tabla 2.16B	71
Figura 2.17	72
Tabla 2.17A	73
Tabla 2.17B	74

Figura 2.18	75
Tabla 2.18A	76
Tabla 2.18B	77
Figura 2.19	78
Tabla 2.19A	79
Tabla 2.19B	80
Figura 2.20 (leyendas p.81)	82
Figura 2.21	83
Tablas 3.0A-3.19A (leyendas p.84)	85-104
Figura 3.1 (leyenda p.105)	106
Figura 4.1 (leyendas p.107)	108
Tabla 4.1	109
Tabla 4.1A	110
Tabla 4.1B	111
Figura 4.2 (leyendas p.112)	113
Tabla 4.2	114
Figura 4.3 (leyendas p.115)	116
Tabla 4.3	117
Tabla 4.3A	118
Tabla 4.3B	119
Figura 4.4 (leyendas p.120)	121
Tabla 4.4	122
Figura 4.5 (leyendas p.123)	124
Tabla 4.5	125
Tabla 4.5A	126
Tabla 4.5B	127
Figura 4.6 (leyendas p.128)	129
Tabla 4.6	130
Figura 4.7 (leyendas p.131)	132
Tabla 4.7	133
Tabla 4.7A	134
Tabla 4.7B	135
Figura 4.8 (leyendas p.136)	137
Tabla 4.8	138

Figura 4.9 (leyendas p.139)	140
Tabla 4.9	141
Tabla 4.9A	142
Tabla 4.9B	143
Tabla 4.10 (leyenda p.144)	145
Figura 4.11 (leyendas p.146)	147
Figura 4.11A	148
Figura 4.12 (leyendas p.149)	150
Figura 4.12A	151
Figura 5.1 (leyendas p.152)	153
Figura 5.2	154
Figura 5.3	155
Figura 5.4	156
Figura 6.1 (leyendas p.157)	158
Tabla 6.1A	159
Tabla 6.1B	160
Figura 6.2 (leyendas p.161)	162
Tabla 6.2A	163
Tabla 6.2B	164
Tabla 6.2C	165
Figura 6.3 (leyendas p.166)	167
Figura 6.4	168
Figura 6.5	169
Fotografía 1 (leyendas p.170)	171
Fotografía 2	172
Fotografía 3	173

FIG. 1.1 FLUJO LAMINAR DE CELULAS

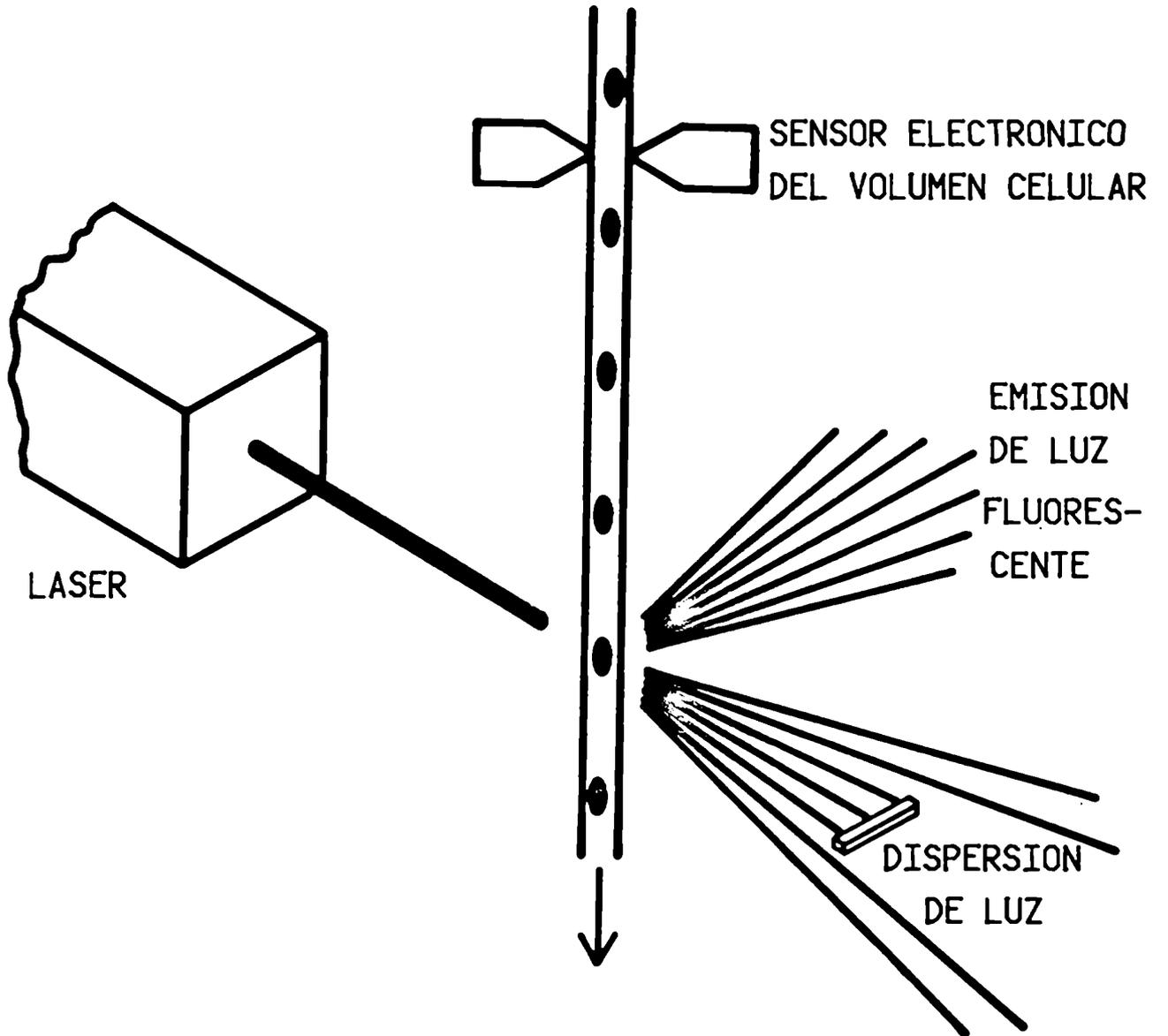


Figura 1.2. Cálculo del porcentaje de organismos en G1, S y G2 de una población de T. cruzi en medio de cultivo LIT a 26°C .

$$A \rightarrow B = \frac{1}{2} G1 = Y$$

$$B \rightarrow C = X$$

$$C \rightarrow D = \frac{1}{2} G2 = Z$$

$$Y+X+Z = M$$

$$2Y = G1$$

$$2Z = G2$$

$$M - (G1+G2) = S$$

FIG. 1.2 CALCULO DE G1, S Y G2 DE
EPIMASTIGOTES DE T. CRUZI EN FASE
EXPONENCIAL DE DESARROLLO

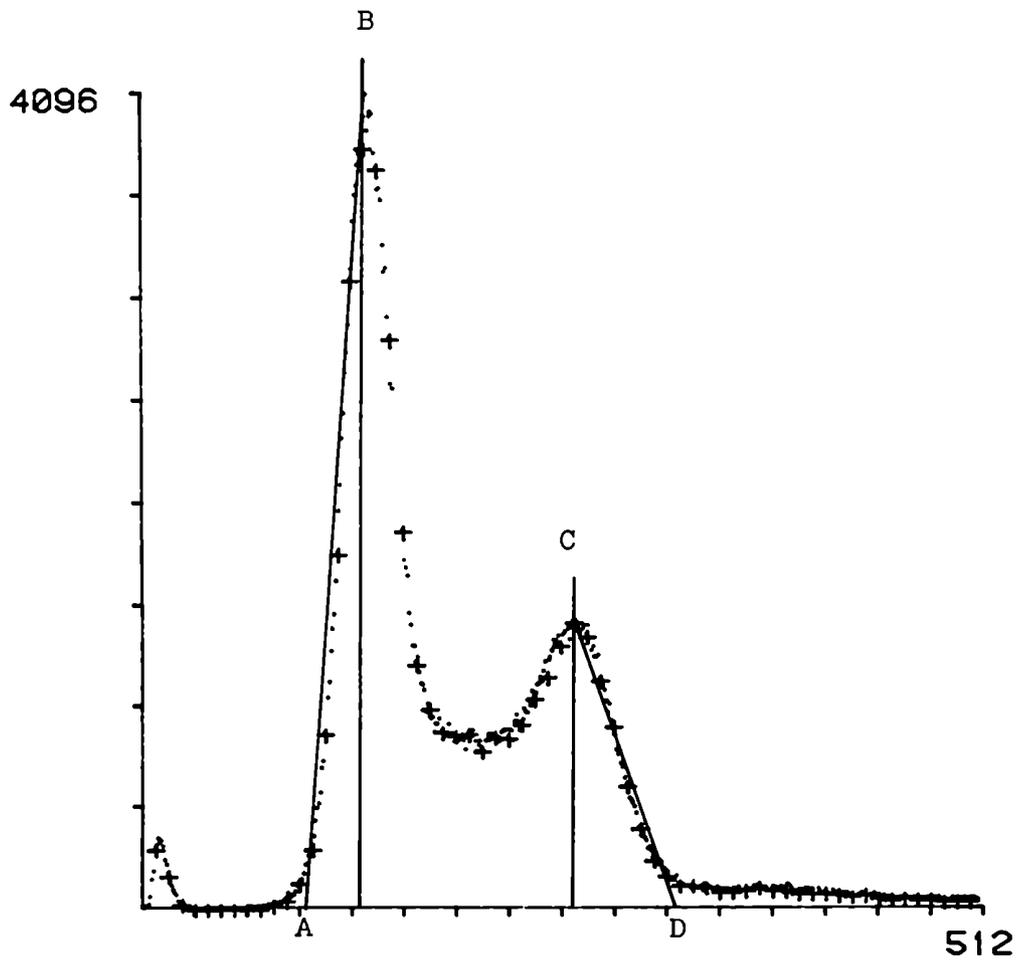
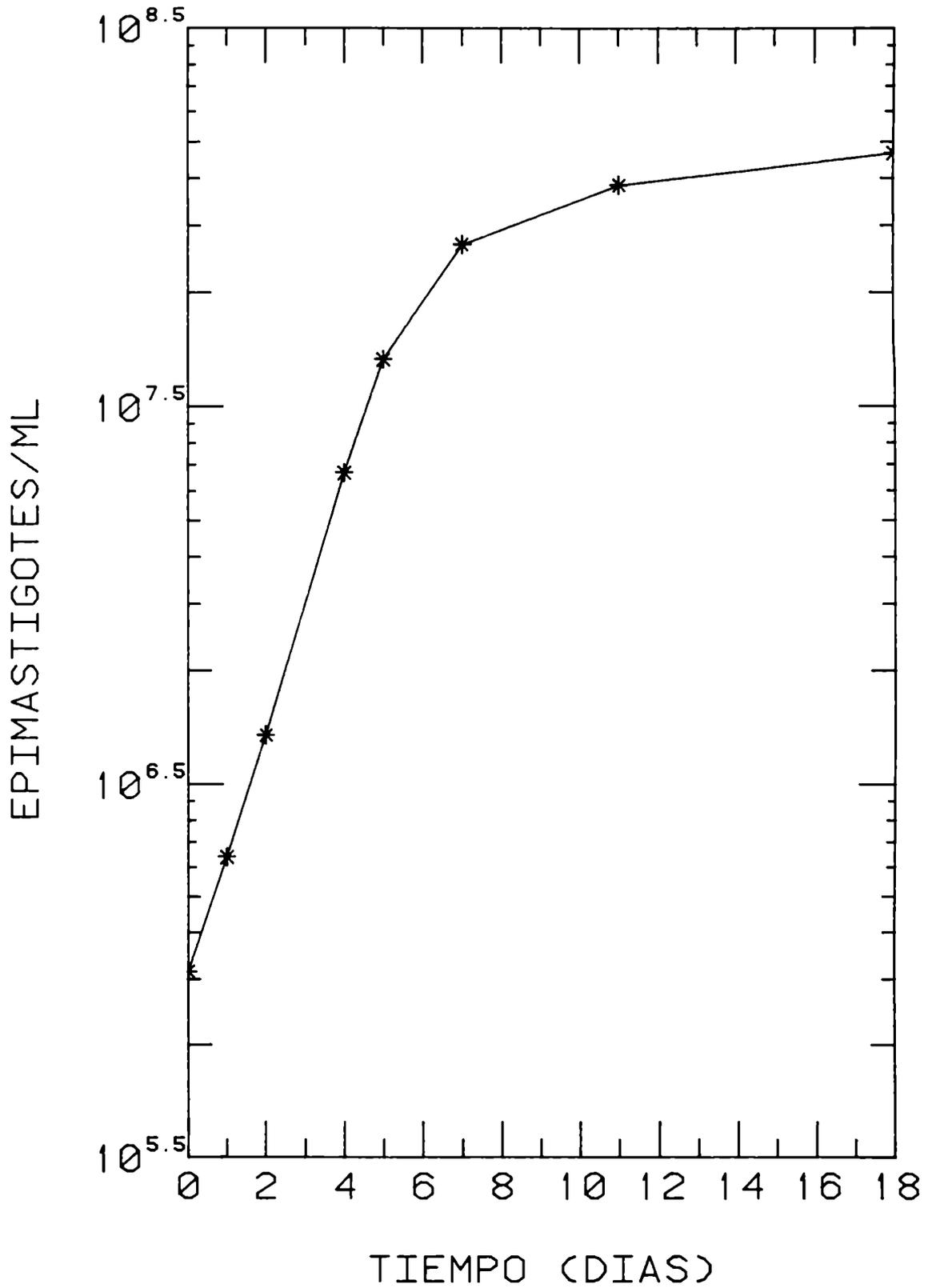


Figura 2.01. Representación gráfica del desarrollo de cultivos de epimastigotes de T. cruzi correspondientes a la cepa Tulahuen, generada a partir de los datos experimentales detallados en la Tabla 2.01 A.

Tabla 2.01 A. Se detalla el incremento de la concentración de epimastigotes/ml desde el día 0 hasta alcanzarse la fase estacionaria de crecimiento para la cepa Tulahuen. Los parásitos se cultivaron en medio LIT a 26°C.

FIG. 2 01 CEPA TULAHUEN



TIEMPO (DIAS)	CEPA TULAHUEN EPIMASTIGOTES/ML.
0	991600
1	2014700
2	4263000
4	21072800
5	41953000
7	84446000
11	120800000
18	147200000

Figura 2.02. Representación gráfica de la tasa de crecimiento de la cepa Tulahuen en fase de crecimiento exponencial, determinada a partir de la curva 2.01. Se determinó el tiempo de duplicación (T.D.) y el coeficiente de correlación de la curva (r).

Tabla 2.02 A. Variación temporal del número de epimastigotes/ml durante la fase de crecimiento exponencial de la cepa Tulahuen, determinada a partir de los datos expuestos precedentemente (Tabla 2.01 A).

.

FIG. 2.02 CEPA TULAHUEN

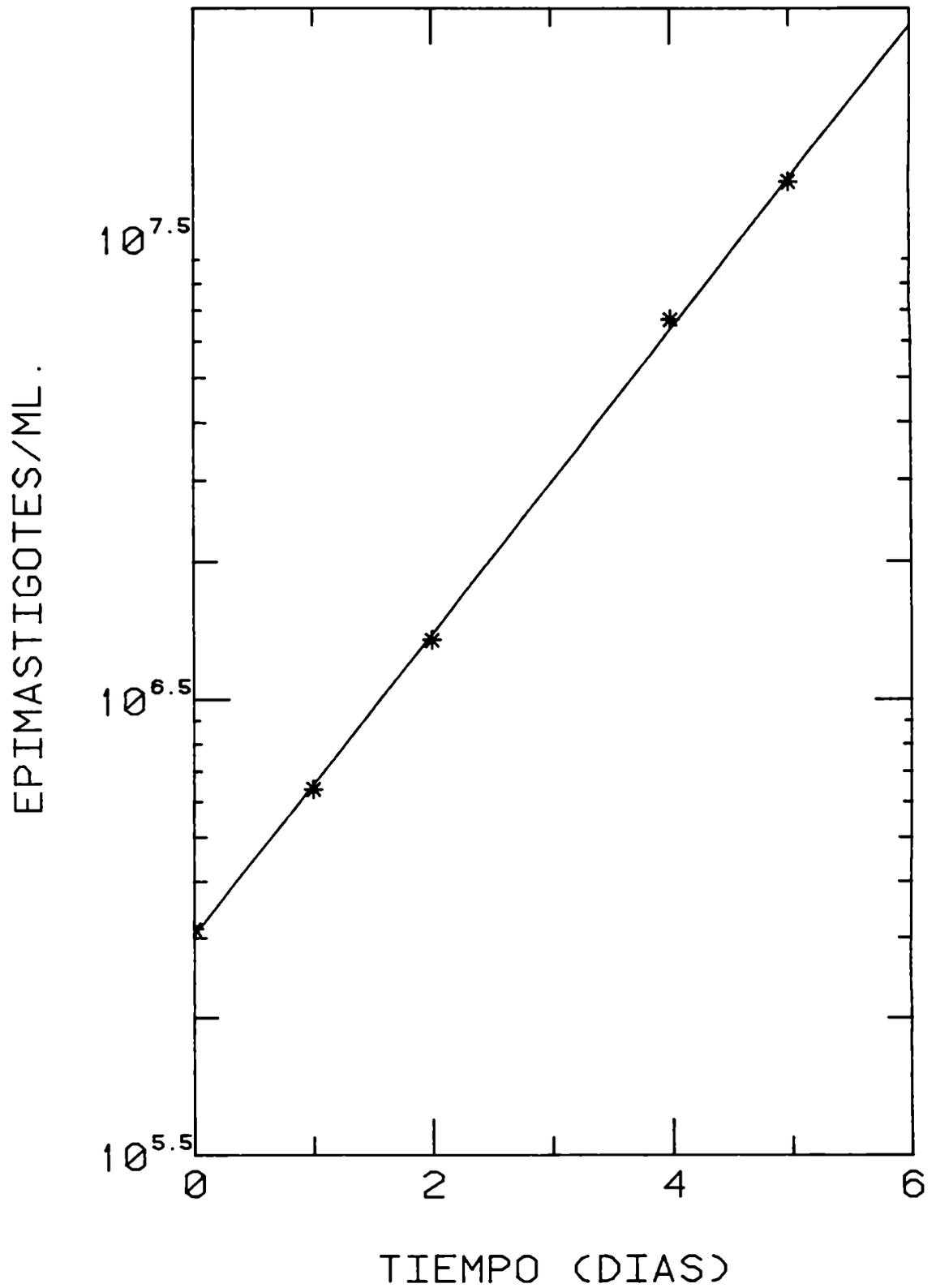


TABLA 2.02A CEPA TULAHUEN
TIEMPO (DIAS) EPIMASTIGOTES/ML.

0 991600

1 2014700

2 4263000

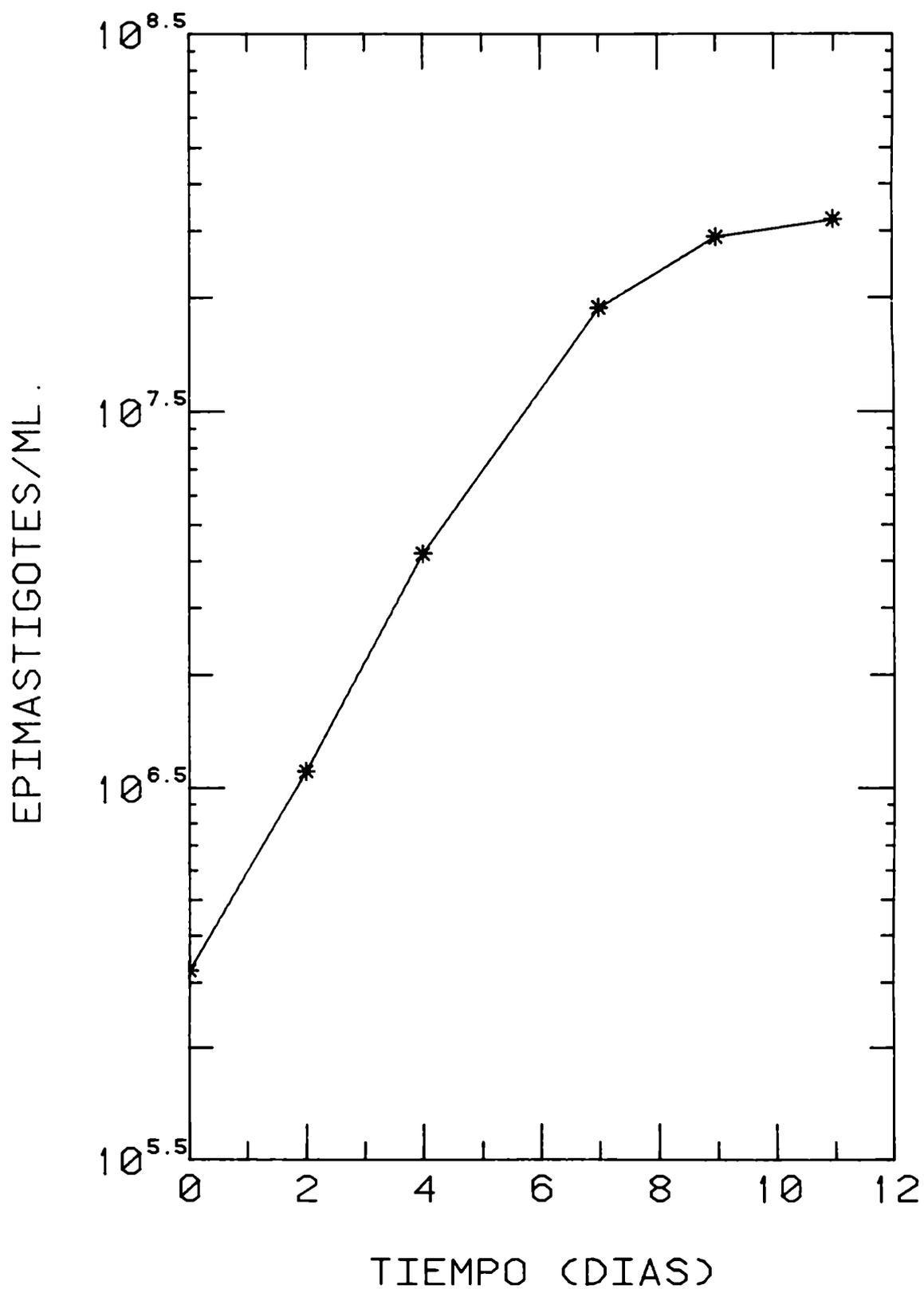
4 21072800

5 41953000

Figura 2.03. Representación gráfica del desarrollo de cultivos de epimastigotes de T. cruzi correspondientes al clon CA-I/69 de T. cruzi, generada a partir de los datos experimentales detallados en la Tabla 2.03 A.

Tabla 2.03 A. Se detalla el incremento de la concentración de epimastigotes/ml desde el día 0 hasta alcanzarse la fase estacionaria de crecimiento para el clon CA-I/69. Los parásitos se cultivaron en medio LIT a 26°C.

FIG. 2.03 CLON CA-I/69

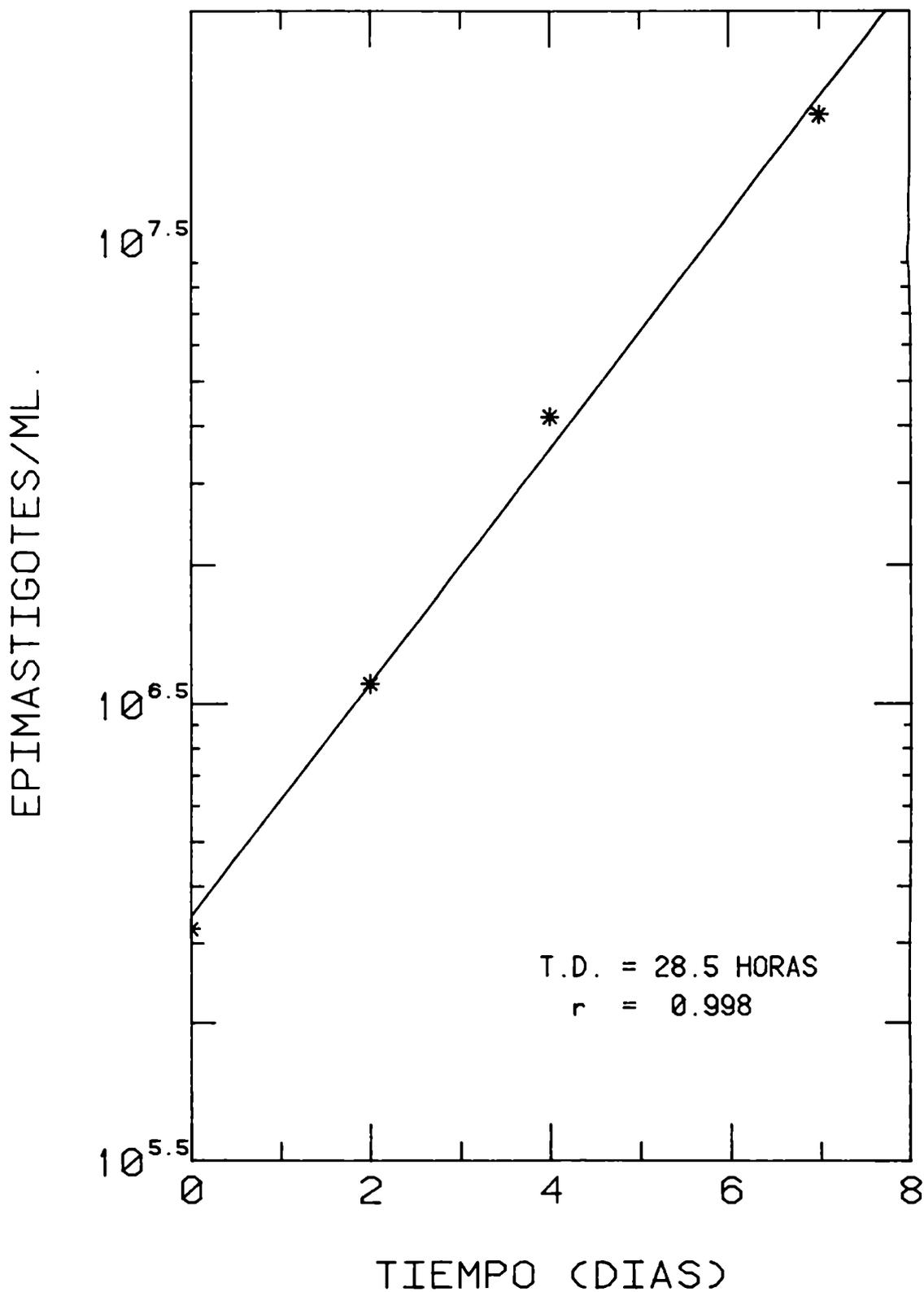


TIEMPO (DIAS)	CLON CA-I/69	EPIMASTIGOTES/ML.
0		1019400
2		3492500
4		13211200
7		59424000
9		91476000
11		101908000

Figura 2.04. Representación gráfica de la tasa de crecimiento del clon CA-I/69 en fase de crecimiento exponencial, determinada a partir de la curva 2.03. Se determinó el tiempo de duplicación (T.D.) y el coeficiente de correlación de la curva (r).

Tabla 2.04 A. Variación temporal del número de epimastigotes/ml durante la fase de crecimiento exponencial del clon CA-I/69, determinada a partir de los datos expuestos precedentemente (Tabla 2.03 A).

FIG. 2.04 CLON CA-I/69



TIEMPO (DIAS)	CLON CA-I/69 EPIMASTIGOTES/ML.
0	1019400
2	3492500
4	13211200
7	59424000

Figura 2.05. Representación gráfica del desarrollo de cultivos de epimastigotes de T. cruzi correspondientes al clon Miranda/84, generada a partir de los datos experimentales detallados en la Tabla 2.05 A.

Tabla 2.05 A. Se detalla el incremento de la concentración de epimastigotes/ml desde el día 0 hasta alcanzarse la fase estacionaria de crecimiento para el clon Miranda/84. Los parásitos se cultivaron en medio LIT a 26°C.

FIG. 2.05 CLON MIRANDA/84

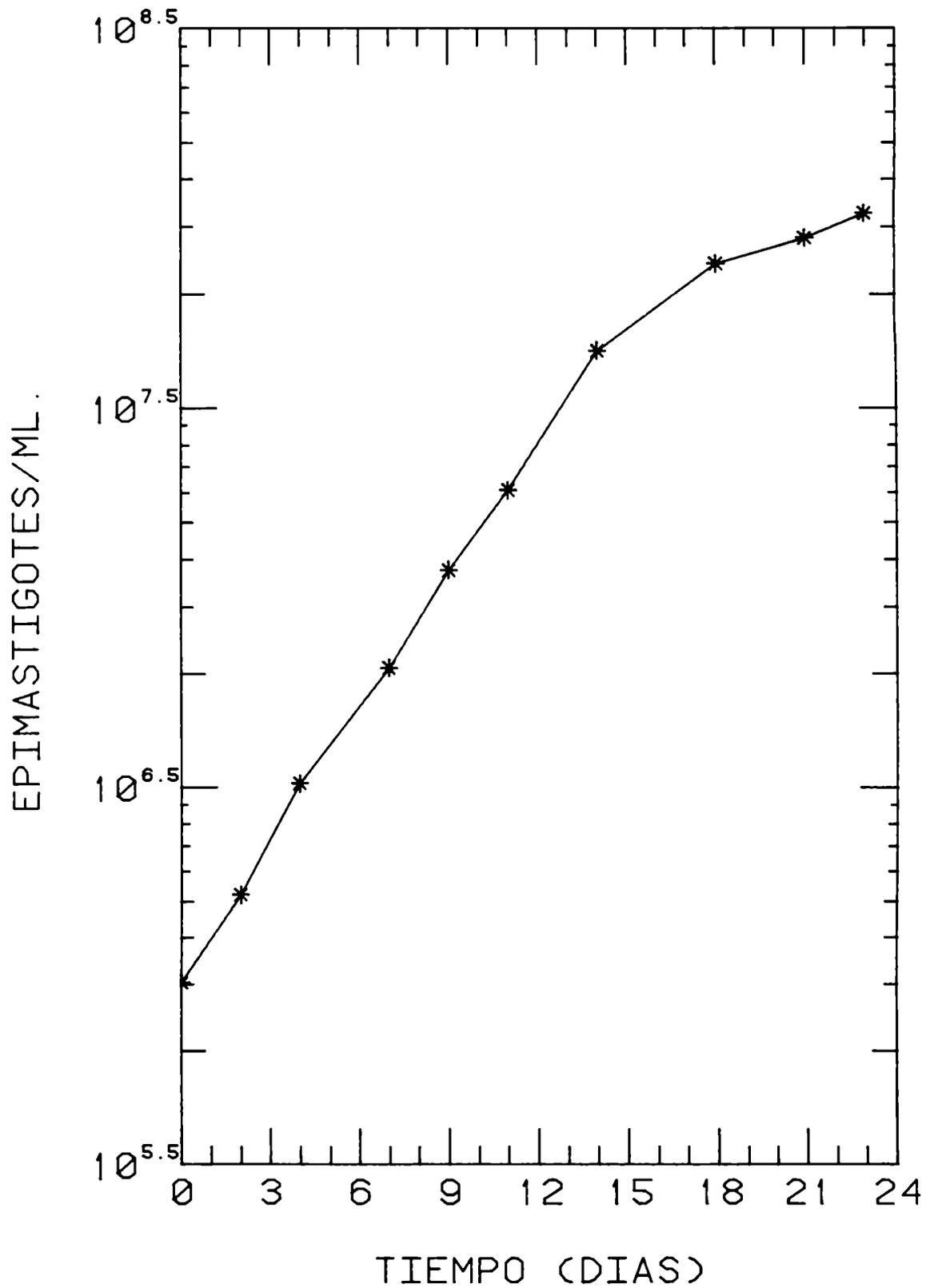


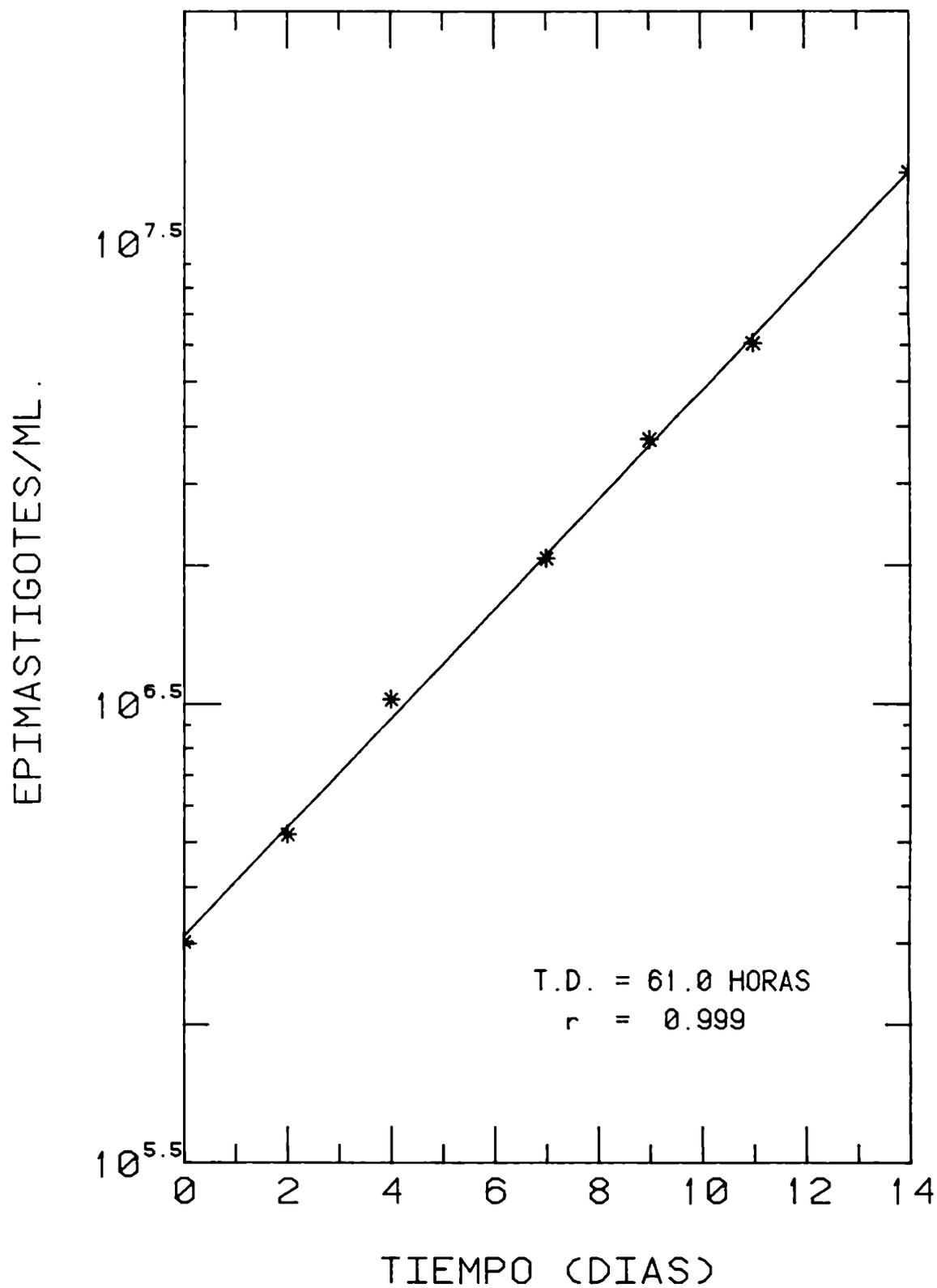
TABLA 2.05A CLON MIRANDA/84
TIEMPO (DIAS) EPIMASTIGOTES/ML.

0	958600
2	1642520
4	3234900
7	6542900
9	11833200
11	19165600
14	44720000
18	75824000
21	88874000
23	103064000

Figura 2.06. Representación gráfica de la tasa de crecimiento del clon Miranda/84 en fase de crecimiento exponencial, determinada a partir de la curva 2.05. Se determinó el tiempo de duplicación (T.D.) y el coeficiente de correlación de la curva (r).

Tabla 2.06 A. Variación temporal del número de epimastigotes/ml durante la fase de crecimiento exponencial del clon Miranda/84 (ver Tabla 2.05 A).

FIG. 2.06 CLON MIRANDA/84



TIEMPO (DIAS)	CLON MIRANDA/84 EPIMASTIGOTES/ML .
0	958600
2	1642520
4	3234900
7	6542900
9	11833200
11	19165600
14	44720000

Figuras 2.1-2.19. Representación gráfica de las tasas de crecimiento exponencial de epimastigotes de 19 clones de T. cruzi. Se indican el tiempo de duplicación (en horas), y el coeficiente de correlación (r) de la curva teórica con respecto a los valores experimentales.

Tablas 2.1 A-2.19 A. Representación de la variación temporal de la concentración de epimastigotes/ml durante la fase de crecimiento exponencial de 19 clones de T. cruzi en medio LIT a 26°C.

Tablas 2.0 B-2.19 B. Expresan los tiempos de duplicación (en horas) obtenidos del análisis individual de las curvas de crecimiento de 19 clones y de la cepa Tulahuen de T. cruzi, en medio LIT a 26°C, así como los tiempos de duplicación medios y los respectivos errores standard.

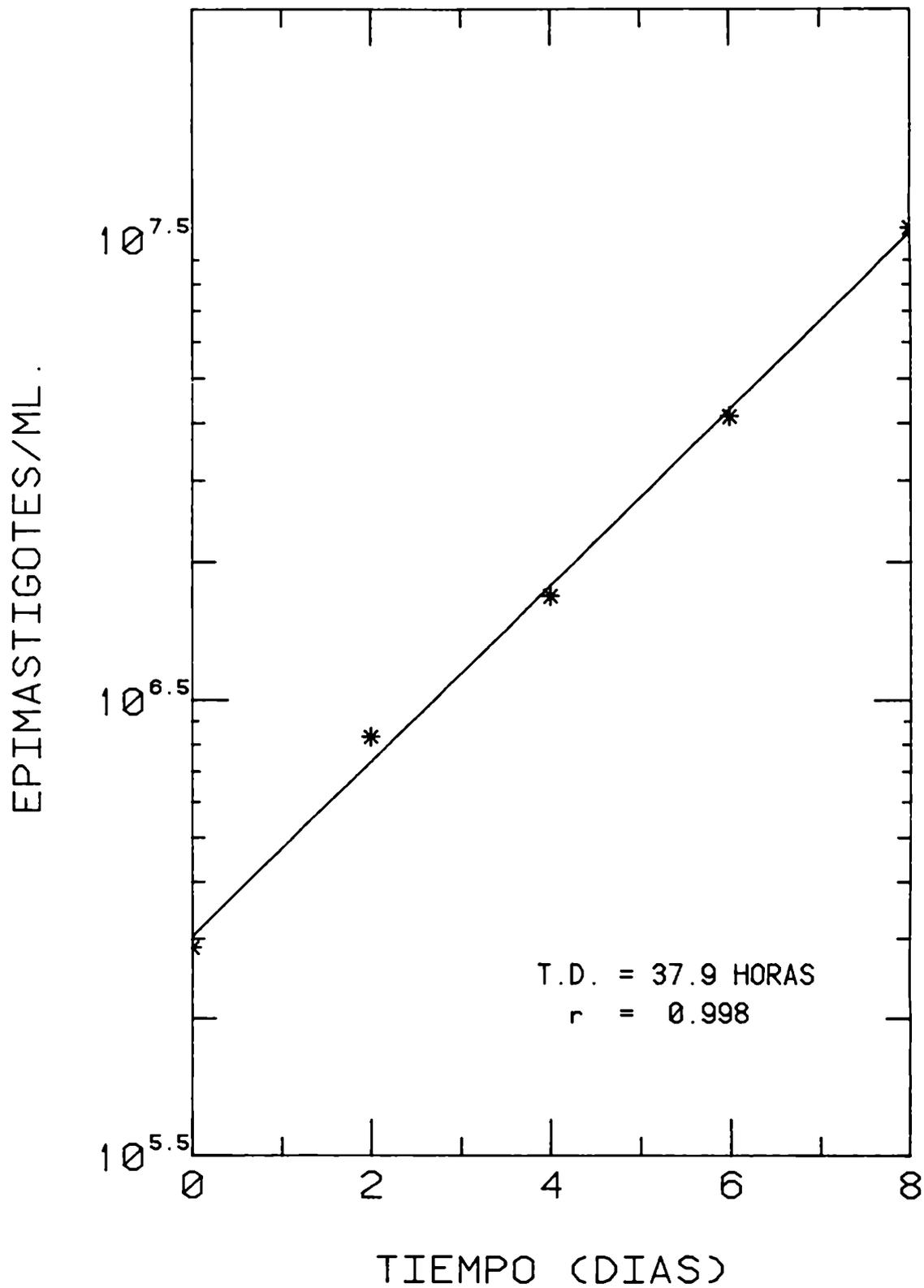
TABLA 2.0B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DE LA CEPA TULAHUEN

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	25.9
2	27
3	26.1
4	25.8
5	23
6	23.3

T.D. MEDIA = 25.2 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.667

FIG. 2.1 CLON CA-I/59



TIEMPO (DIAS)	CLON CA-I/59 EPIMASTIGOTES/ML.
0	905920
2	2630600
4	5321700
6	13089600
8	33508200

TABLA 2.1B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON CA-I/59

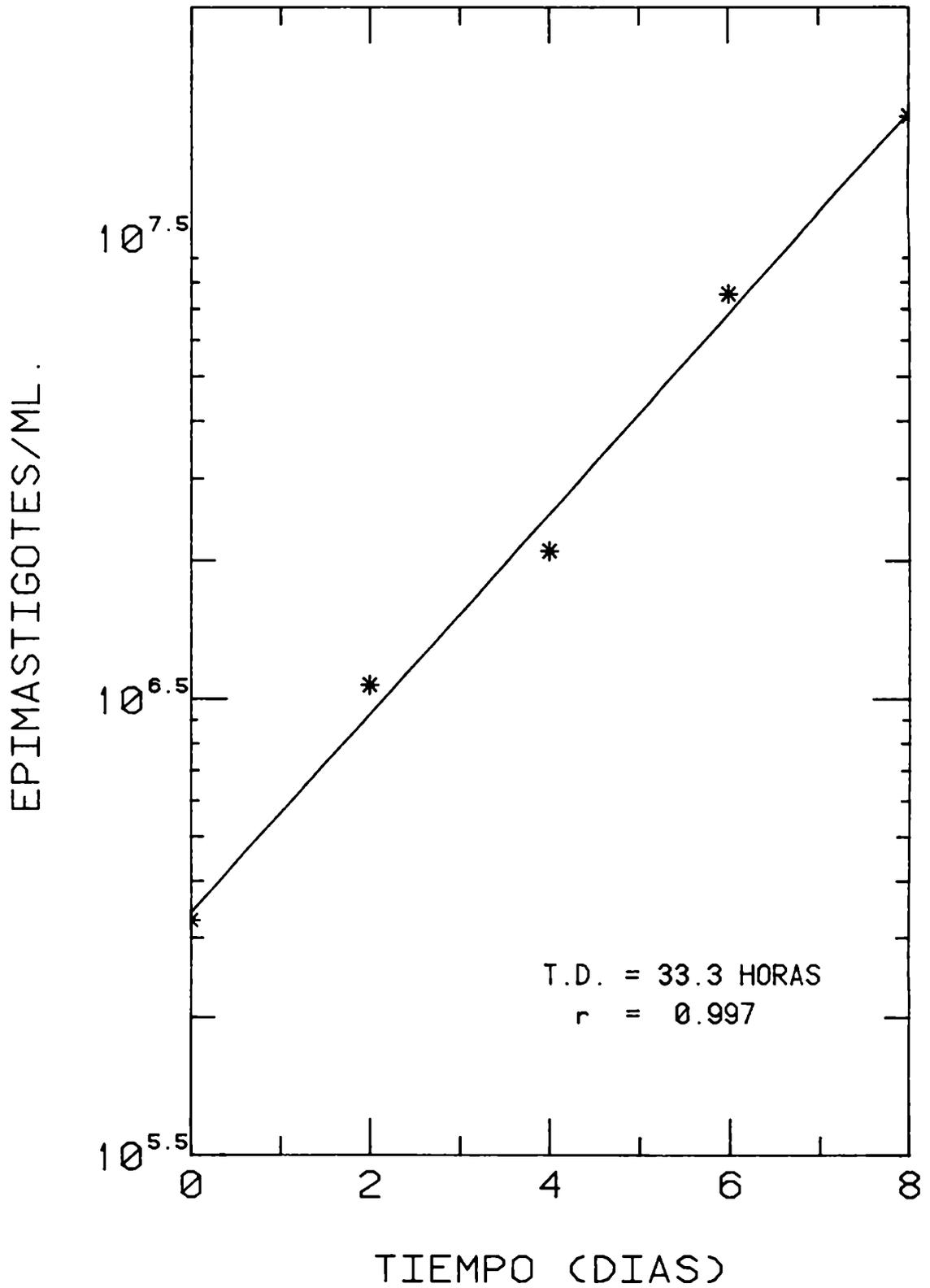
TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	41.8
2	44
3	56.5
4	47.2
5	51.7
6	37.9
7	36.9

T.D. MEDIA = 45.14 HORAS
ERROR ESTANDARD = 36.9

FIG. 2.2

CLON CA-I/64



TIEMPO (DIAS)	CLON CA-I/64 EPIMASTIGOTES/ML.
0	1035840
2	3390760
4	6614800
6	23820400
8	57788000

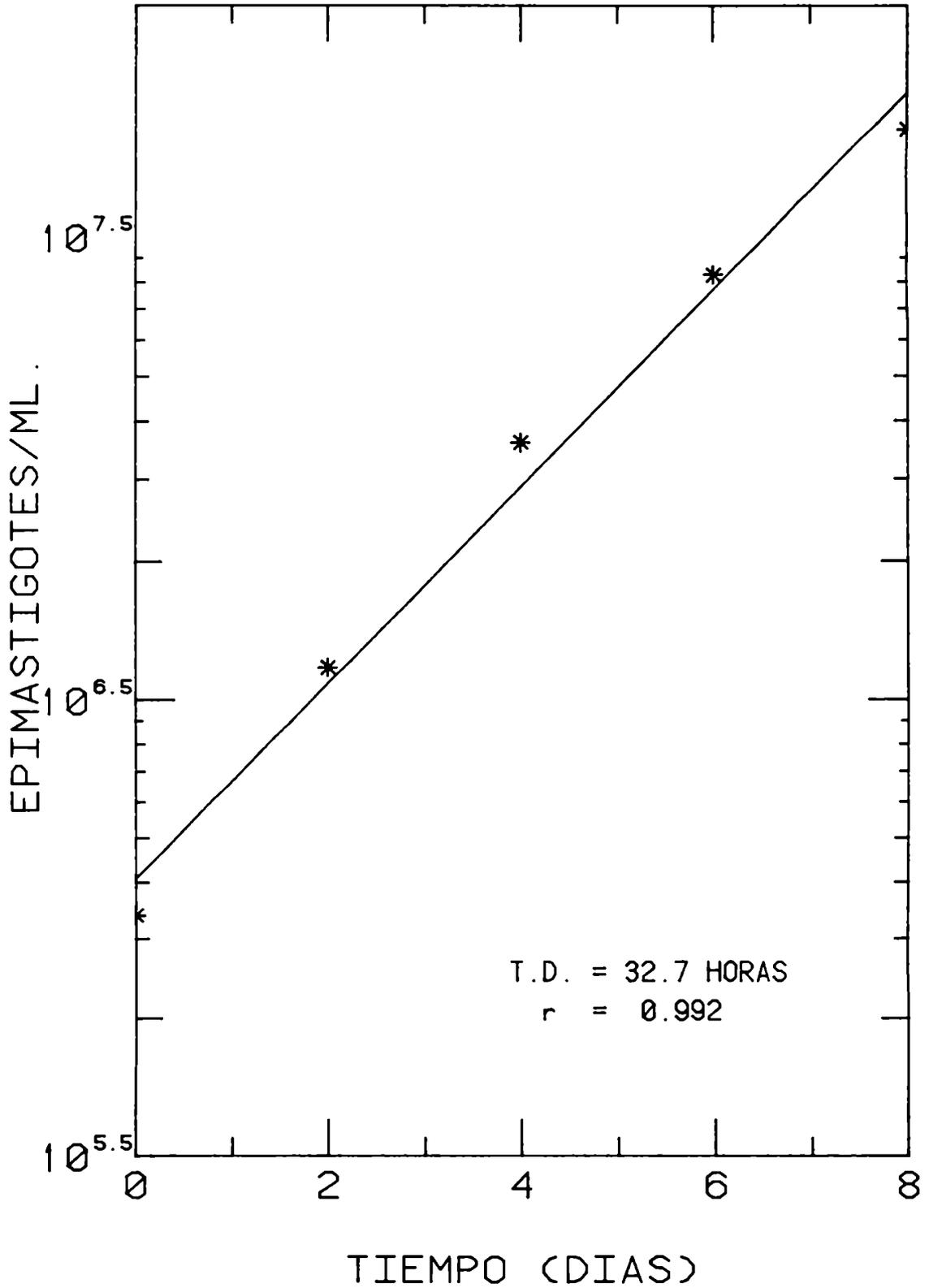
TABLA 2.2B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON CA-/64

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	30.1
2	28.2
3	30.3
4	30.4
5	33.3
6	33.6

T.D. MEDIA = 30.98 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.848

FIG. 2.3 CLON CA-I/65



TIEMPO (DIAS)	CLON CA-I/65 EPIMASTIGOTES/ML.
0	1068360
2	3715240
4	11352800
6	26101000
8	53826000

TABLA 2.3B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON CA-I/65

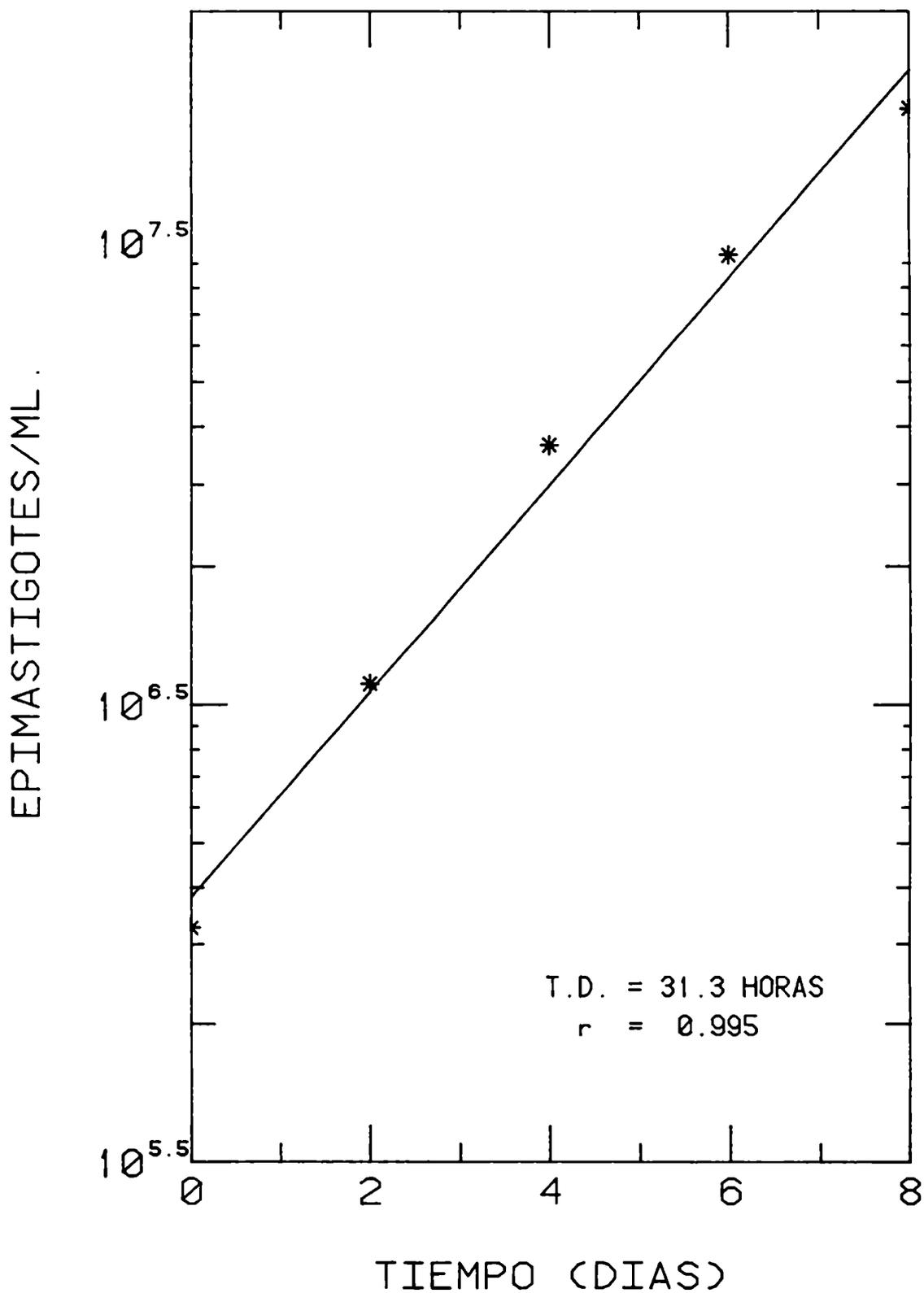
TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	30.4
2	29.6
3	30.9
4	31.9
5	31
6	32.7

T.D. MEDIA = 31.08 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.447

FIG. 2.4

CLON CA-I/67



TIEMPO (DIAS)	CLON CA-I/67 EPIMASTIGOTES/ML.
0	1030360
2	3508880
4	11529200
6	29667400
8	61426000

TABLA 2.4B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON CA-I/67

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	31.3
2	30.5
3	30
4	28.8
5	29.5

T.D. MEDIA = 30.02 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.426

FIG. 2.5

CLON CA-I/69

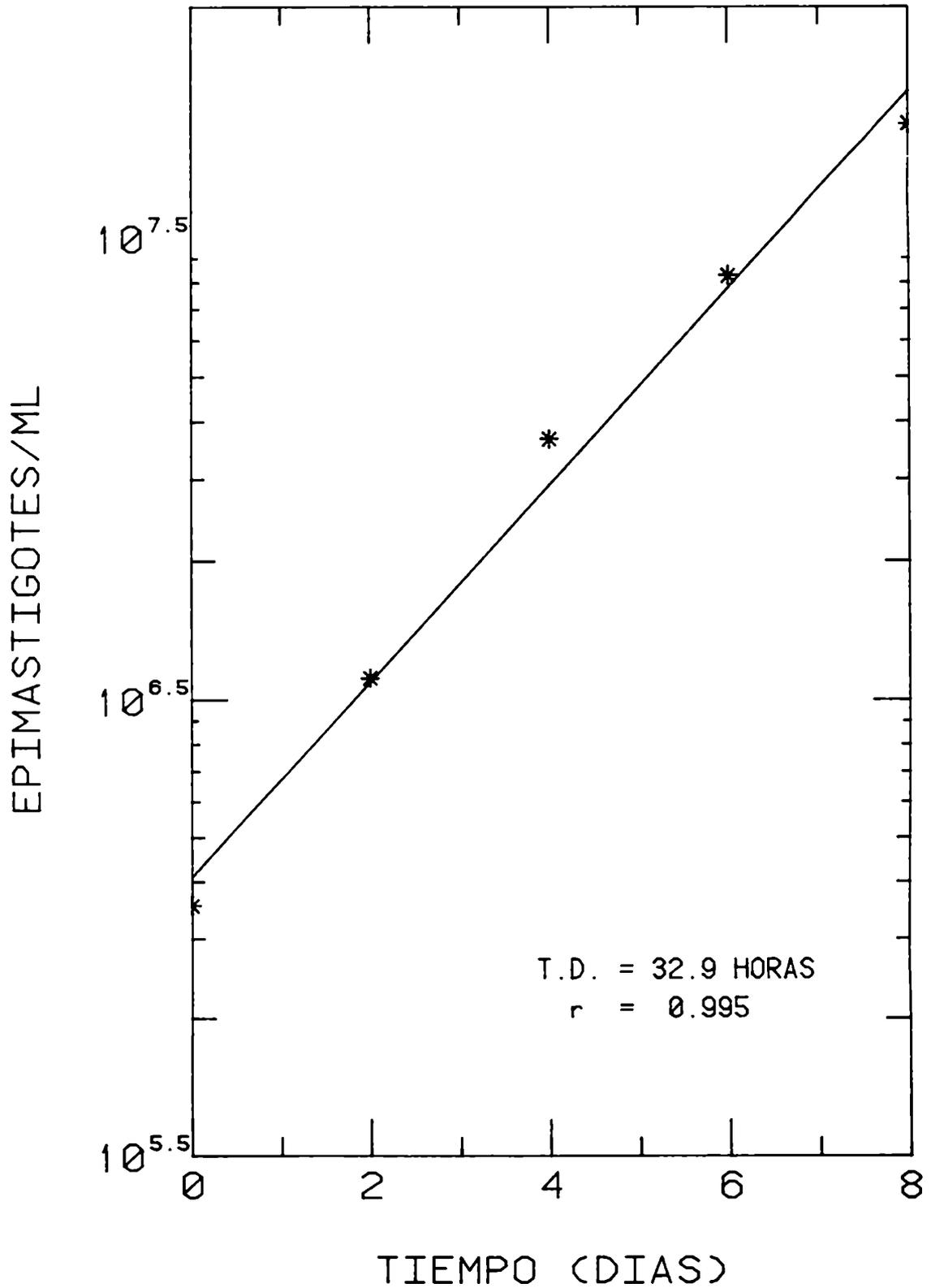


TABLA 2.5A	CLON CA-I/69
TIEMPO (DIAS)	EPIMASTIGOTES/ML.
0	1119440
2	3523960
4	11587000
6	26113600
8	55676000

TABLA 2.5B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON CA-I/69

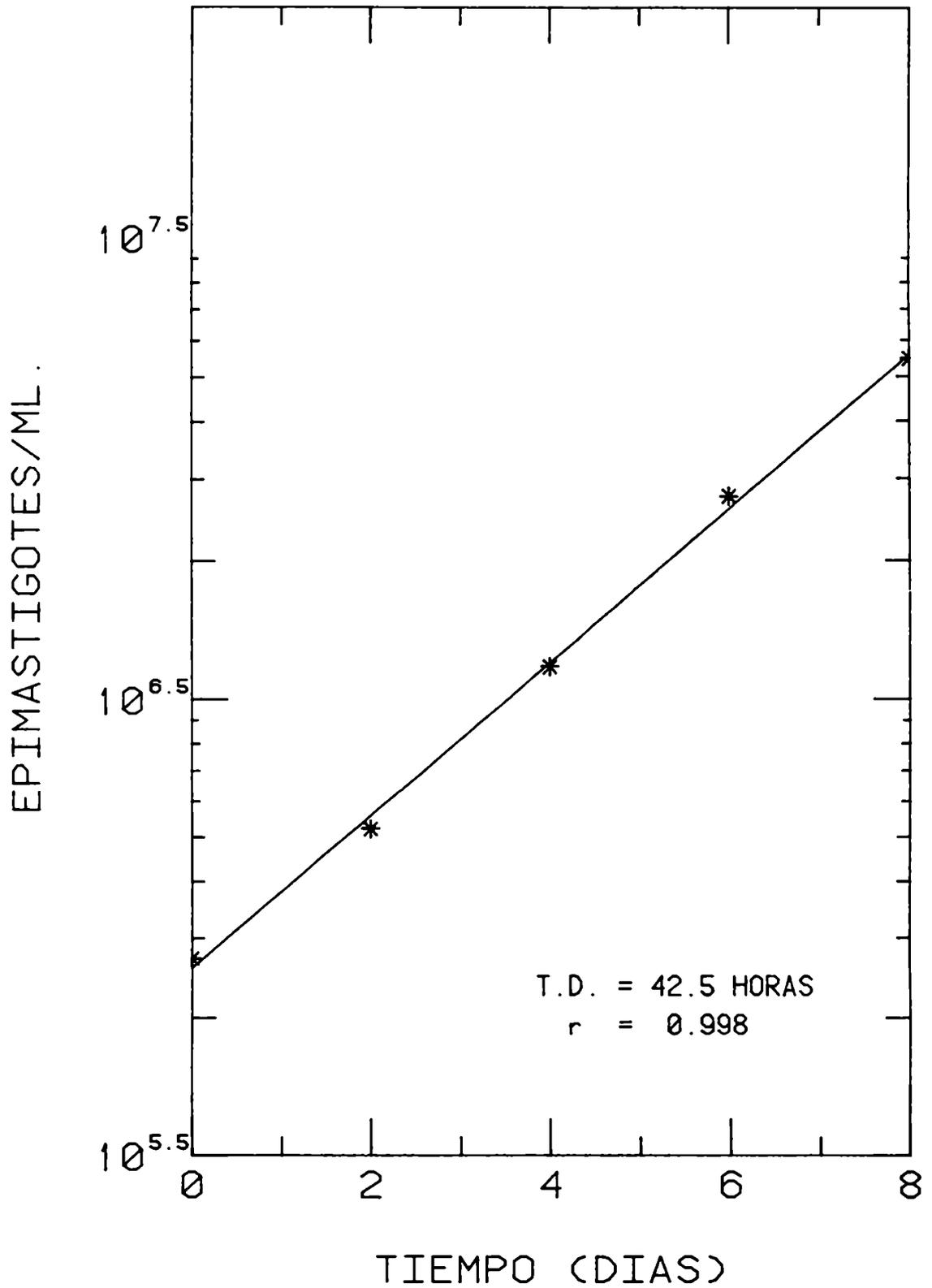
TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	28.5
2	29.8
3	31.3
4	31.9
5	32.5
6	32.9

T.D. MEDIA = 31.15 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.691

FIG. 2.6

CLON CA-I/70



TIEMPO (DIAS)	CLON CA-I/70 EPIMASTIGOTES/ML.
0	854640
2	1644720
4	3718400
6	8692200
8	17293000

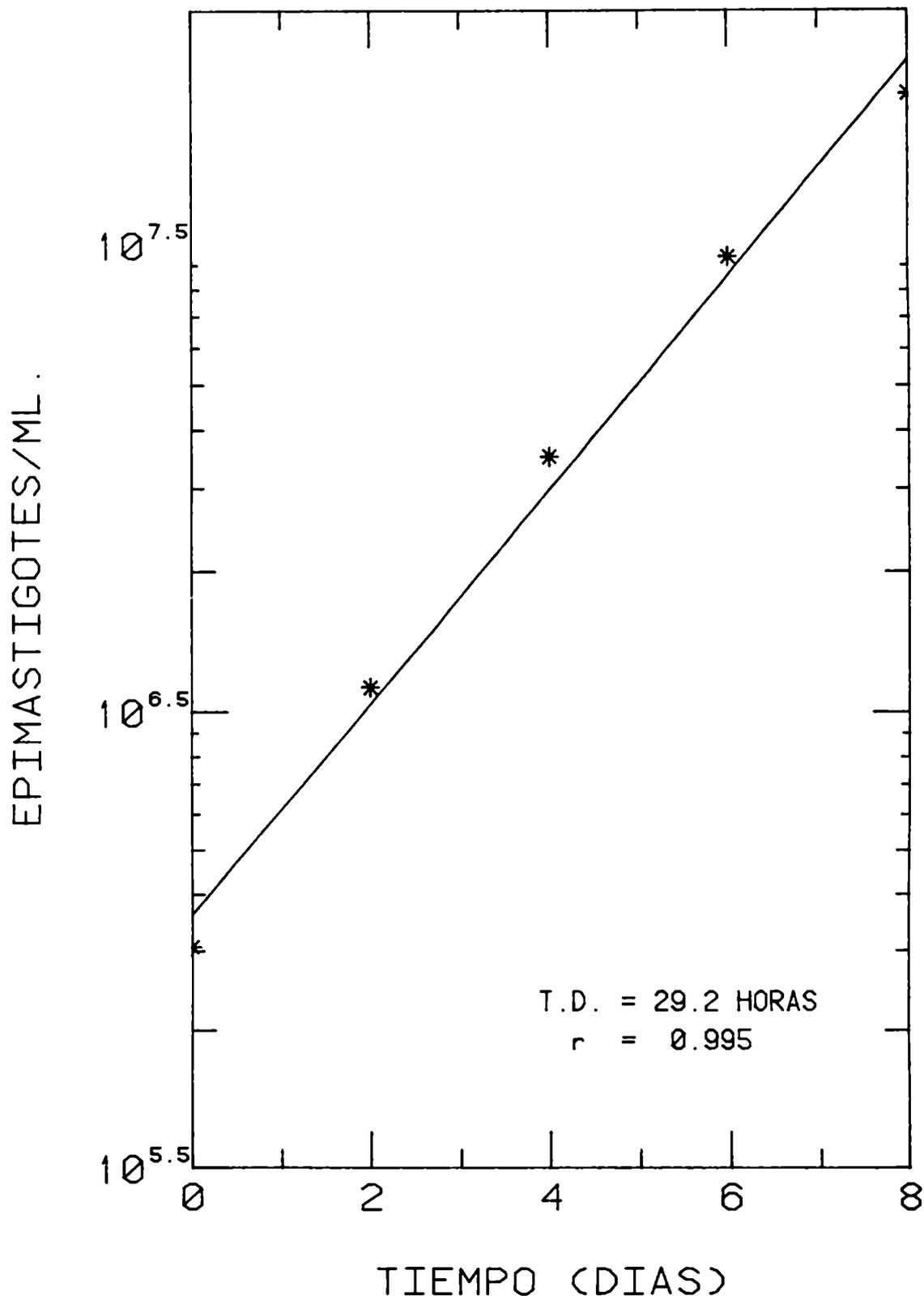
TABLA 2.6B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON CA-I/70

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	42.1
2	42.5
3	42.2
4	42
5	42
6	42.1

T.D. MEDIA = 42.15 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.076

FIG. 2.7 CLON CA-I/71



TIEMPO (DIAS)	CLON CA-I/71 EPIMASTIGOTES/ML.
0	967840
2	3567000
4	11098600
6	29721200
8	66236000

TABLA 2.7B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON CA-I/71

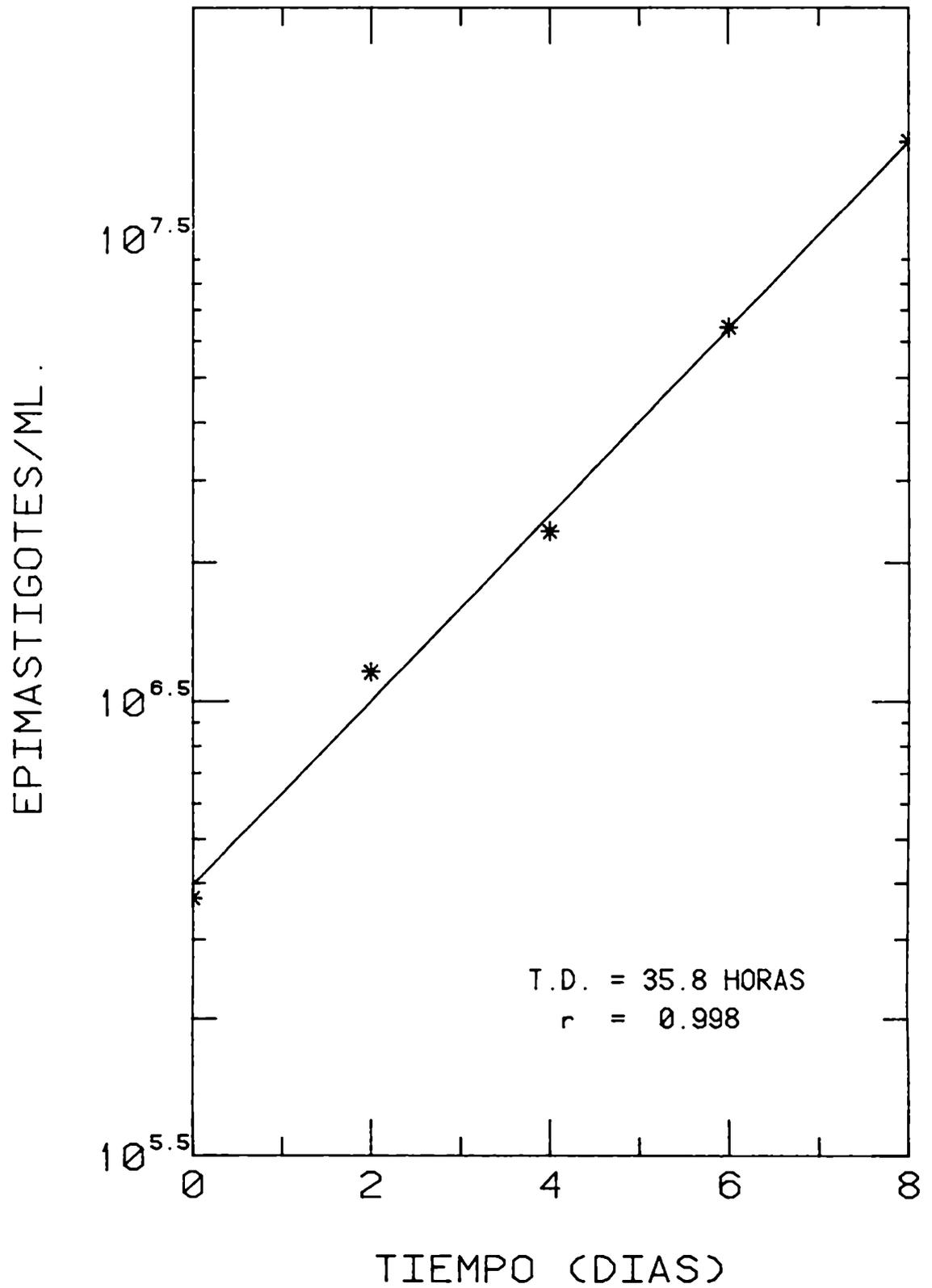
TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	27.1
2	27.6
3	28.3
4	28.8
5	29.2
6	28.7

T.D. MEDIA = 28.28 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.324

FIG. 2.8

CLON CA-I/72



TIEMPO (DIAS)	CLON CA-I/72 EPIMASTIGOTES/ML.
0	1170040
2	3662800
4	7373600
6	20310400
8	51238000

TABLA 2.8B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON CA-I/72

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	29.4
2	31.6
3	30.8
4	31.5
5	35.8

T.D. MEDIA = 31.82 HORAS
ERROR ESTANDARD = 1.070

FIG. 2.9 CLON CA-I/73

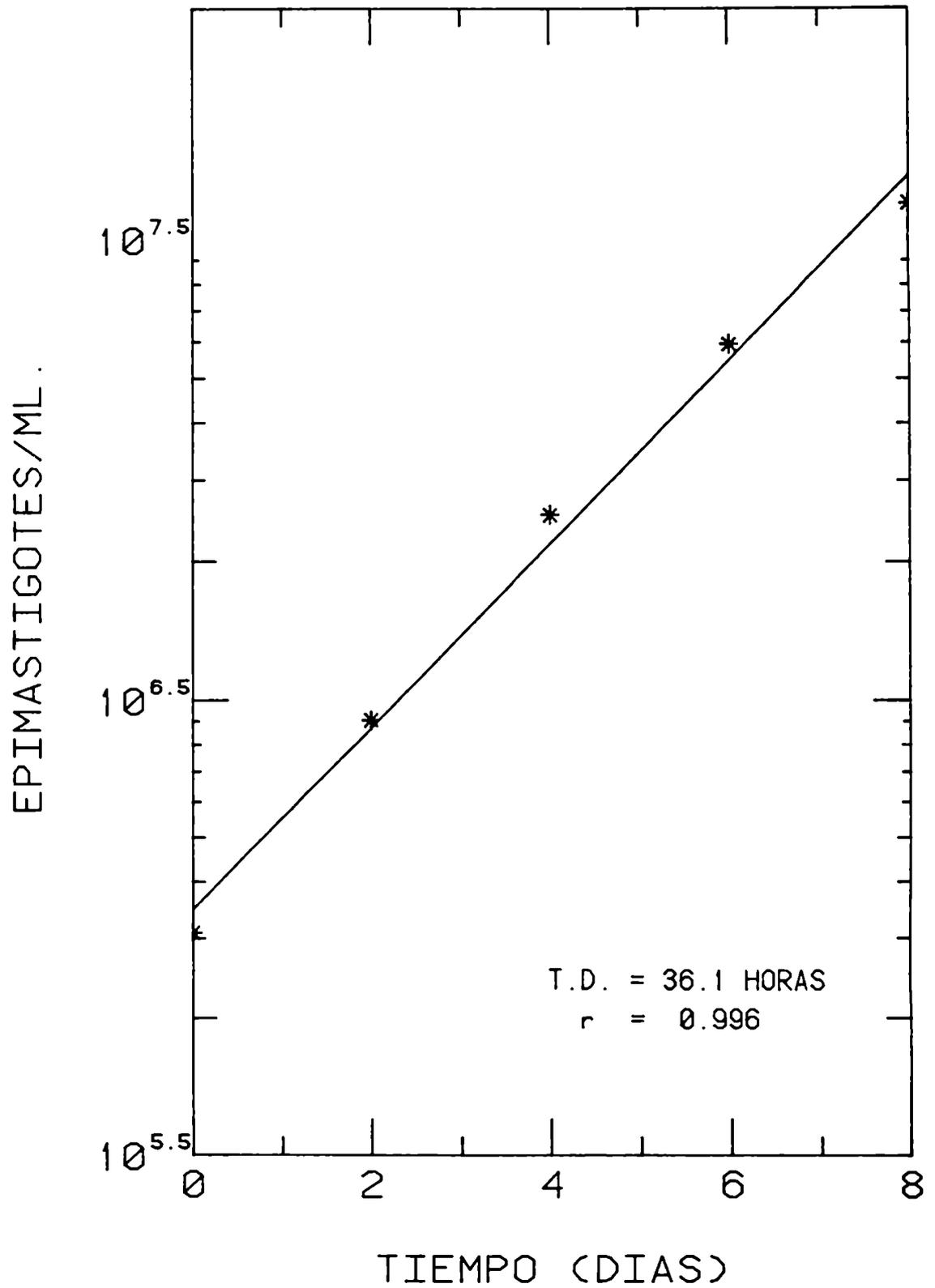


TABLA 2.9A CLON CA-I/73
TIEMPO (DIAS) EPIMASTIGOTES/ML.

0	974800
2	2859560
4	7981400
6	18748000
8	37882000

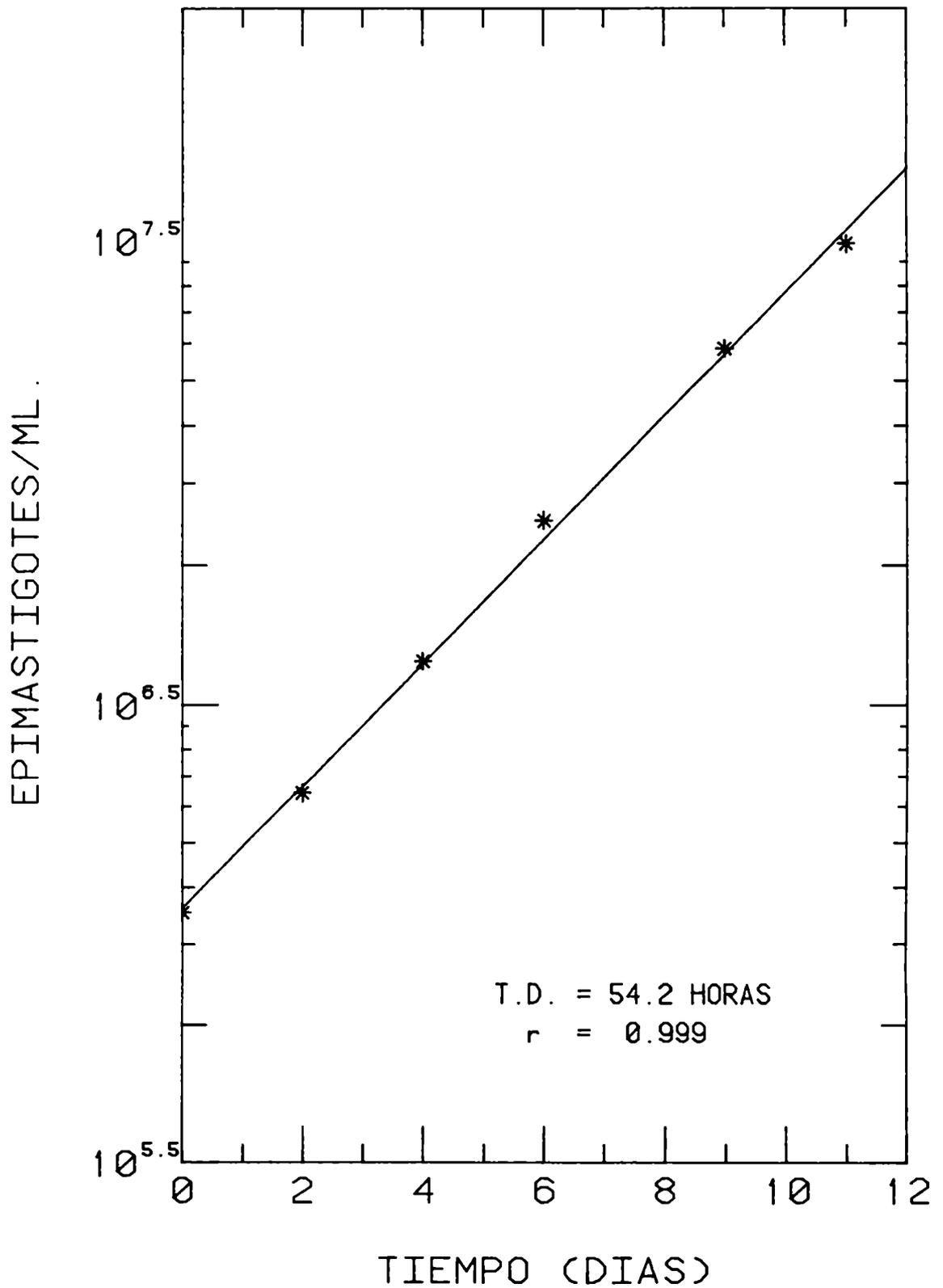
TABLA 2.9B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON CA-I/73

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	39.7
2	38.9
3	34
4	33.6

T.D. MEDIA = 36.55 HORAS
ERROR ESTANDARD = 1.598

FIG. 2.10 CLON MIRANDA/75



TIEMPO (DIAS)	CLON MIRANDA/75 EPIMASTIGOTES/ML.
0	1112000
2	2029160
4	3926600
6	7884900
9	18507800
11	31111000

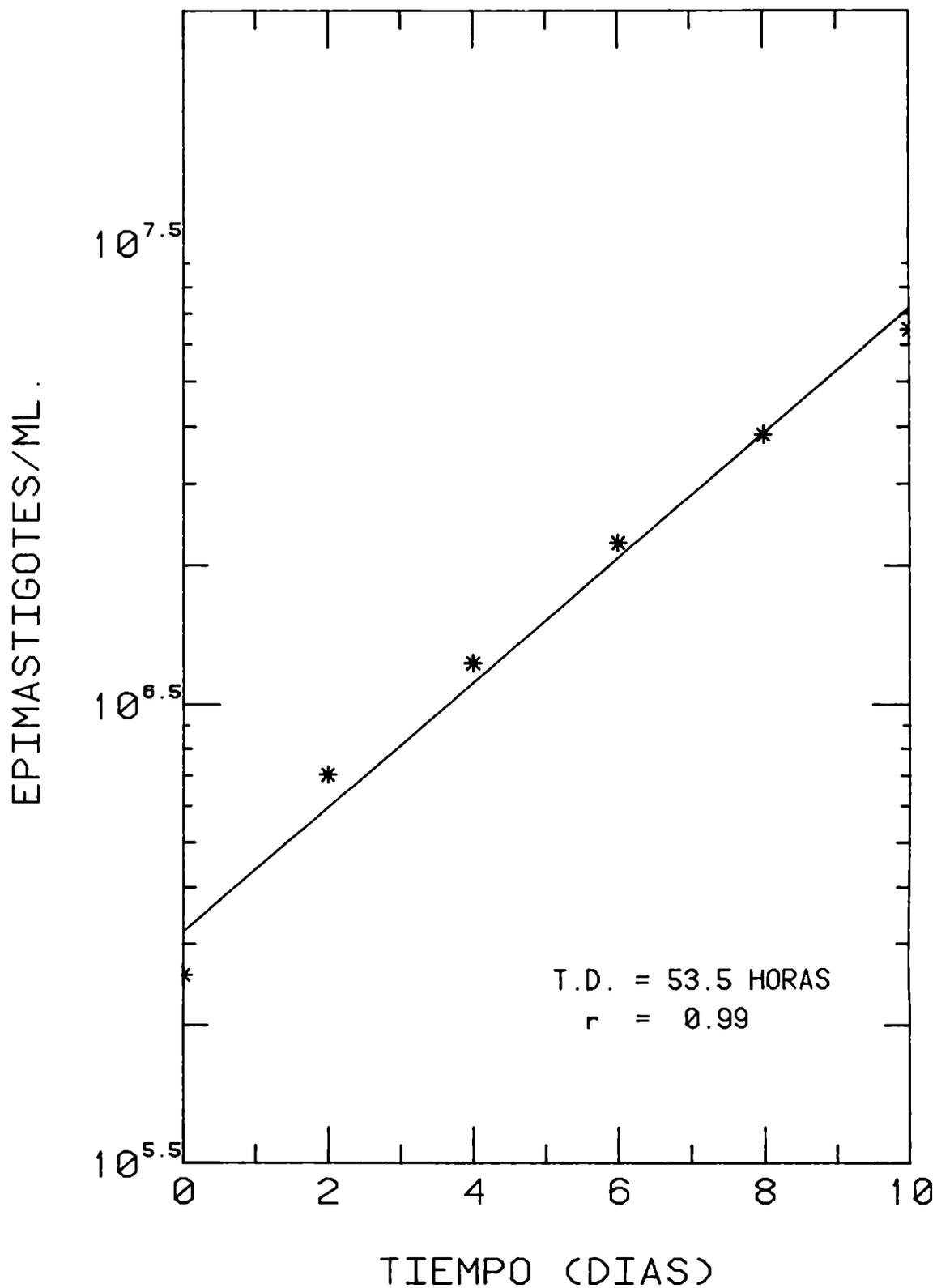
TABLA 2.10B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON MIRANDA/75

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	48.7
2	49.2
3	62.9
4	54.2
5	49.8

T.D. MEDIA = 52.96 HORAS
ERROR ESTANDARD = 2.670

FIG. 2.11 CLON MIRANDA/76



TIEMPO (DIAS)	CLON MIRANDA/76 EPIMASTIGOTES/ML.
0	812400
2	2222640
4	3882800
6	7070000
8	12137800
10	20449000

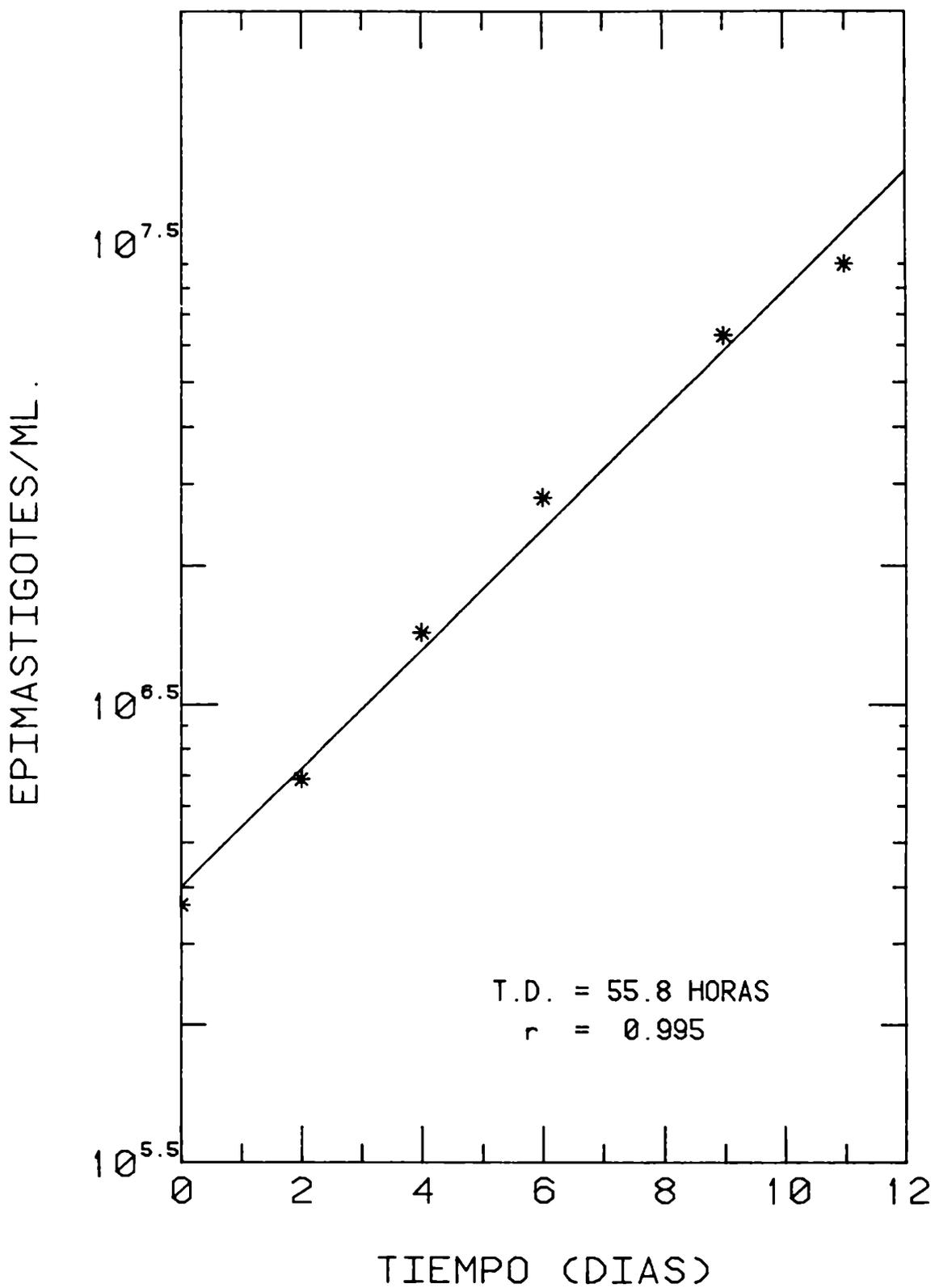
TABLA 2.11B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON MIRANDA/76

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	50.7
2	49.7
3	50.5
4	54.9
5	43.5
6	45.6

T.D. MEDIA = 49.15 HORAS
ERROR ESTANDARD = 1.654

FIG. 2.12 CLON MIRANDA/77



TIEMPO (DIAS)	CLON MIRANDA/77 EPIMASTIGOTES/ML.
0	1153400
2	2173320
4	4532600
6	8851100
9	19922600
11	28476000

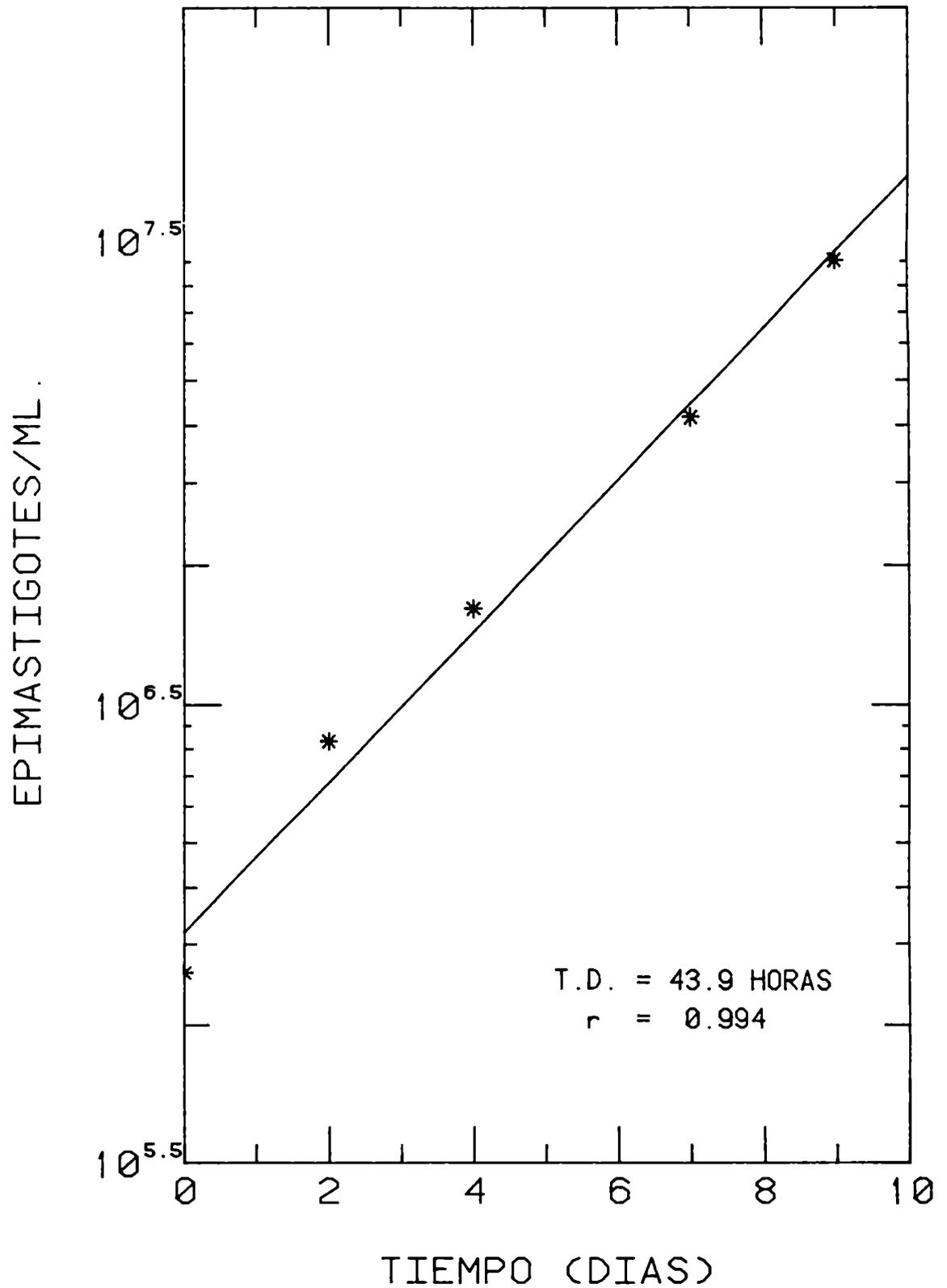
TABLA 2.12B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON MIRANDA/77

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	54.7
2	49.5
3	61.9
4	61.2
5	51.6
6	55.8

T.D. MEDIA = 55.78 HORAS
ERROR ESTANDARD = 2.040

FIG. 2.13 CLON MIRANDA/78



TIEMPO (DIAS)	CLON MIRANDA/78 EPIMASTIGOTES/ML .
0	820520
2	2630880
4	5098100
7	13140200
9	28624000

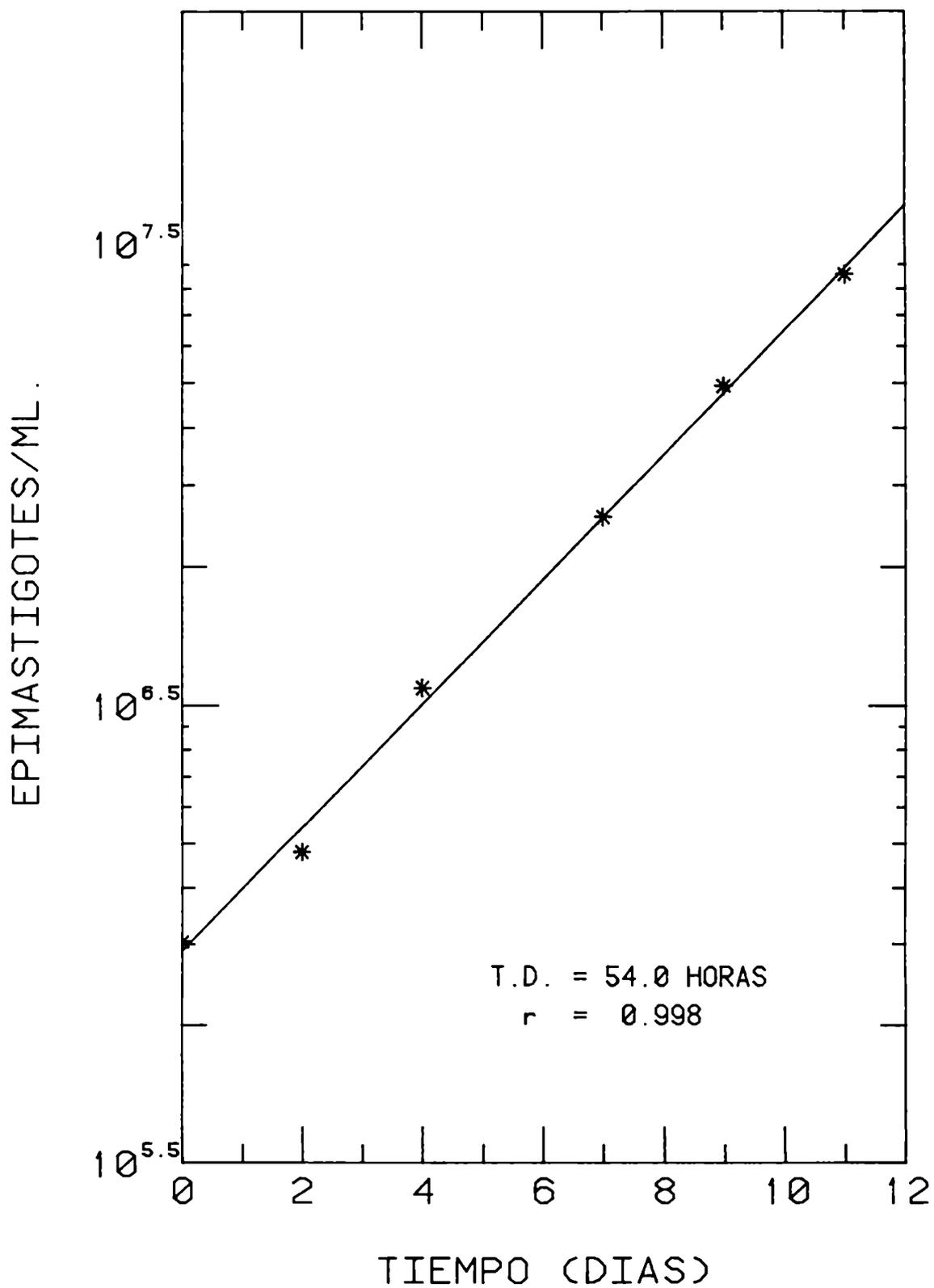
TABLA 2.13B RESMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON MIRANDA/78

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	43.9
2	43.7
3	54.1
4	52.7
5	43.1
6	42

T.D. MEDIA = 46.58 HORAS
ERROR ESTANDARD = 2.180

FIG. 2.14 CLON MIRANDA/80



TIEMPO (DIAS)	CLON MIRANDA/80 EPIMASTIGOTES/ML .
0	960840
2	1512200
4	3450100
7	8107300
9	15559800
11	27079600

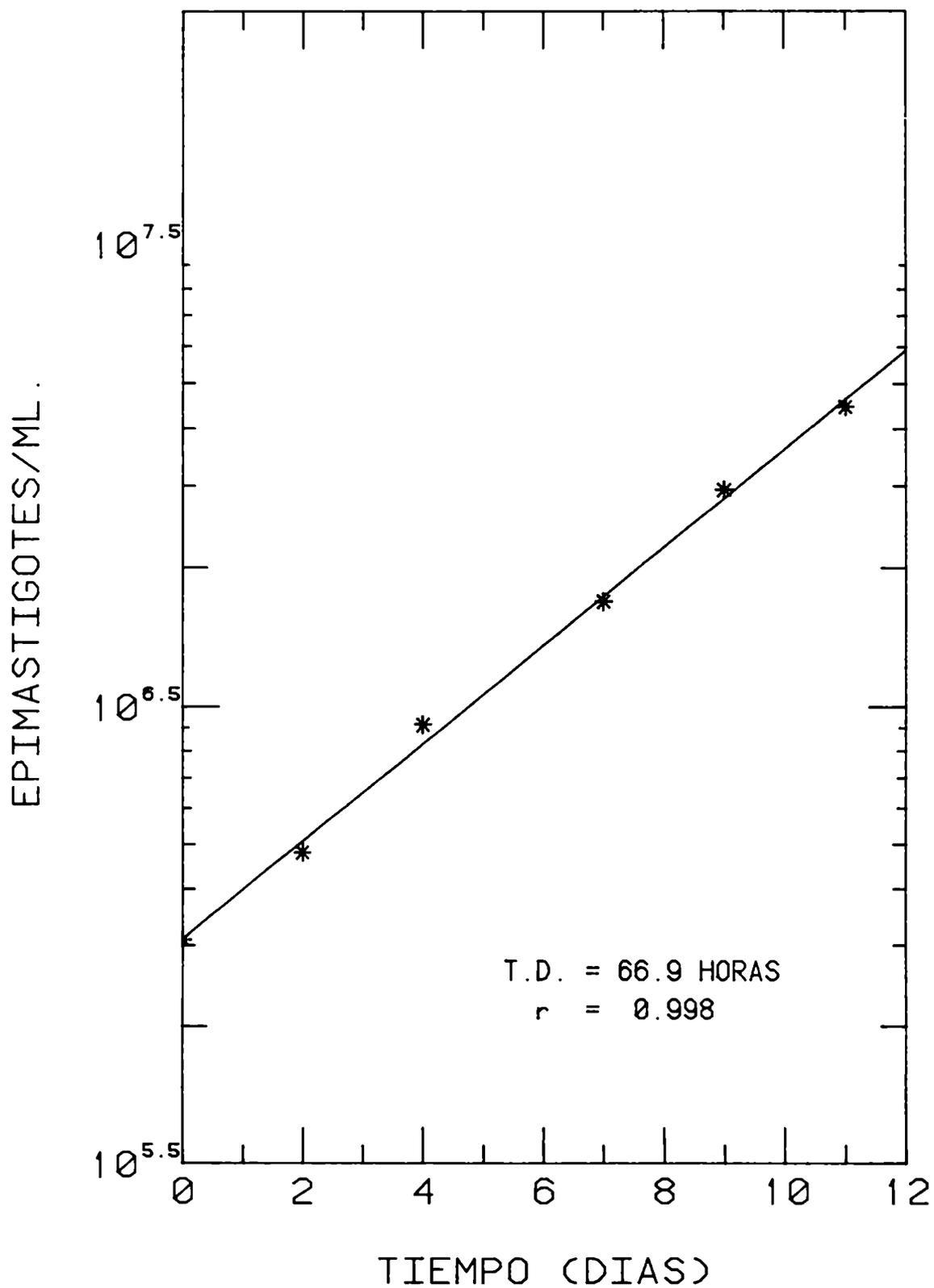
TABLA 2.14B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON MIRANDA/80

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	62.1
2	61.2
3	54.9
4	54.8
5	62
6	55.2

T.D. MEDIA = 58.38 HORAS
ERROR ESTANDARD = 1.527

FIG. 2.15 CLON MIRANDA/81



TIEMPO (DIAS)	CLON MIRANDA/81 EPIMASTIGOTES/ML.
0	975600
2	1514080
4	2883900
7	5333600
9	9327000
11	14078200

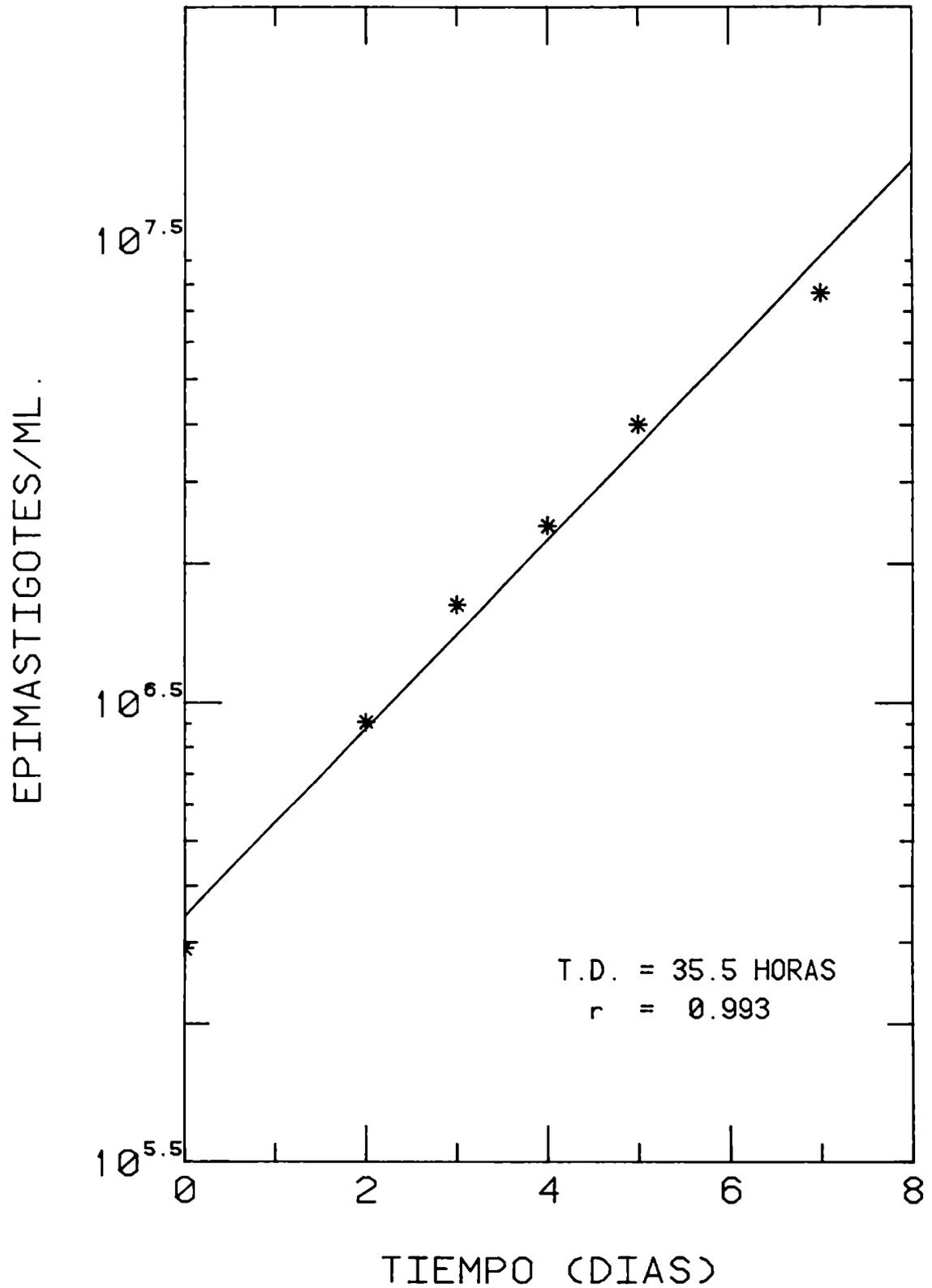
TABLA 2.15B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON MIRANDA/81

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	45.9
2	66.9
3	64.1
4	55.2
5	55.5

T.D. MEDIA = 57.52 HORAS
ERROR ESTANDARD = 3.713

FIG. 2.16 CLON MIRANDA/83



TIEMPO (DIAS)	CLON MIRANDA/83 EPIMASTIGOTES/ML .
0	920560
2	2866120
3	5148500
4	7624600
5	12629200
7	24267400

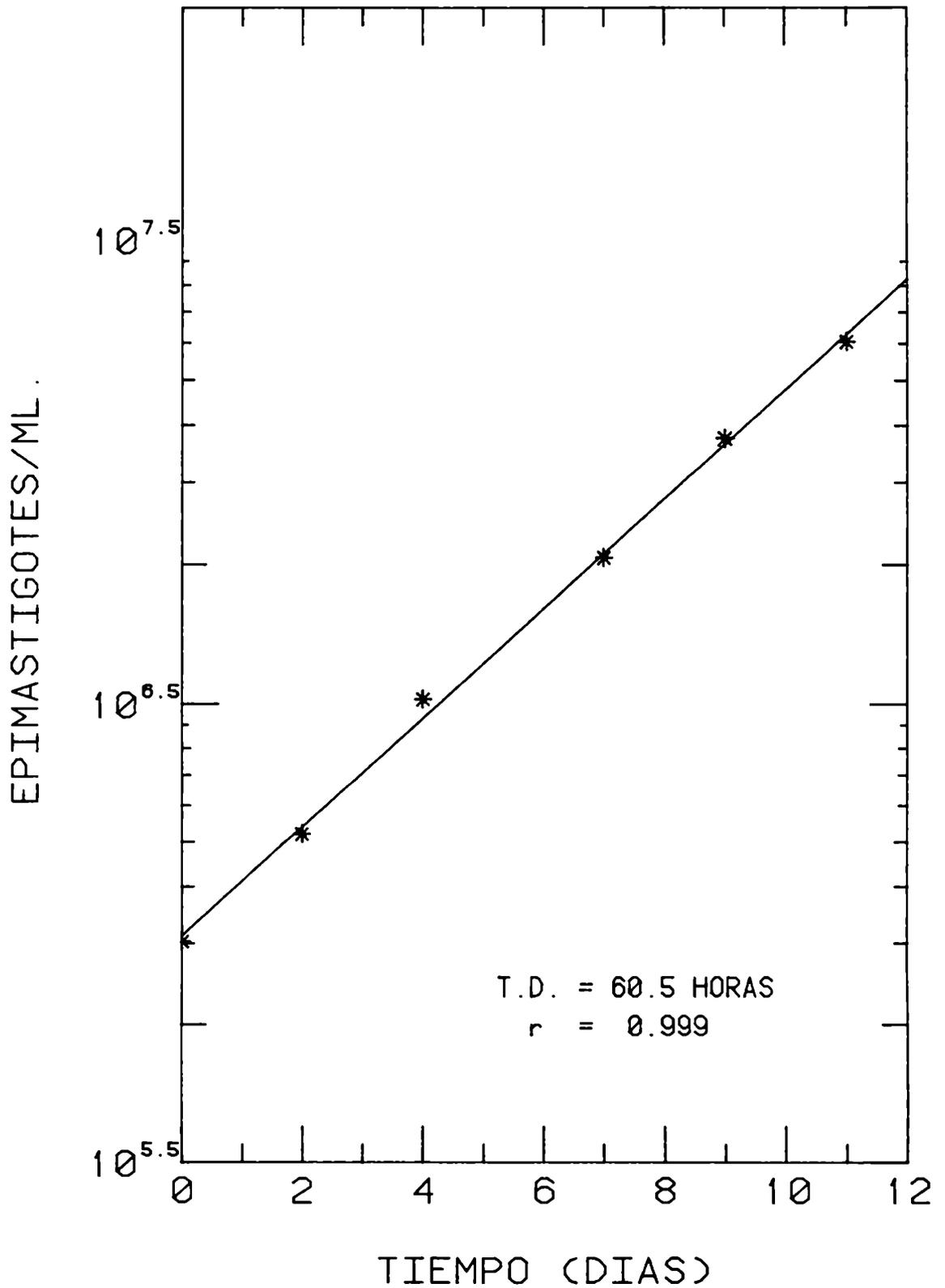
TABLA 2.16B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON MIRANDA/83

TIEMPOS DE DUPLICACION

CELULA No.	HORAS
1	37.2
2	36.6
3	30.5
4	31.7
5	38.9
6	30.6
7	29.6
8	35.5
9	29.3
10	28.4

T.D. MEDIA = 32.83 HORAS
ERROR ESTANDARD = 1.209

FIG. 2.17 CLON MIRANDA/84



TIEMPO (DIAS)	CLON MIRANDA/84 EPIMASTIGOTES/ML .
0	958600
2	1642520
4	3234900
7	6542900
9	11833200
11	19165600

TABLA 2.17B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON MIRANDA/84

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	48.8
2	55.7
3	61
4	60.5
5	53
6	49.2

T.D. MEDIA = 54.70 HORAS
ERROR ESTANDARD = 2.178

FIG. 2.18 CLON MIRANDA/88

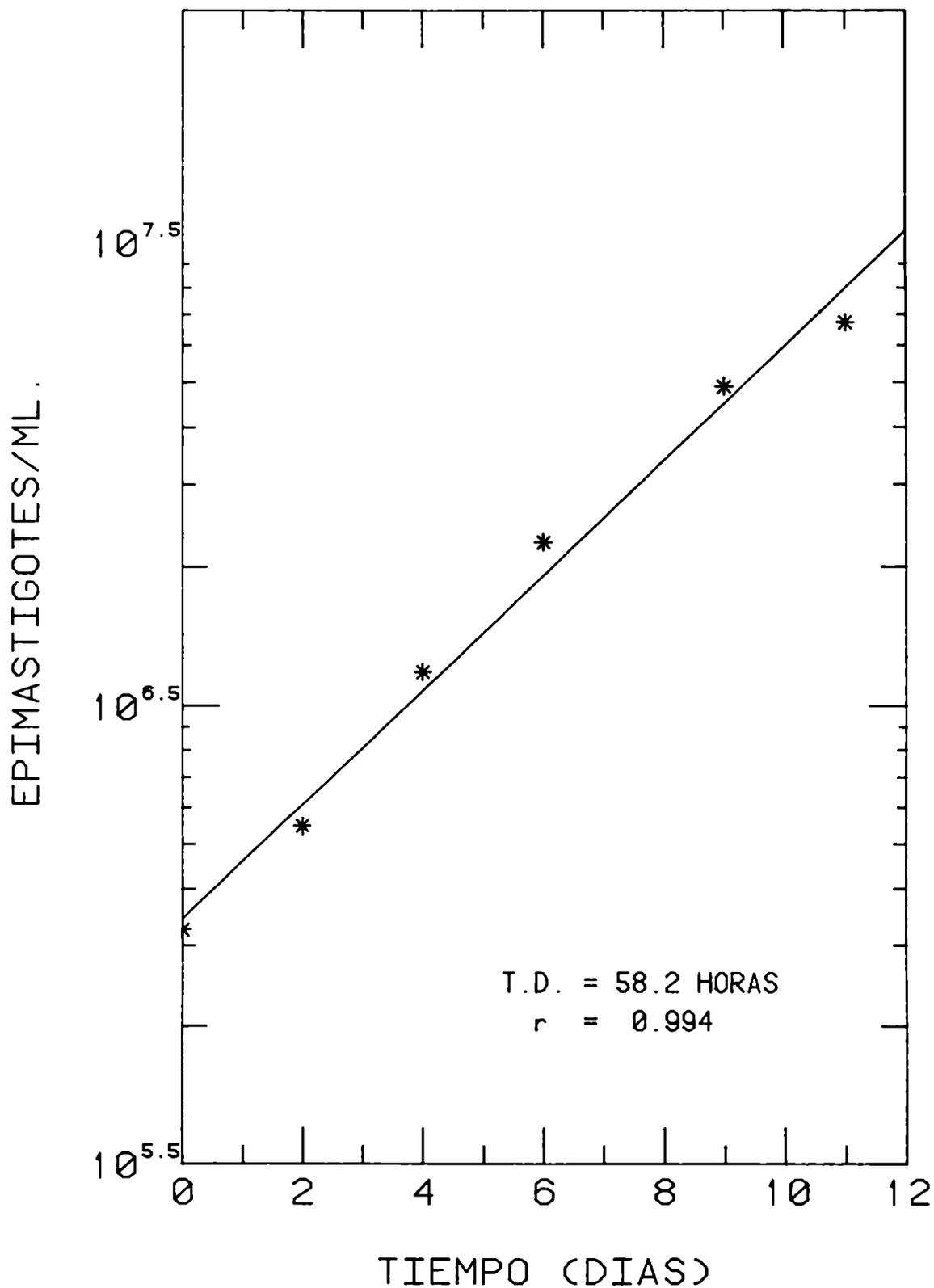


TABLA 2.18A	CLON MIRANDA/88
TIEMPO (DIAS)	EPIMASTIGOTES/ML .
0	1026200
2	1728800
4	3740000
6	7124900
9	15483600
11	21253000

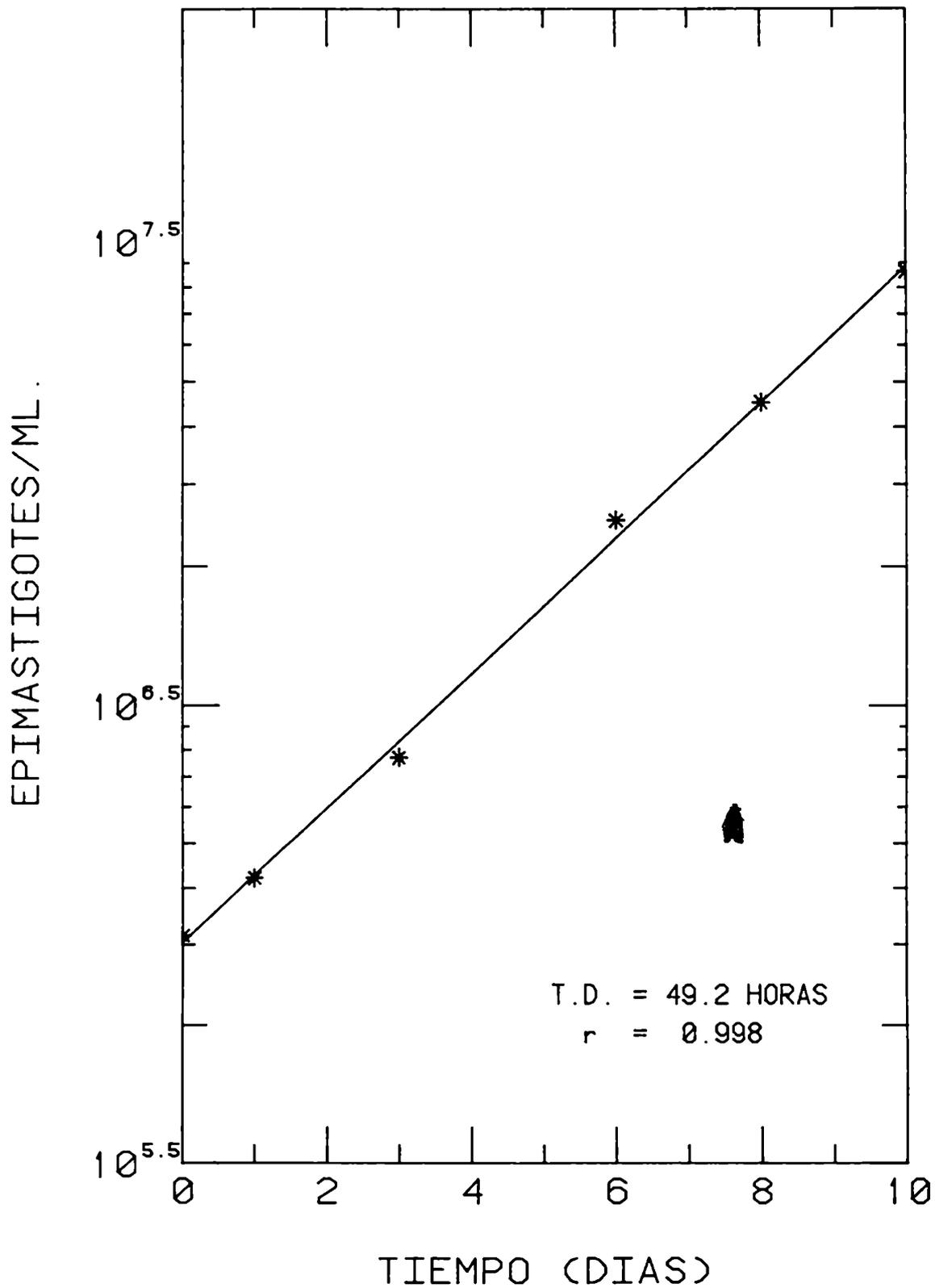
TABLA 2.18B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON MIRANDA/88

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	50.6
2	48.6
3	66
4	65.1
5	58.2
6	58.3

T.D. MEDIA = 57.80 HORAS
ERROR ESTANDARD = 2.929

FIG. 2.19 CLON MIRANDA/91



TIEMPO (DIAS)	CLON MIRANDA/91 EPIMASTIGOTES/ML .
0	993440
1	1325120
3	2434880
6	7946100
8	14260400
10	27332600

TABLA 2.19B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DEL CLON MIRANDA/91

TIEMPOS DE DUPLICACION

EXPERIMENTO No.	HORAS
1	50.1
2	50.7
3	49.2
4	50.6
5	47.6
6	48.1

T.D. MEDIA = 49.38 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.535

Figura 2.20. Representación gráfica de las tasas de crecimiento de tres poblaciones de epimastigotes de T. cruzi en fase de crecimiento exponencial en medio LIT a 26°C. Leyenda: * = tasa de crecimiento medio de la cepa Tulahuen ($25 \pm 0,7$ hs); 0 = tasa de crecimiento medio para los clones CA-I ($34,1 \pm 1,9$ hs.); Δ = tasa de crecimiento medio para los clones Miranda ($51,6 \pm 2,4$ hs.).

Figura 2.21. Representación gráfica de los tiempos de duplicación (en horas) obtenidos de las tasas de crecimiento en medio LIT a 26°C de la cepa Tulahuen y 19 clones de T. cruzi. Leyendas: T = Tulahuen; (59-73) = grupo de clones CA-I; (75-91) = grupo de clones Miranda. Las barras cuadrículadas representan los clones con tiempos de duplicación significativamente diferentes con respecto al tiempo de duplicación medio de sus respectivos grupos.

FIG. 2.20 TASAS DE CRECIMIENTO

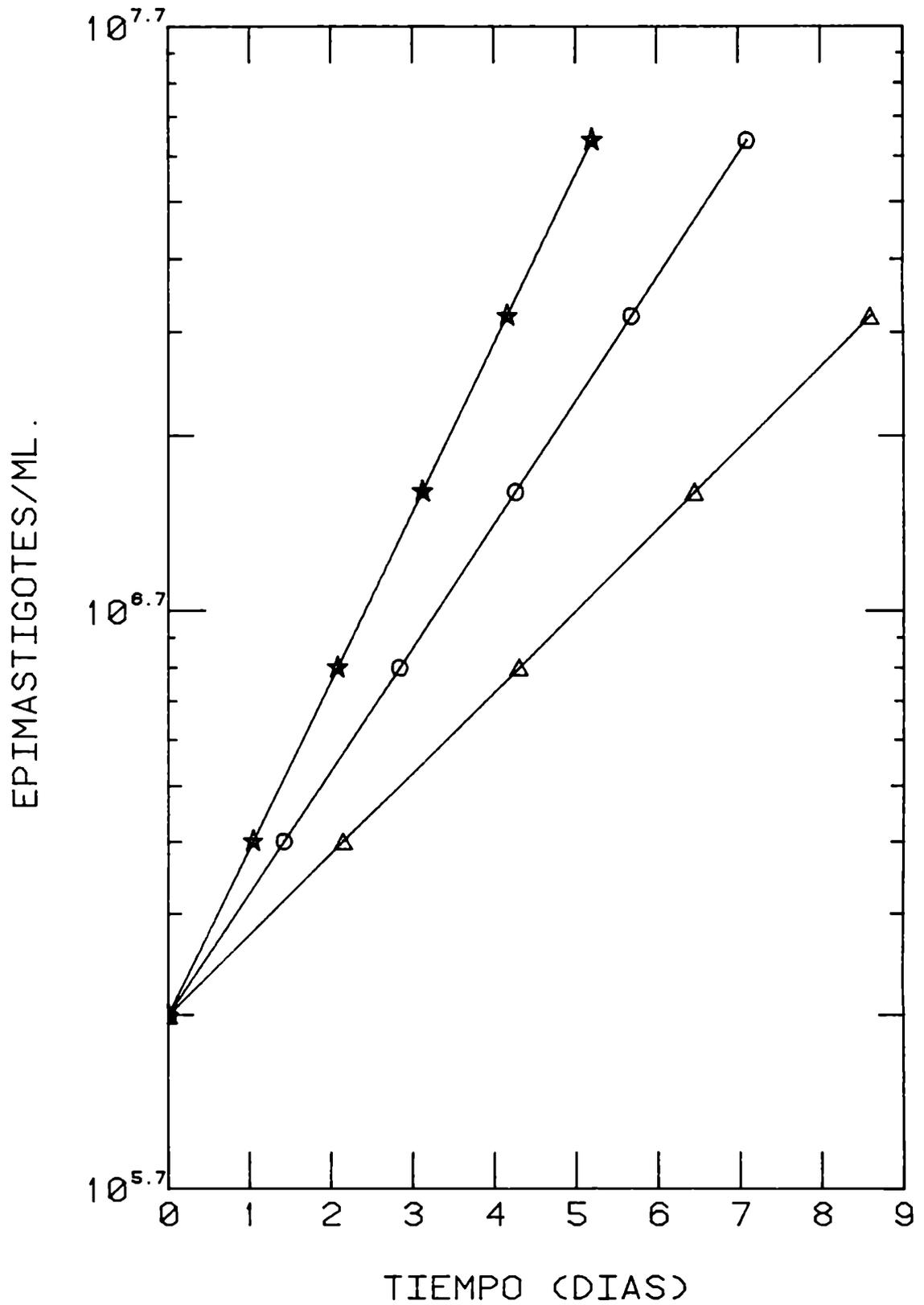
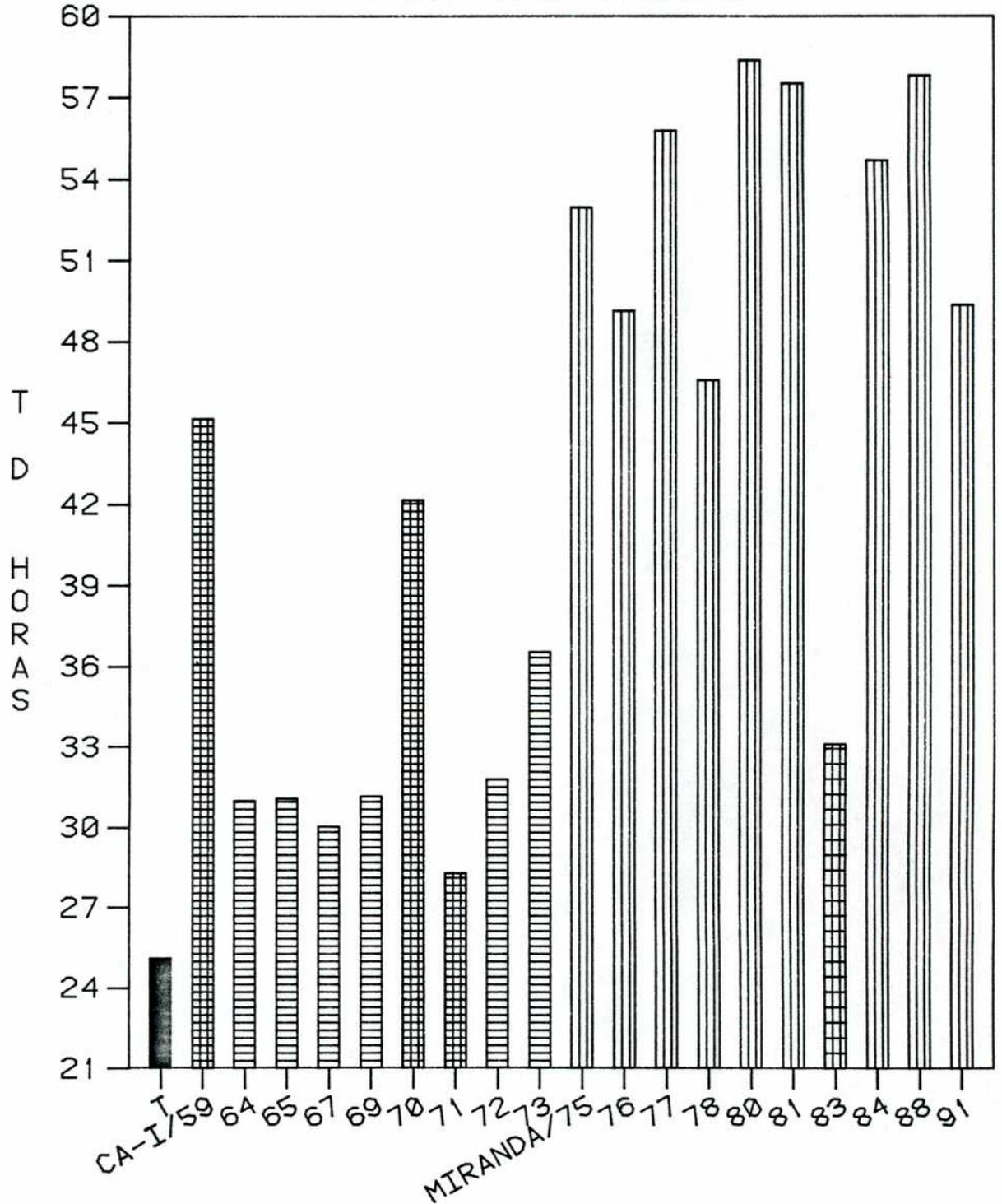


FIG. 2.21 DIFERENCIAS EN LOS TIEMPOS DE DUPLICACION DE 19 CLONES DE T. CRUZI Y LA CEPA TULAHUEN



Tablas 3.0 A- 3.19 A. Exponen los valores de los volúmenes modales en micrones cúbicos, el valor medio y el error estándar correspondientes, de la cepa Tulahuen y 19 clones de T. cruzi. Dichos datos fueron obtenidos durante el pico de crecimiento exponencial de epimastigotes cultivados en medio LIT a 26°C.

TABLA 3.0A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
 MENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN
 MODAL MAXIMO DE LA CEPA TULAHUEN

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	30.2
2	35.7
3	25.4
4	26.7
5	25.9
6	26.7
7	25.9
8	25.9
9	25.9
10	28.2
11	28.2
12	25.2

V.M. MEDIA = 27.49 UM³
 ERROR ESTANDARD = 0.854

TABLA 3.1A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN
MODAL MAXIMO DEL CLON CA-I/59

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	30.2
2	32.2
3	24
4	25.9
5	25.9

V.M. MEDIA = 27.65 UM³
ERROR ESTANDARD = 1.529

TABLA 3.2A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN
MODAL MAXIMO DEL CLON CA-I/64

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	30.9
2	28.8
3	27.4
4	27.4

V.M. MEDIA = 28.6 UM³
ERROR ESTANDARD = 0.810

TABLA 3.3A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN
MODAL MAXIMO DEL CLON CA-I/65

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	26.7
2	26.1
3	24.7
4	23.3

V.M. MEDIA = 25.21 UM³
ERROR ESTANDARD = 0.761

TABLA 3.4A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN
MODAL MAXIMO DEL CLON CA-I/67

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	26.7
2	26.1
3	23.3
4	23.3

V.M. MEDIA = 24.86 UM³
ERROR ESTANDARD = 0.903

TABLA 3.5A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN
MODAL MAXIMO DEL CLON CA-I/69

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	22.6
2	20.6
3	23.3
4	21.3
5	22.1
6	21.3

V.M. MEDIA = 21.8 UM³
ERROR ESTANDARD = 0.410

TABLA 3.6A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN
MODAL MAXIMO DEL CLON CA-I/70

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	19.1
2	19
3	16.8
4	14.5
5	19.8
6	19.1
7	17.5
8	18.3

V.M. MEDIA = 18.01 UM³
ERROR ESTANDARD = 0.610

TABLA 3.7A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN
MODAL MAXIMO DEL CLON CA-I/71

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	24.7
2	25.4
3	29.3
4	27.4
5	27.4
6	21.3

V.M. MEDIA = 25.93 UM³
ERROR ESTANDARD = 1 152

TABLA 3.8A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN
MODAL MAXIMO DEL CLON CA-I/72

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	30.9
2	30.2
3	26.1
4	26.1

V.M. MEDIA = 28.30 UM³
ERROR ESTANDARD = 1.294

TABLA 3.9A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN
MODAL MAXIMO DEL CLON CA-I/73

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	28.8
2	28.8
3	24.6
4	23.3

V.M. MEDIA = 26.39 UM³
ERROR ESTANDARD = 1.420

TABLA 3.10A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN MODAL MAXIMO DEL CLON MIRANDA/75

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	33.6
2	30.2
3	30.2

V.M. MEDIA = 31.32 UM³
ERROR ESTANDARD = 1.143

TABLA 3.11A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN MODAL MAXIMO DEL CLON MIRANDA/76

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	28.2
2	32.8
3	29.7
4	32
5	38.9
6	32
7	24.4
8	25.1

V.M. MEDIA = 30.39 UM³
ERROR ESTANDARD = 1.644

TABLA 3.12A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN MODAL MAXIMO DEL CLON MIRANDA/77

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	31.5
2	30.9
3	29.5
4	28.8

V.M. MEDIA = 30.18 UM³
ERROR ESTANDARD = 0.625

TABLA 3.13A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN MODAL MAXIMO DEL CLON MIRANDA/78

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	32
2	32.8
3	42.8
4	40.4
5	29
6	29.7
7	26.7
8	25.9

V.M. MEDIA = 32.4 UM³
ERROR ESTANDARD = 2.170

TABLA 3.14A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN MODAL MAXIMO DEL CLON MIRANDA/80

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	30.2
2	31.5
3	29.5
4	30.2

V.M. MEDIA = 30.35 UM³
ERROR ESTANDARD = 0.430

TABLA 3.15A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN MODAL MAXIMO DEL CLON MIRANDA/81

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	31.5
2	31.5
3	28.8
4	28.8

V.M. MEDIA = 30.18 UM³
ERROR ESTANDARD = 0.791

TABLA 3.16A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN MODAL MAXIMO DEL CLON MIRANDA/83

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	24.4
2	22.8
3	24.6
4	25.5
5	23.5
6	24.4

V.M. MEDIA = 24.2 UM³
ERROR ESTANDARD = 0.382

TABLA 3.17A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN MODAL MAXIMO DEL CLON MIRANDA/84

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	31.5
2	30.9
3	29.5
4	31.6

V.M. MEDIA = 30.87 UM³
ERROR ESTANDARD = 0.483

TABLA 3.18A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN MODAL MAXIMO DEL CLON MIRANDA/88

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	29.5
2	30.2
3	28.8
4	27.4

V.M. MEDIA = 28.98 UM³
ERROR ESTANDARD = 0.585

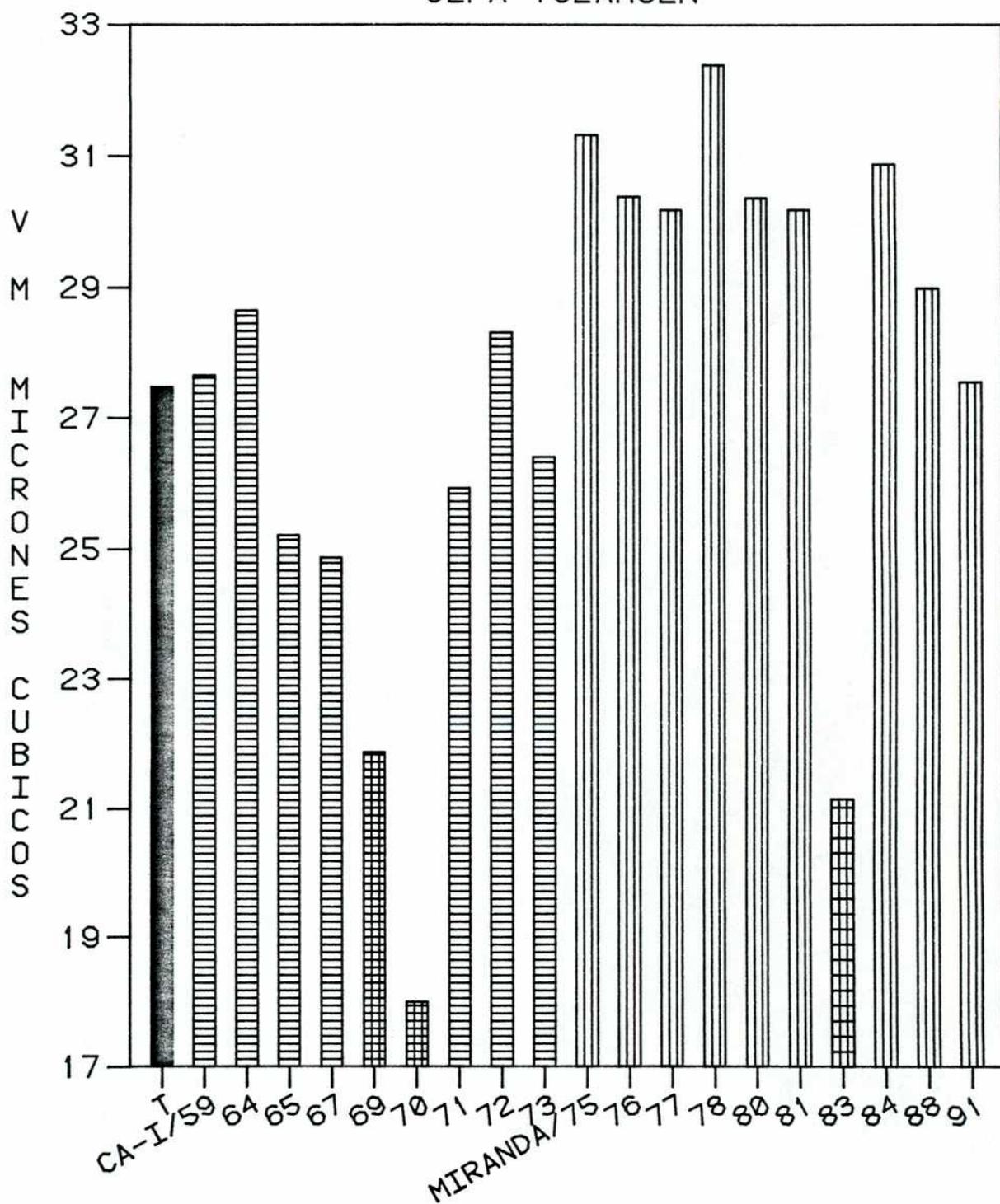
TABLA 3.19A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES Y ESTADISTICOS DEL VOLUMEN MODAL MAXIMO DEL CLON MIRANDA/91

VOLUMEN MODAL	
EXPERIMENTO No.	UM ³
1	31.2
2	29.7
3	25.9
4	28.2
5	26.7
6	26.7
7	25.9
8	25.9

V.M. MEDIA = 27.53 UM³
ERROR ESTANDARD = 0.713

Figura 3.1. Representación gráfica del volumen modal en μm^3 en el pico de crecimiento, de epimastigotes de T. cruzi cultivados en medio LIT a 26°C. Leyenda: T= cepa Tulahuen, (59-73)= grupo de clones CA-I, (75-91)= grupo de clones Miranda. Los clones con un volumen modal significativamente distinto de la media del volumen modal del grupo respectivo se encuentran cuadrículados.

FIG. 3.1 DIFERENCIAS EN LOS VOLUMENES MODALES DE 19 CLONES DE T. CRUZI Y LA CEPA TULAHUEN



- Figura 4.1. Representación gráfica de la evolución temporal de una célula BESM infectada por un tripomastigote del clon CA-I/72.
- Tabla 4.1. Evolución temporal del número de amastigotes durante el ciclo intracelular del clon CA-I/72 de T. cruzi.
- Tabla 4.1 A. Detalle de la duración del período lag (en horas) para cada célula infectada estudiada, el período lag medio y el error estándar para el clon CA-I/72.
- Tabla 4.1 B. Resumen de los tiempos de duplicación (en horas) de la fase exponencial de crecimiento para cada ciclo intracelular estudiado, el tiempo de duplicación medio y el error estándar del clon CA-I/72.

FIG. 4.1

CLON CA-I/72

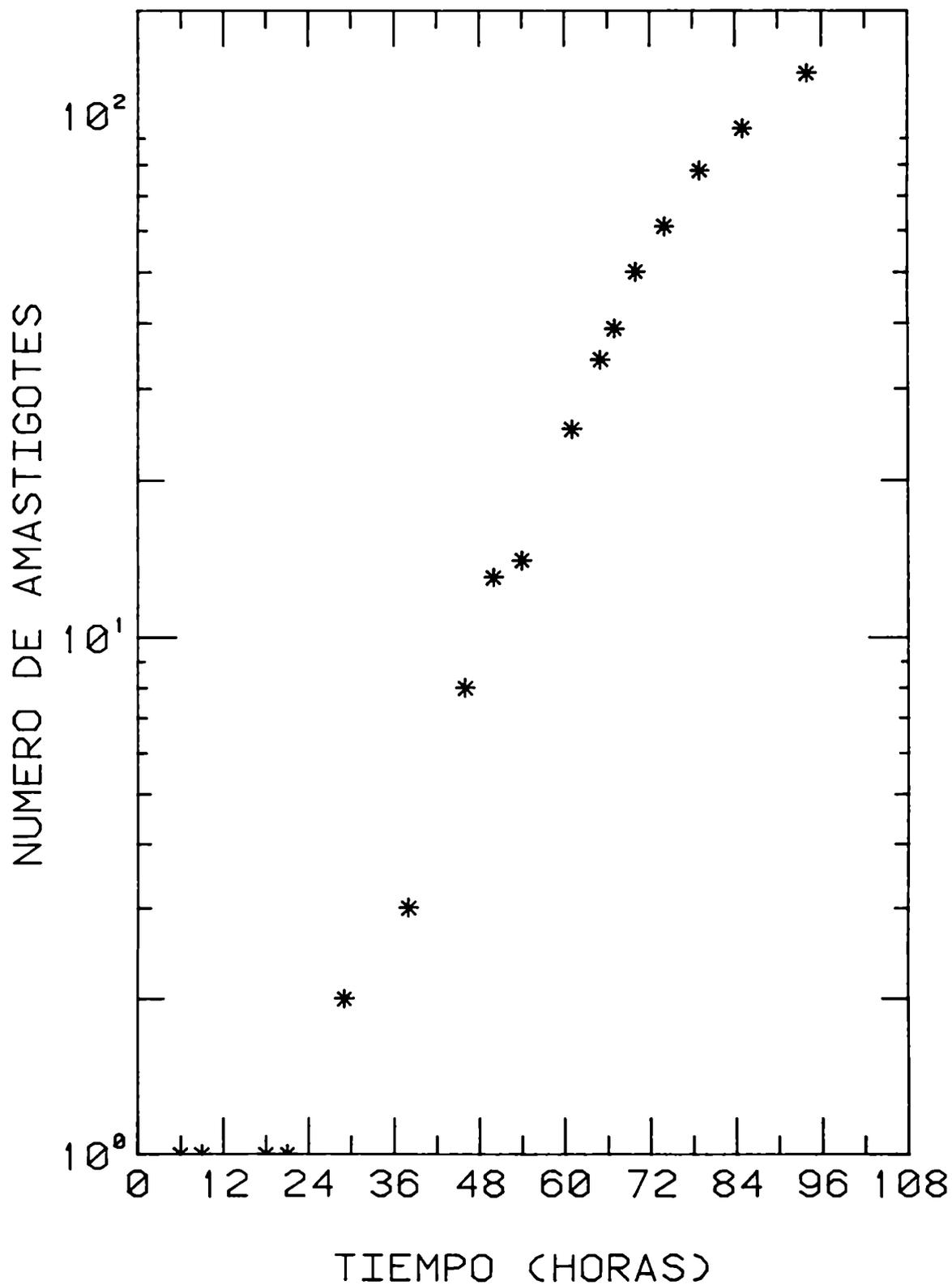


TABLA 4.1 CLON CA-I/72

TIEMPO (HORAS)	NUMERO DE AMASTIGOTES
6	1
9	1
18	1
21	1
29	2
38	3
46	8
50	13
54	14
61	25
65	34
67	39
70	50
74	61
79	78
85	94
94	120

TABLA 4.1A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
 MENTALES Y ESTADISTICOS DEL CICLO INTRA-
 CELULAR (P.LAG/CEL.) DEL CLON CA-I/72

PERIODO	LAG
CELULA No.	HORAS
1	24.6
2	24.9
3	22.8
4	21.4
5	22.1
6	21.4
7	24.2
8	21.8
9	23.4
10	21.8
11	20.3
12	23.5
13	22.4
14	23.8
15	20.6
16	24.8
17	20.1
18	23.1
19	19.2
20	18.2

P. LAG MEDIA = 22.2 HORAS
 ERROR ESTANDARD = 0.414

TABLA 4.1B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DEL CICLO INTRA-
CELULAR (T.D./CEL.) DEL CLON CA-I/72

TIEMPOS DE DUPLICACION

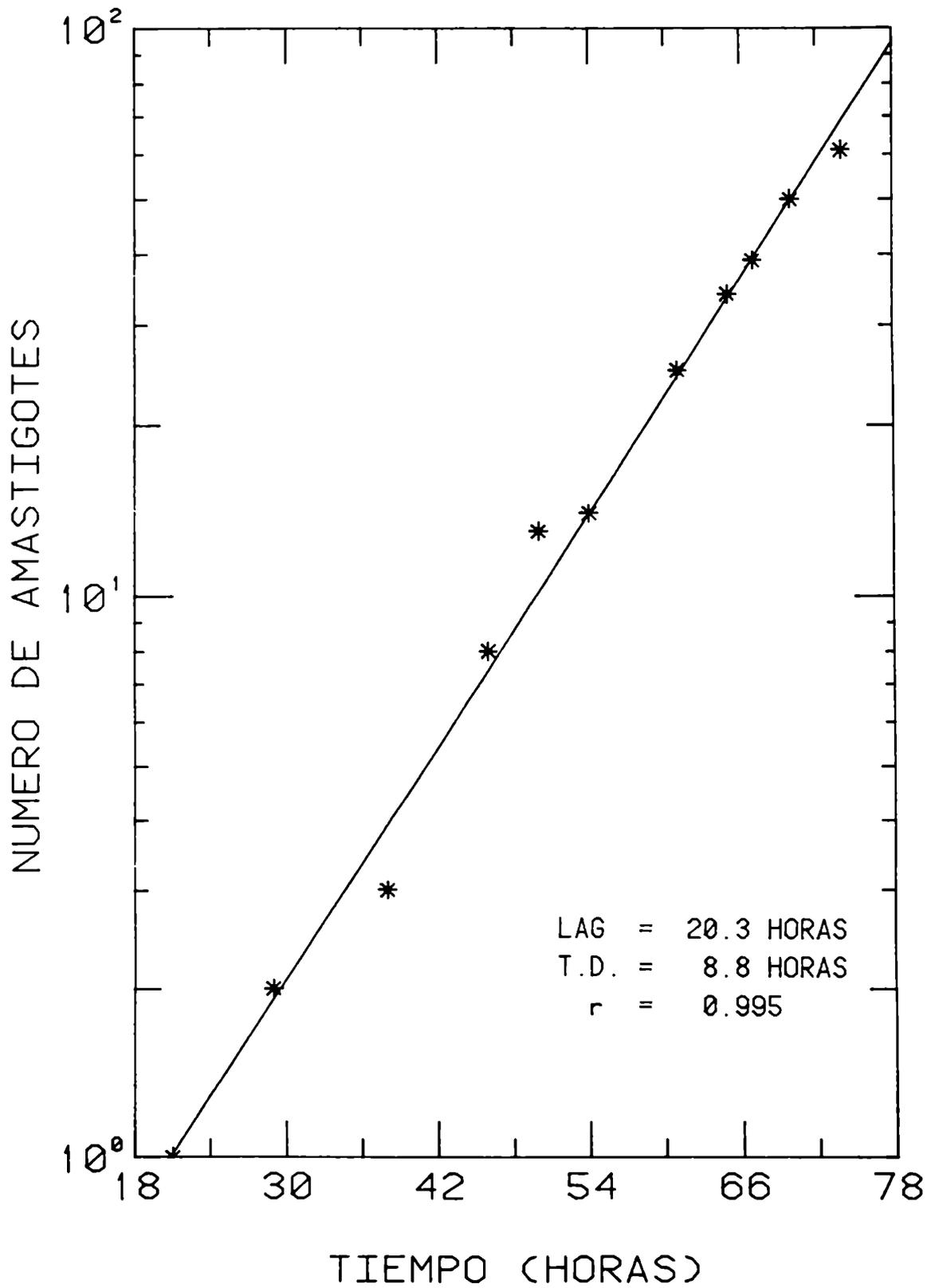
CELULA No.	HORAS
1	9.7
2	9.5
3	10.6
4	9.2
5	9.9
6	11.0
7	10.6
8	12.6
9	10.4
10	8.5
11	8.8
12	9.0
13	10.1
14	10.9
15	10.3
16	9.5
17	10.2
18	8.1
19	10.1
20	11.1

T.D. MEDIA = 10.01 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.230

Figura 4.2. Representación gráfica de la fase exponencial de crecimiento intracelular del clon CA-I/72. Mediante la regresión de la curva se determinó el período lag (en horas), el tiempo de duplicación de los amastigotes (en horas) y el coeficiente de correlación (r).

Tabla 4.2. Variación temporal (en horas) del número de amastigotes en una célula BESM infectada por un parásito para el clon CA-I/72, durante su fase de crecimiento exponencial.

FIG 4.2 CLON CA-I/72



TIEMPO (HORAS)	CLON CA-I/72	NUMERO DE AMASTIGOTES
21		1
29		2
38		3
46		8
50		13
54		14
61		25
65		34
67		39
70		50
74		61

- Figura 4.3 Representación gráfica de la evolución temporal de una célula BESM infectada por un tripomastigote del clon CA-I/73.
- Tabla 4.3. Evolución temporal del número de amastigotes durante el ciclo intracelular del clon CA-I/73 de T. cruzi.
- Tabla 4.3 A. Detalle de la duración del período lag (en horas) para cada célula infectada estudiada, el período lag medio y el error estándar para el clon CA-I/73.
- Tabla 4.3 B. Resumen de los tiempos de duplicación (en horas) de la fase exponencial de crecimiento para cada ciclo intracelular estudiado, el tiempo de duplicación medio y el error estándar del clon CA-I/73.

FIG. 4.3

CLON CA-I/73

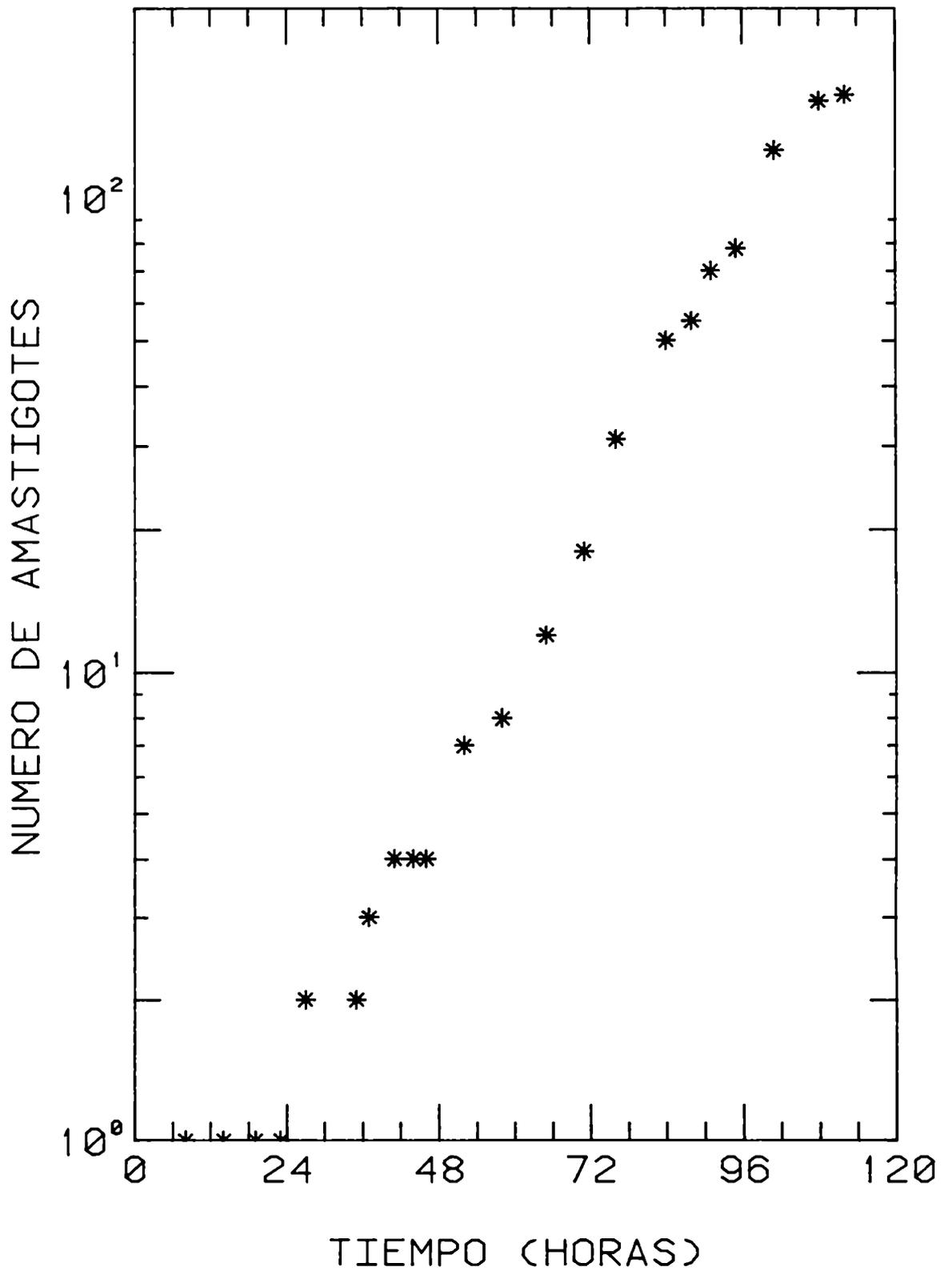


TABLA 4.3

CLON CA-I/73

TIEMPO (HORAS)	NUMERO DE AMASTIGOTES
8	1
14	1
19	1
23	1
27	2
35	2
37	3
41	4
44	4
46	4
52	7
58	8
65	12
71	18
76	31
84	50
88	55
91	70
95	78
101	126
108	160
112	165

TABLA 4.3A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
 MENTALES Y ESTADISTICOS DEL CICLO INTRA-
 CELULAR (P.LAG/CEL.) DEL CLON CA-I/73

PERIODO	LAG
CELULA No.	HORAS
1	21.3
2	18.1
3	20.9
4	20.1
5	23.2
6	25.1
7	22.6
8	21.3
9	24.4
10	22.6
11	21.7
12	20.9
13	19.5
14	24.0
15	24.0
16	19.2

P. LAG MEDIA = 21.82 HORAS
 ERROR ESTANDARD = 0.505

TABLA 4.3B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DEL CICLO INTRA-
CELULAR (T.D./CEL.) DEL CLON CA-I/73

TIEMPOS DE DUPLICACION

CELULA No.	HORAS
1	11.0
2	11.6
3	10.7
4	12.1
5	12.8
6	12.5
7	11.7
8	11.6
9	12.9
10	12.4
11	12.6
12	12.2
13	11.2
14	11.4
15	13.5
16	11.8

T.D. MEDIA = 12.01 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.190

Figura 4.4. Representación gráfica de la fase exponencial de crecimiento intracelular del clon CA-I/73. Mediante la regresión de la curva se determinó el período lag (en horas), el tiempo de duplicación de los amastigotes (en horas) y el coeficiente de correlación (r).

Tabla 4.4. Variación temporal (en horas) del número de amastigotes en una célula BESM infectada por un parásito para el clon CA-I/73, durante su fase de crecimiento exponencial.

FIG 4 4

CLON CA-I/73

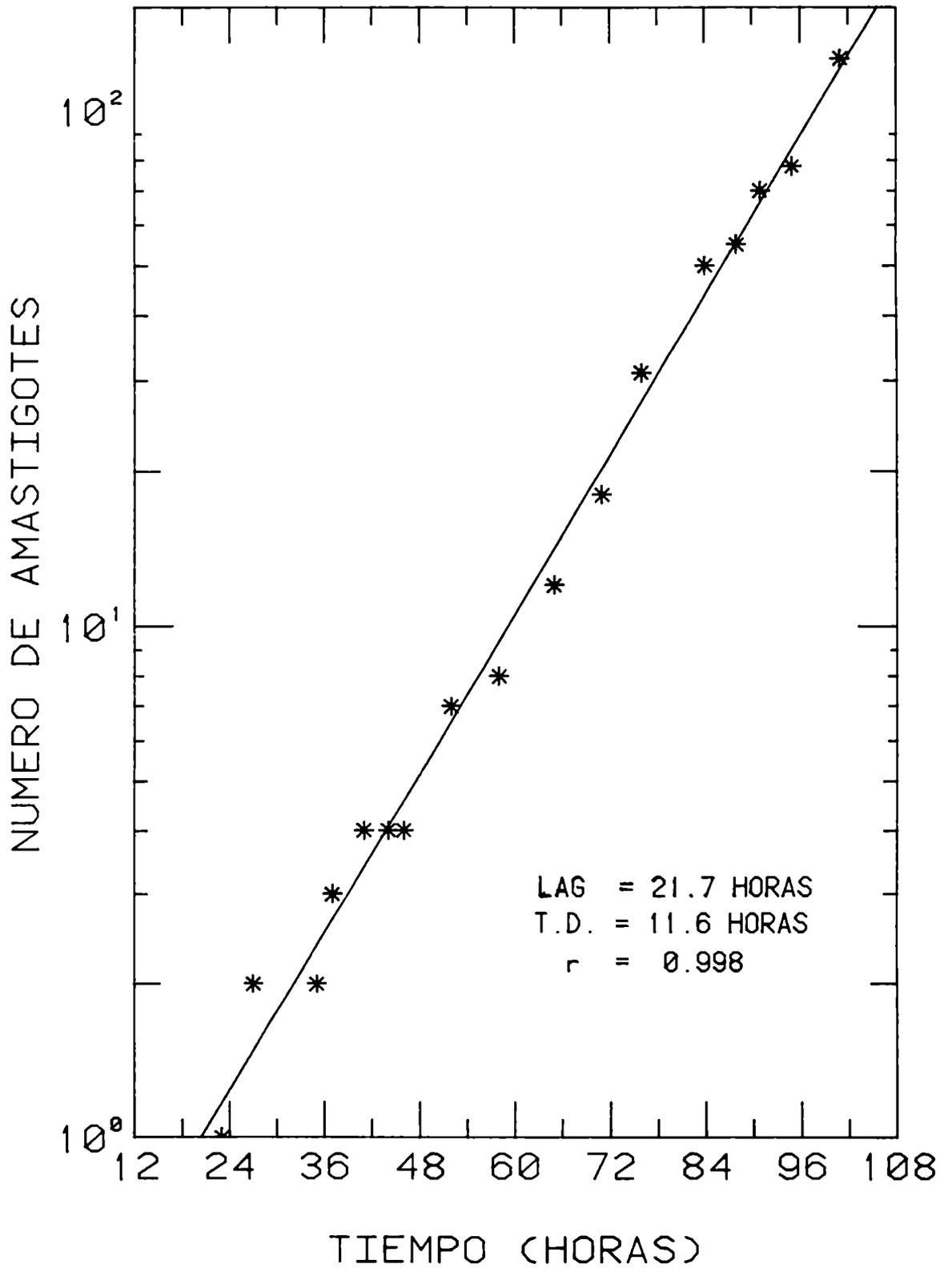


TABLA 4.4 CLON CA-I/73

TIEMPO (HORAS)	NUMERO DE AMASTIGOTES
23	1
27	2
35	2
37	3
41	4
44	4
46	4
52	7
58	8
65	12
71	18
76	31
84	50
88	55
91	70
95	78
101	126

- Figura 4.5. Representación gráfica de la evolución temporal de una célula BESM infectada por un tripomastigote del clon Miranda/78.
- Tabla 4.5. Evolución temporal del número de amastigotes durante el ciclo intracelular del clon Miranda/78.
- Tabla 4.5 A. Detalle de la duración del período lag (en horas) para cada célula infectada estudiada, el período lag medio y el error estandard para el clon Miranda/78.
- Tabla 4.5 B. Resumen de los tiempos de duplicación (en horas) de la fase exponencial de crecimiento para cada ciclo intracelular estudiado, el tiempo de duplicación medio y el error estandard del clon Miranda/78.

FIG. 4.5 CLON MIRANDA/78

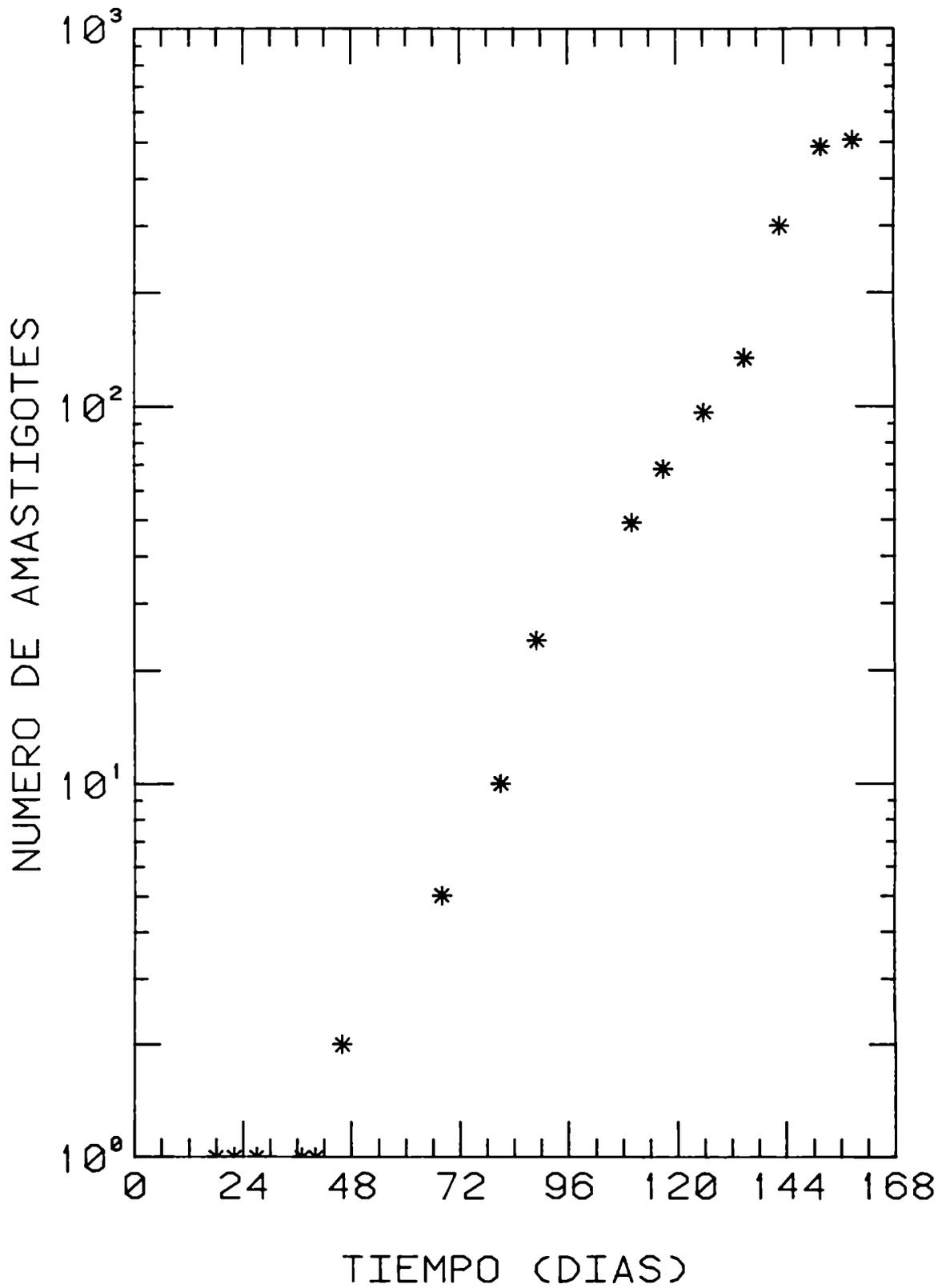


TABLA 4.5 CLON MIRANDA/78

TIEMPO (HORAS)	NUMERO DE AMASTIGOTES
18	1
22	1
27	1
37	1
40	1
46	2
68	5
81	10
89	24
110	49
117	68
126	96
135	134
143	300
152	485
159	505

TABLA 4.5A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
 MENTALES Y ESTADISTICOS DEL CICLO INTRA-
 CELULAR (P.LAG/CEL.) DEL CLON MIRANDA/78

PERIODO	LAG
CELULA No.	HORAS
1	24.8
2	24.8
3	26.9
4	25.4
5	28.0
6	26.2
7	27.1
8	25.5
9	29.9
10	27.3
11	27.2
12	28.1
13	24.3
14	26.1
15	24.8
16	25.1
17	25.6
18	26.3
19	26.7
20	24.8

P. LAG MEDIA = 26.25 HORAS
 ERROR ESTANDARD = 0.315

TABLA 4.5B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DEL CICLO INTRA-
CELULAR (T.D./CEL.) DEL CLON MIRANDA/78

TIEMPOS DE DUPLICACION

CELULA No.	HORAS
1	12.1
2	11.9
3	11.3
4	12.3
5	12.4
6	15.2
7	14.8
8	16.2
9	14.8
10	14.2
11	13.6
12	12.6
13	13.4
14	12.4
15	13.8
16	12.9
17	14.3
18	12.2
19	13.8
20	12.3
21	13.0

T.D. MEDIA = 13.3 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.275

Figura 4.6. Representación gráfica de la fase exponencial de crecimiento intracelular del clon Miranda/78. Mediante la regresión de la curva se determinó el período lag (en horas), el tiempo de duplicación de los amastigotes (en horas) y el coeficiente de correlación (r).

Tabla 4.6. Variación temporal (en horas) del número de amastigotes en una célula BESM infectada por un parásito para el clon Miranda/78, durante su fase de crecimiento exponencial.

FIG. 4.6

CLON MIRANDA/78

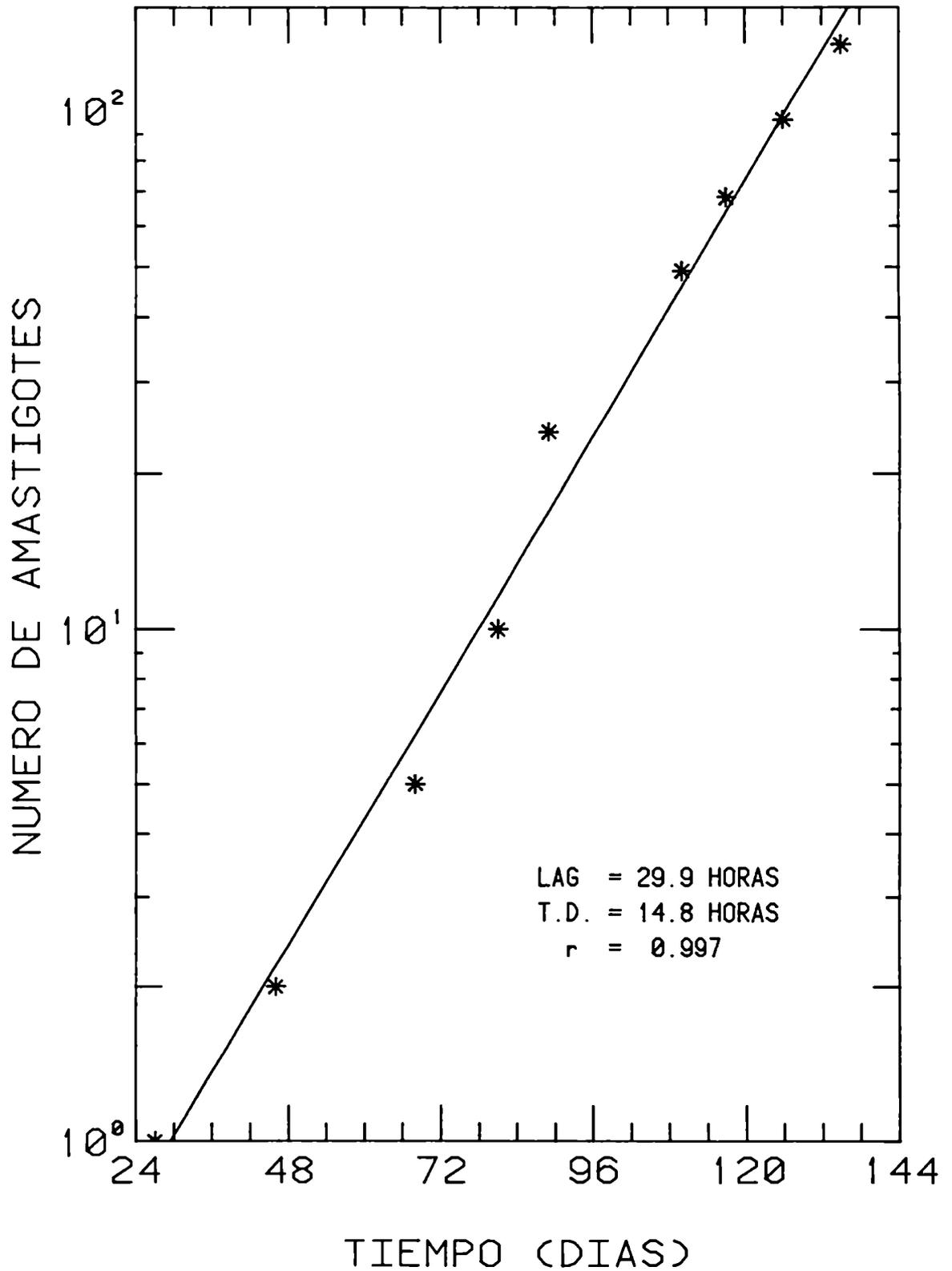
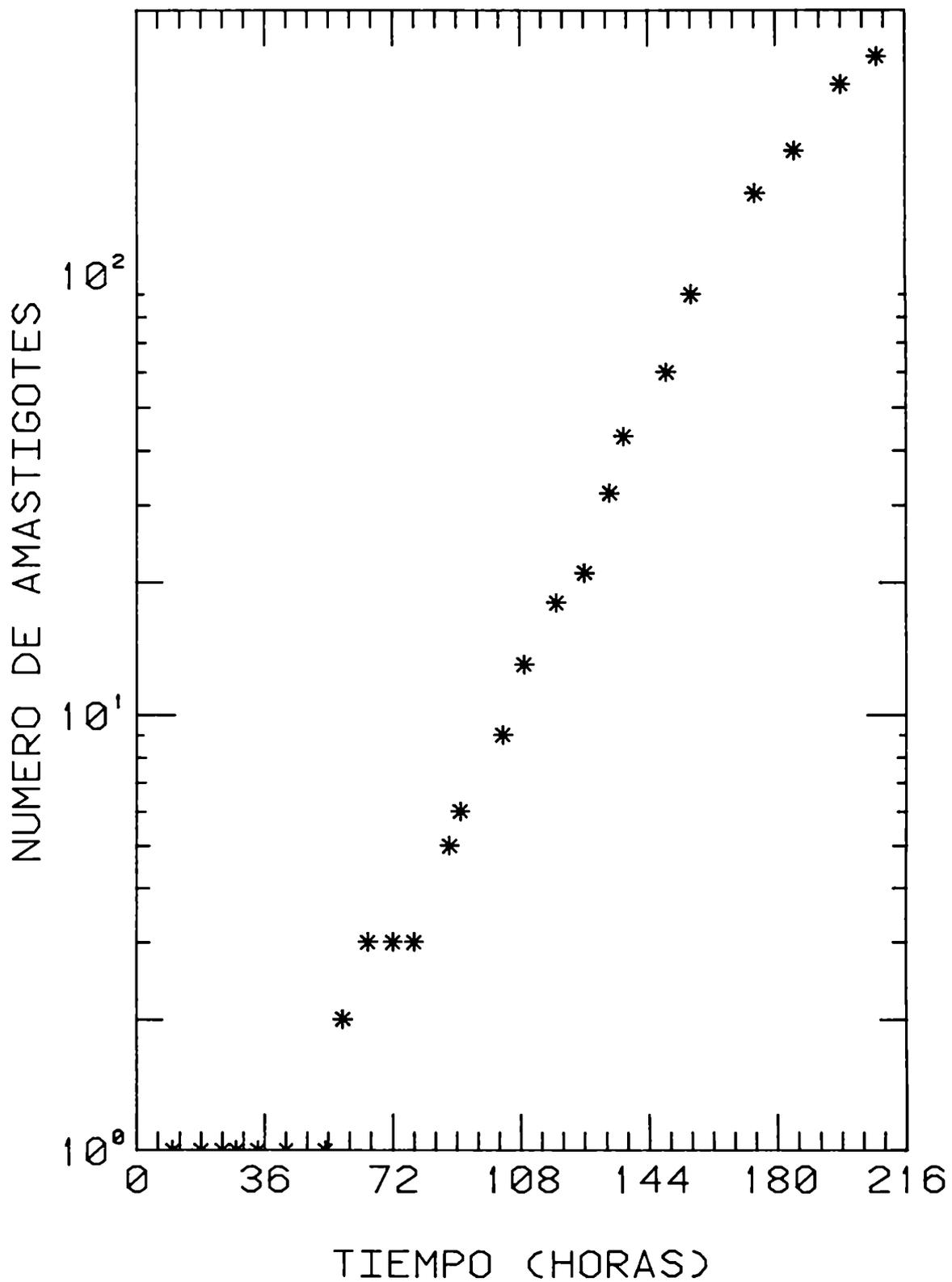


TABLA 4.6 CLON MIRANDA/78

TIEMPO (HORAS)	NUMERO DE AMASTIGOTES
27	1
46	2
68	5
81	10
89	24
110	49
117	68
126	96
135	134

- Figura 4.7. Representación gráfica de la evolución temporal de una célula infectada por un tripomastigote del clon Miranda/80.
- Tabla 4.7. Evolución temporal del número de amastigotes durante el ciclo intracelular del clon Miranda/80 de T. cruzi.
- Tabla 4.7 A. Detalle de la duración del período lag (en horas) para cada célula infectada, el período lag medio y el error estándar para el clon Miranda/80.
- Tabla 4.7 B. Resumen de los tiempos de duplicación (en horas) de la fase exponencial de crecimiento para cada ciclo intracelular estudiado, el tiempo de duplicación medio y el error estándar del clon Miranda/80.

FIG. 4.7 CLON MIRANDA/80



TIEMPO (HORAS)	NUMERO DE AMASTIGOTES
10	1
18	1
24	1
28	1
34	1
42	1
53	1
58	2
65	3
72	3
78	3
88	5
91	6
103	9
109	13
118	18
126	21
133	32
137	43
149	60
156	90
174	153
185	191
198	270
208	312

TABLA 4.7A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
 MENTALES Y ESTADISTICOS DEL CICLO INTRA-
 CELULAR (P.LAG/CEL.) DEL CLON MIRANDA/80

CELULA No.	PERIODO LAG HORAS
1	38.0
2	39.0
3	35.6
4	34.6
5	32.4
6	31.1
7	32.2
8	38.9
9	30.6
10	32.2
11	38.3
12	38.8
13	32.3
14	29.0
15	32.4
16	35.3
17	28.8
18	33.3
19	36.2

P. LAG MEDIA = 34.15 HORAS
 ERROR ESTANDARD = 0.772

TABLA 4.7B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERI-
MENTALES Y ESTADISTICOS DEL CICLO INTRA-
CELULAR (T.D./CEL.) DEL CLON MIRANDA/80

TIEMPOS DE DUPLICACION

CELULA No.	HORAS
1	20.5
2	19.7
3	21.0
4	23.4
5	20.6
6	21.6
7	20.1
8	21.2
9	24.8
10	24.5
11	23.0
12	19.0
13	19.6
14	19.7
15	21.4
16	18.5
17	24.7
18	23.2
19	21.0

T.D. MEDIA = 21.45 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.448

Figura 4.8. Representación gráfica de la fase exponencial de crecimiento intracelular del clon Miranda/80. Mediante la regresión de la curva se determinó el período lag (en horas), el tiempo de duplicación de los amastigotes (en horas) y el coeficiente de correlación (r).

Tabla 4.8. Variación temporal (en horas) del número de amastigotes en una célula BESM infectada por un parásito del clon Miranda/80, durante su fase de crecimiento exponencial.

FIG. 4.8 CLON MIRANDA/80

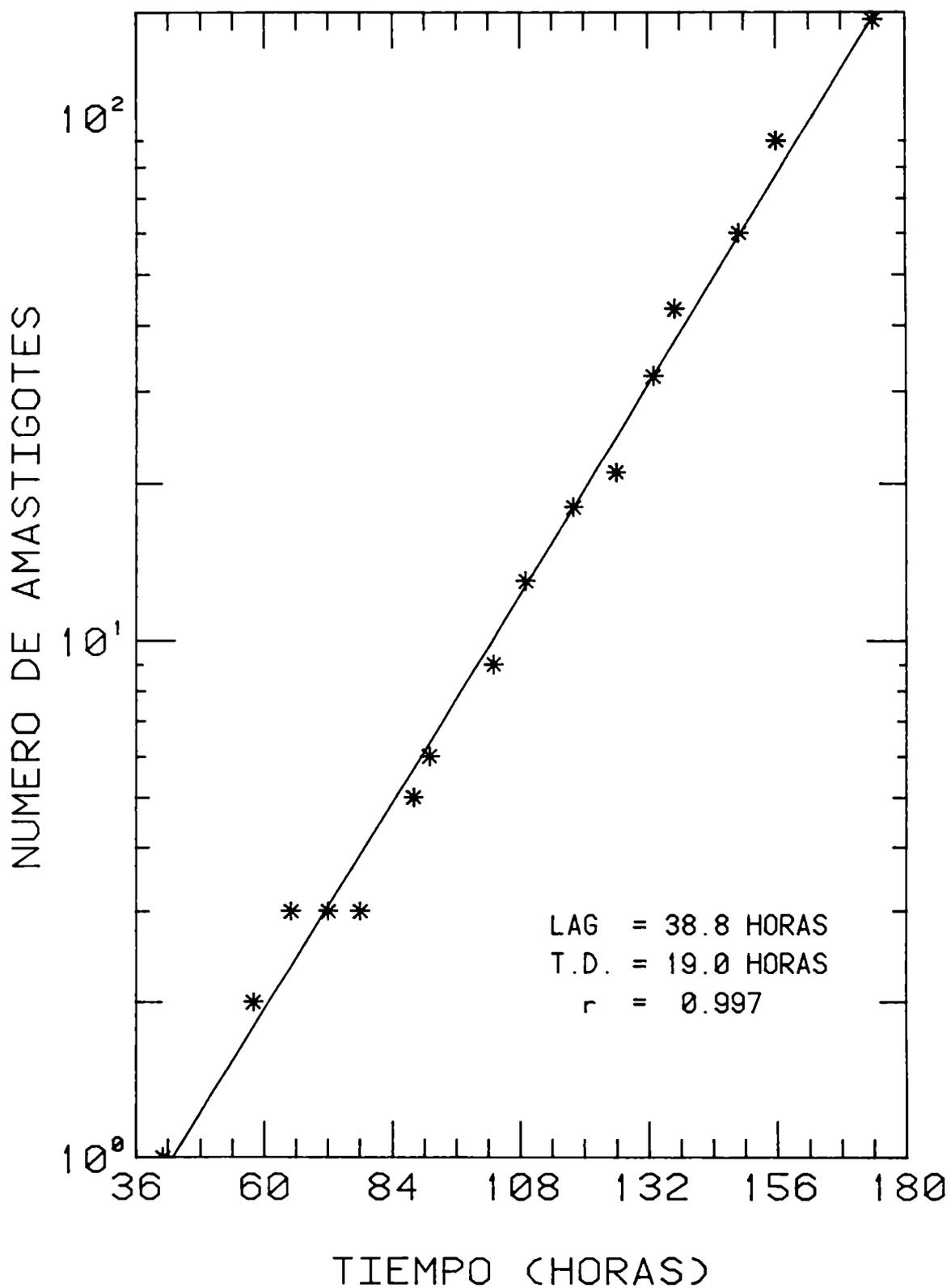


TABLA 4.8 CLON MIRANDA/80

TIEMPO (HORAS)	NUMERO DE AMASTIGOTES
36	1
58	2
65	3
72	3
78	3
88	5
91	6
103	9
109	13
118	18
126	21
133	32
137	43
149	60
156	90
174	153

FIG. 4.9 CLON SILVIO-X10/5

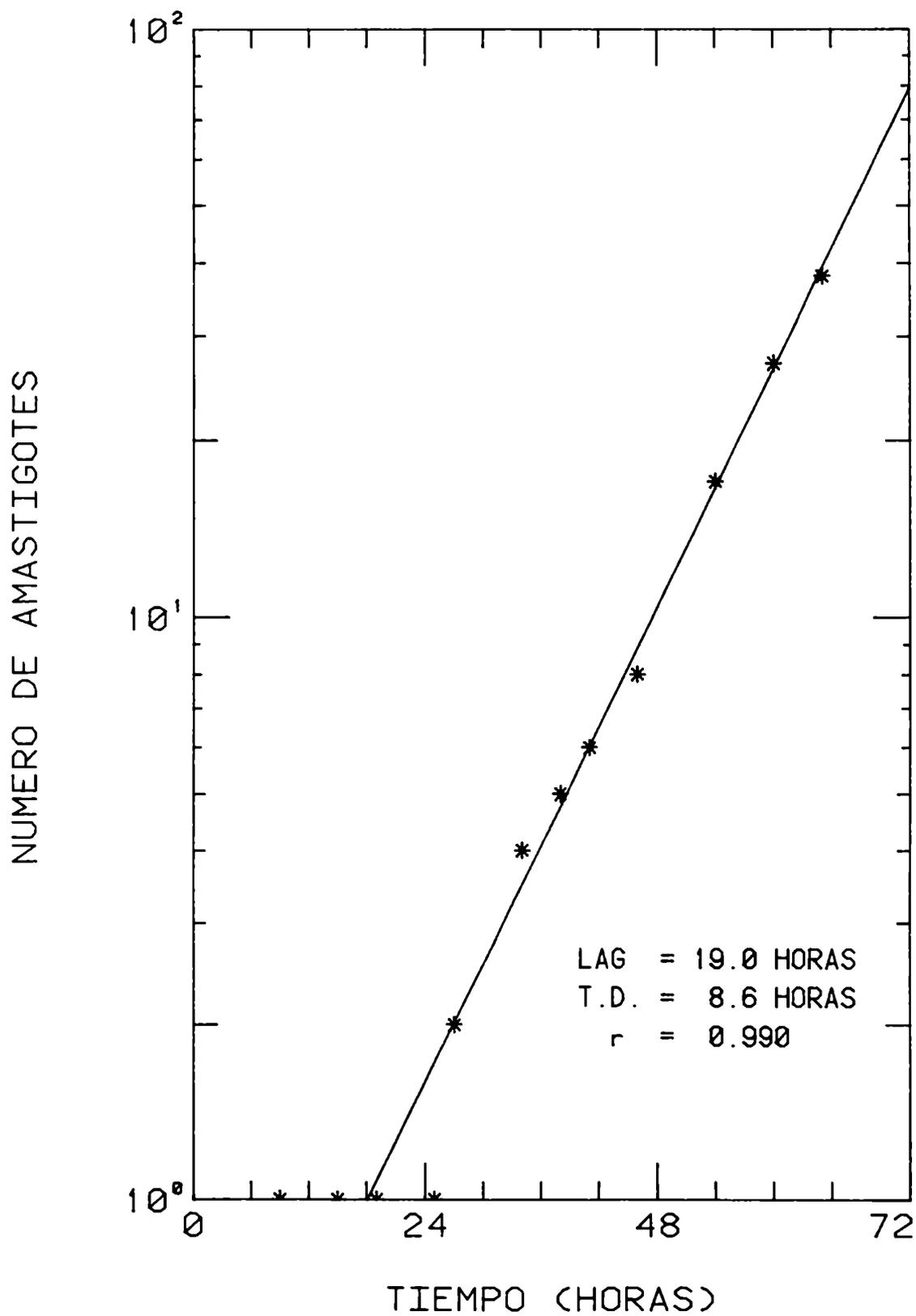


TABLA 4.9 CLON SILVIO-X10/5

TIEMPO (HORAS)	NUMERO DE AMASTIGOTES
9	1
15	1
19	1
25	1
27	2
34	4
38	5
41	6
46	8
54	17
60	27
65	38

TABLA 4.9A RESUMEN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES Y ESTADISTICOS DEL CICLO INTRACELULAR (P.LAG/CEL.) DEL CLON SILVIO-X10/5

CELULA No.	PERIODO LAG HORAS
1	17.8
2	18.2
3	18.4
4	19.0
5	19.0
6	18.4
7	17.7
8	17.5
9	17.8
10	18.4
11	17.9
12	18.9
13	17.9

P. LAG MEDIA = 18.22 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.141

TABLA 4.9B RESUMEN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES Y ESTADISTICOS DEL CICLO INTRACELULAR (T.D./CEL.) DEL CLON SILVIO-X10/5

TIEMPOS DE DUPLICACION

CELULA No.	HORAS
1	8.9
2	9.1
3	8.7
4	8.6
5	9.0
6	7.5
7	8.3
8	9.2
9	9.2
10	8.6
11	8.5
12	8.3
13	8.1

T.D. MEDIA = 8.61 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.136

- Figura 4.9. Representación gráfica de la fase exponencial de crecimiento intracelular del clon Silvio X10/5. Mediante la regresión de la curva se determinó el período lag (en horas), el tiempo de duplicación de los amastigotes (en horas) y el coeficiente de correlación (r).
- Tabla 4.9. Variación temporal (en horas) del número de amastigotes en una célula BESM infectada por un parásito para el clon Silvio X10/5, durante su fase de crecimiento exponencial.
- Tabla 4.9 A. Detalle de la duración del período lag (en horas) para cada célula infectada, el período lag medio y el error estándar para el clon Silvio X10/5.
- Tabla 4.9 B. Resumen de los tiempos de duplicación (en horas) de la fase exponencial de crecimiento para cada ciclo intracelular estudiado, el tiempo de duplicación medio y el error estándar del clon Silvio X10/5.

Tabla 4.10. Resumen de las diferencias halladas entre los tiempos de duplicación de los amastigotes y epimastigotes, el período lag y la duración del ciclo intracelular total para los cinco clones de T. cruzi estudiados.

TABLA 4.10 DIFERENCIAS EN LOS CICLOS INTRA-
CELULARES EN CLONES DE T. CRUZI

CLON	TIEMPOS DE DUPLICACION			
	LIT	CULTIVO DE CELULAS		
	EPIMASTIGOTES (HORAS)	AMASTIGOTES (HORAS)	PERIODO LAG (HORAS)	CICLO TOTAL (Hs.)
CA-I/72	31.8 \pm 1.1	10.3 \pm 0.3	22.2 \pm 0.4	108
CA-I/73	36.5 \pm 1.6	12.0 \pm 0.2	21.8 \pm 0.5	120
MIRANDA/78	46.6 \pm 2.2	13.3 \pm 0.3	26.3 \pm 0.3	165
MIRANDA/80	58.4 \pm 1.5	21.5 \pm 0.5	34.2 \pm 0.8	215
SILVIO/5	22.5 \pm 0.8	8.6 \pm 0.1	18.2 \pm 0.1	---

Figura 4.11. Representación gráfica de la relación entre los tiempos de duplicación de epimastigotes cultivados en medio LIT a 26°C y de amastigotes en células BESM a 37°C en clones de T. cruzi.

Figura 4.11 A. Representación gráfica de la correlación entre los estadíos reproductivos de los clones CA-I/72, CA-I/73, Miranda/78, Miranda/80 y Silvio X10/5 de T. cruzi, definida por la ecuación $\hat{y} = a + b/x$; $y =$ T.D. epimastigotes (en horas); $x =$ T.D. amastigotes (en horas); $a = 83,2$; $b = -526,36$; siendo $r = 0,988$.

FIG. 4.11 RELACION ENTRE EL TIEMPO DE DUPLICACION DE EPIMASTIGOTES Y AMASTIGOTES EN CLONES DE T. CRUZI

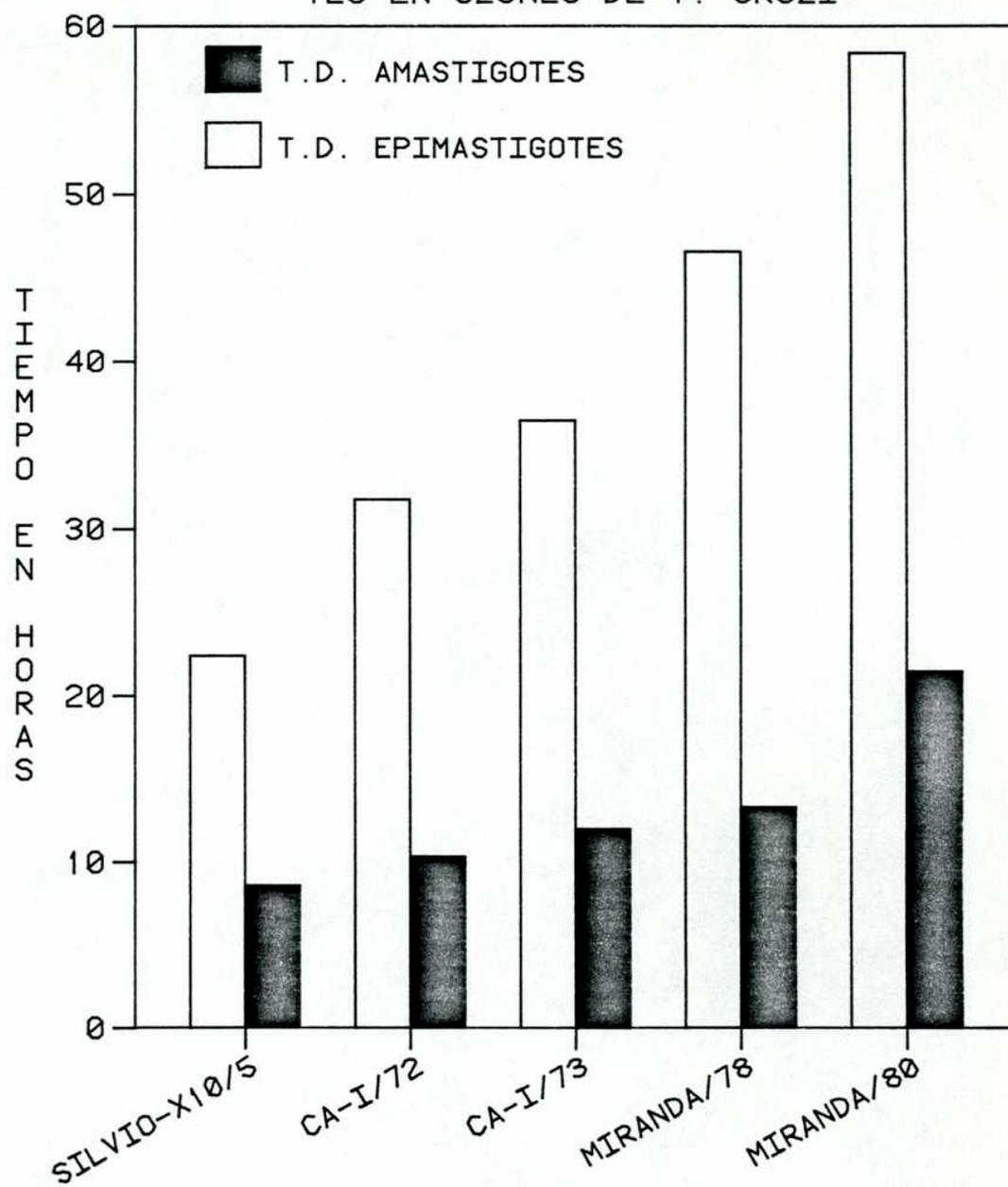


FIG. 4.11A CORRELACION ENTRE EL TIEMPO DE DUPLICACION DE EPIMASTIGOTES Y AMASTIGOTES EN CLONES DE T. CRUZI

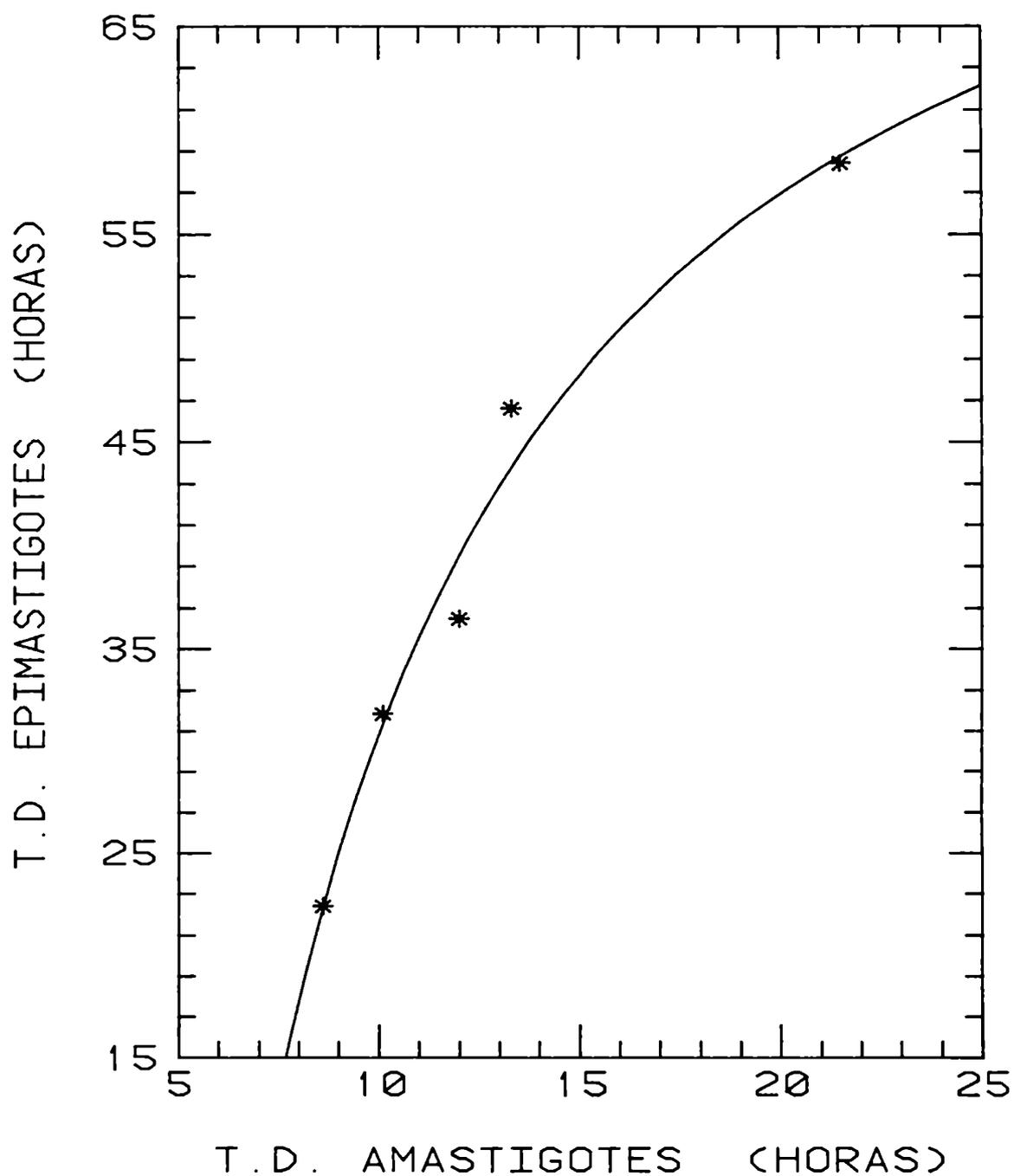


Figura 4.12. Representación gráfica de la relación entre el período lag y el tiempo de duplicación de amastigotes en clones de T. cruzi.

Figura 4.12 A. Representación gráfica de la correlación existente entre el período lag y el tiempo de duplicación de amastigotes para los clones de T. cruzi estudiados definida por la ecuación: $y = x/(a+bx)$; y = período lag (en horas); x =T.D. amastigotes (en horas); $a = 0,36$; $b = 0,012$; siendo $r = 0,982$.

FIG. 4.12 VARIACIONES EN EL PERIODO LAG Y TIEMPO DE DUPLICACION DE AMASTIGOTES EN CLONES DE T. CRUZI

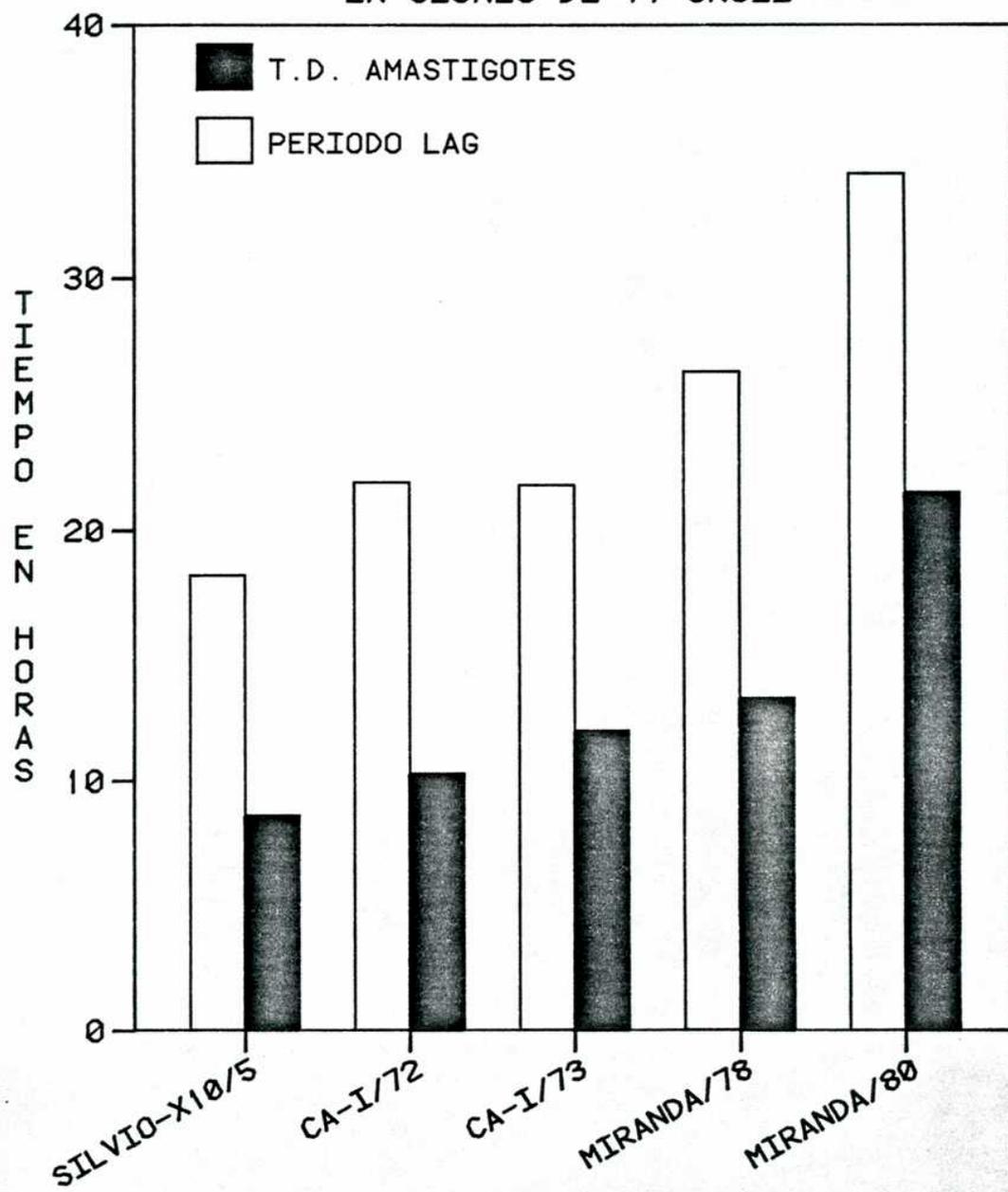
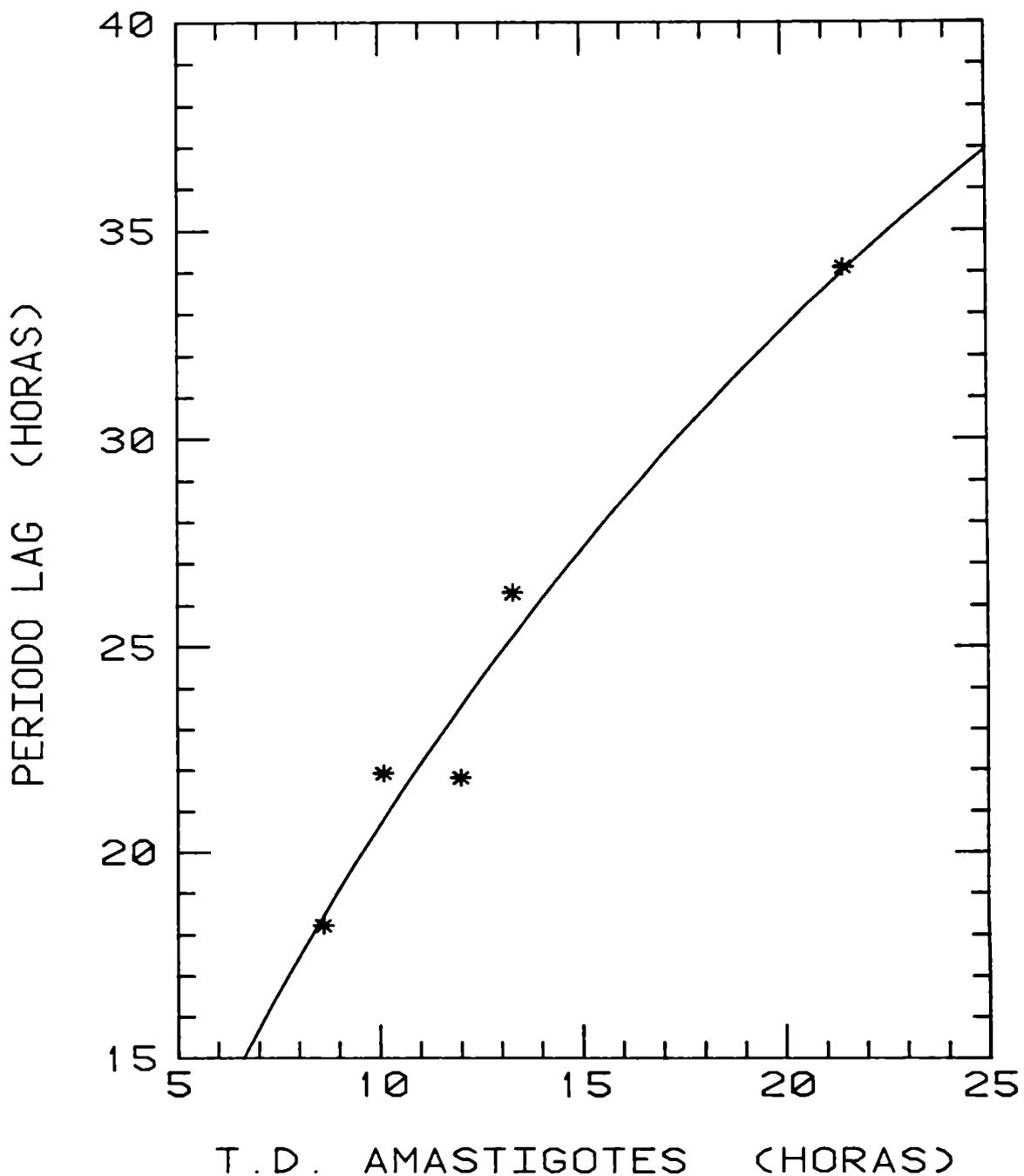


FIG. 4.12A CORRELACION ENTRE EL PERIODO LAG Y EL TIEMPO DE DUPLICACION DE AMASTIGOTES EN CLONES DE T. CRUZI



- Figura 5.1. Histogramas de DNA obtenidos por Citometría por Flujo Laminar. Los dos perfiles superiores corresponden a cultivos de epimastigotes en fase de crecimiento exponencial, el histograma inferior izquierdo corresponde a epimastigotes en fase estacionaria de crecimiento, mientras que el histograma inferior derecho corresponde a tripomastigotes obtenidos de cultivo de células.
- Figura 5.2. Representación gráfica de dos histogramas de DNA obtenidos por Citometría por Flujo Laminar correspondiente a los clones CA-I/64 y Miranda/80, indicando las diferentes localizaciones de los respectivos picos G1.
- Figura 5.3. Representación gráfica del contenido total de DNA/organismo obtenido por Citometría por Flujo Laminar de 19 clones y de la cepa Tulahuen de T. cruzi. Leyendas: T= cepa Tulahuen, (59-73)= clones CA-I, (75-91) = clones Miranda.
- Figura 5.4. Histograma de la intensidad de fluorescencia media obtenida por microespectrofluorometría del núcleo, kinetoplasto y DNA total/organismo de cuatro clones de T. cruzi.

FIG. 5.1 HISTOGRAMAS DE DNA DE EPIMASTIGOTES
TOMADOS A DISTINTOS TIEMPOS DE EVOLUCION DE
UN CULTIVO Y TRYPOMASTIGOTES DE T. CRUZI

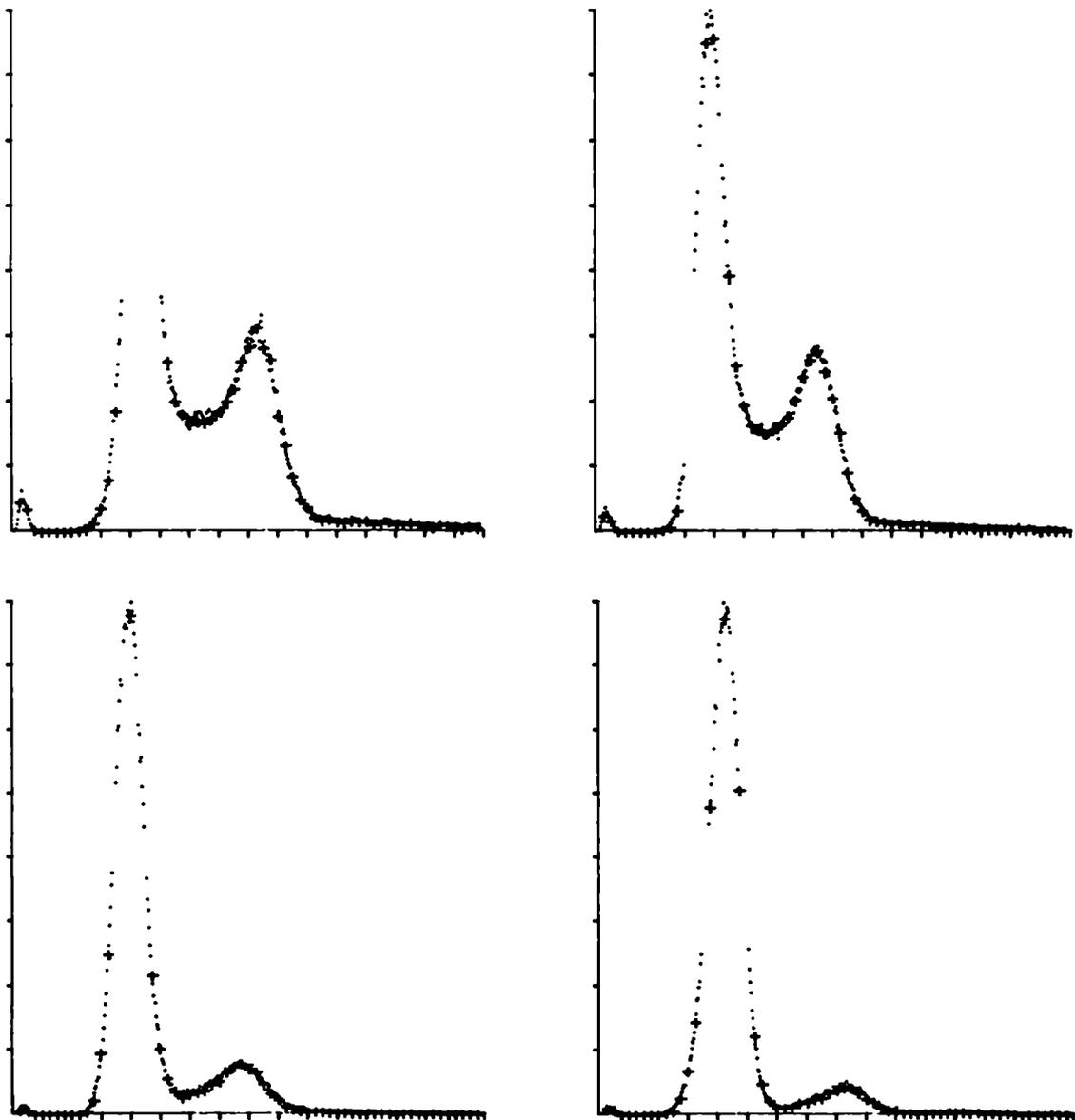


FIG 5.2 DIFERENCIAS EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA CORRESPONDIENTE AL DNA TOTAL/PARASITO DE LOS CLONES CA-I/64 Y MIRANDA/80

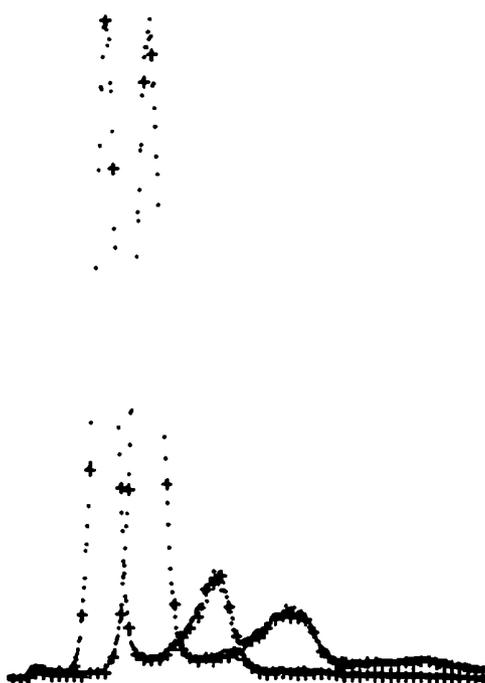


FIG. 5.3 DIFERENCIAS EN EL DNA
TOTAL/ORGANISMO DE 19 CLONES DE
T. CRUZI Y LA CEPA TULAHUEN

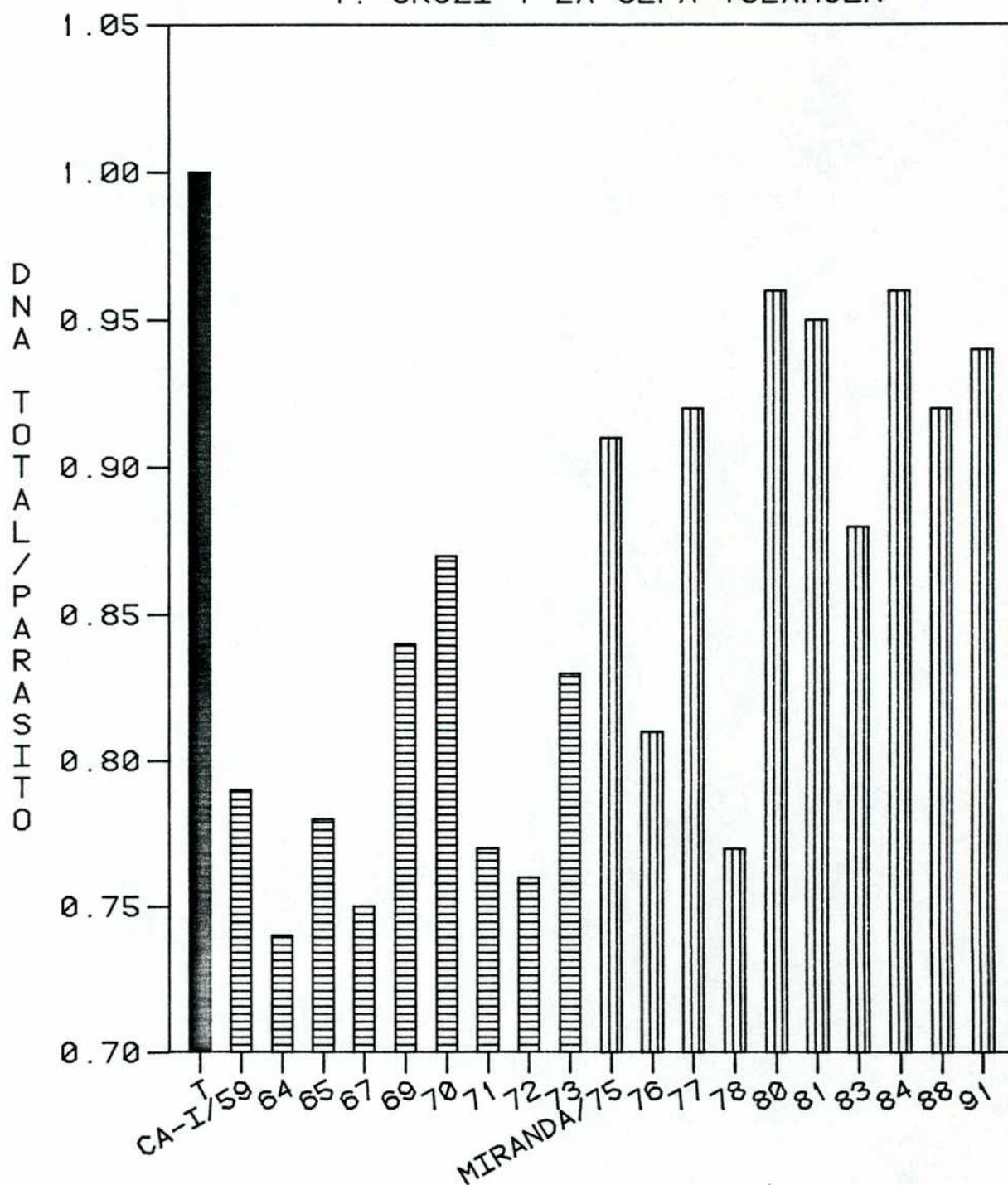


FIG. 5.4 DIFERENCIAS EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DEL NUCLEO, KINETOPLASTO Y DNA TOTAL/PARASITO DE CLONES DE T. CRUZI

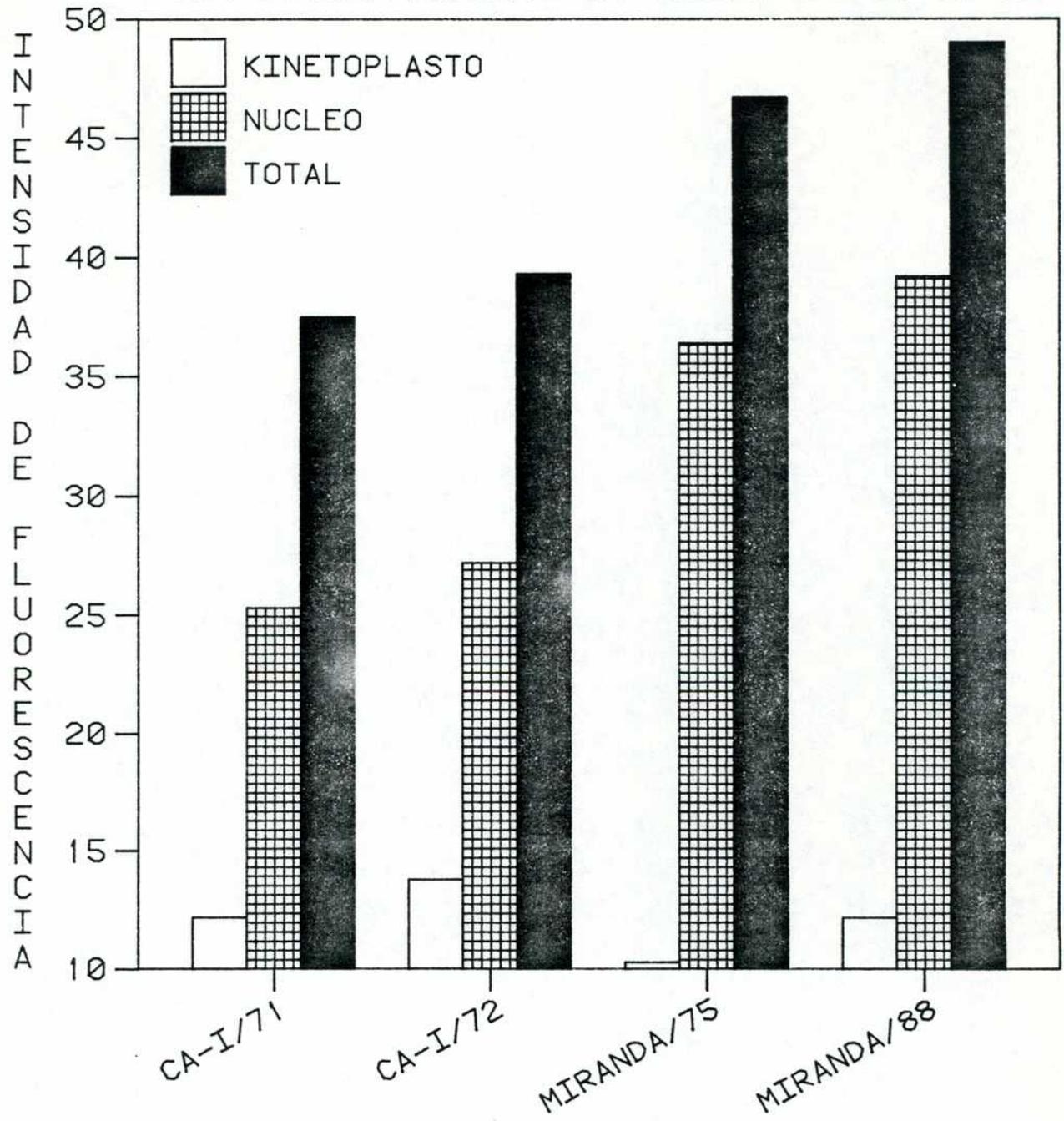


Figura 6.1. Representación gráfica de dos curvas de crecimiento en fase exponencial, correspondientes a dos concentraciones iniciales de epimastigotes del clon Miranda/83 de T. cruzi, en medio de cultivo LIT a 26°C.

Tablas 6.1A-6.1B. Representación de la variación temporal de la concentración de epimastigotes/ml durante la fase de crecimiento exponencial del clon Miranda/83, representada gráficamente en la Figura 6.1.

FIG. 6.1 CLON MIRANDA/83

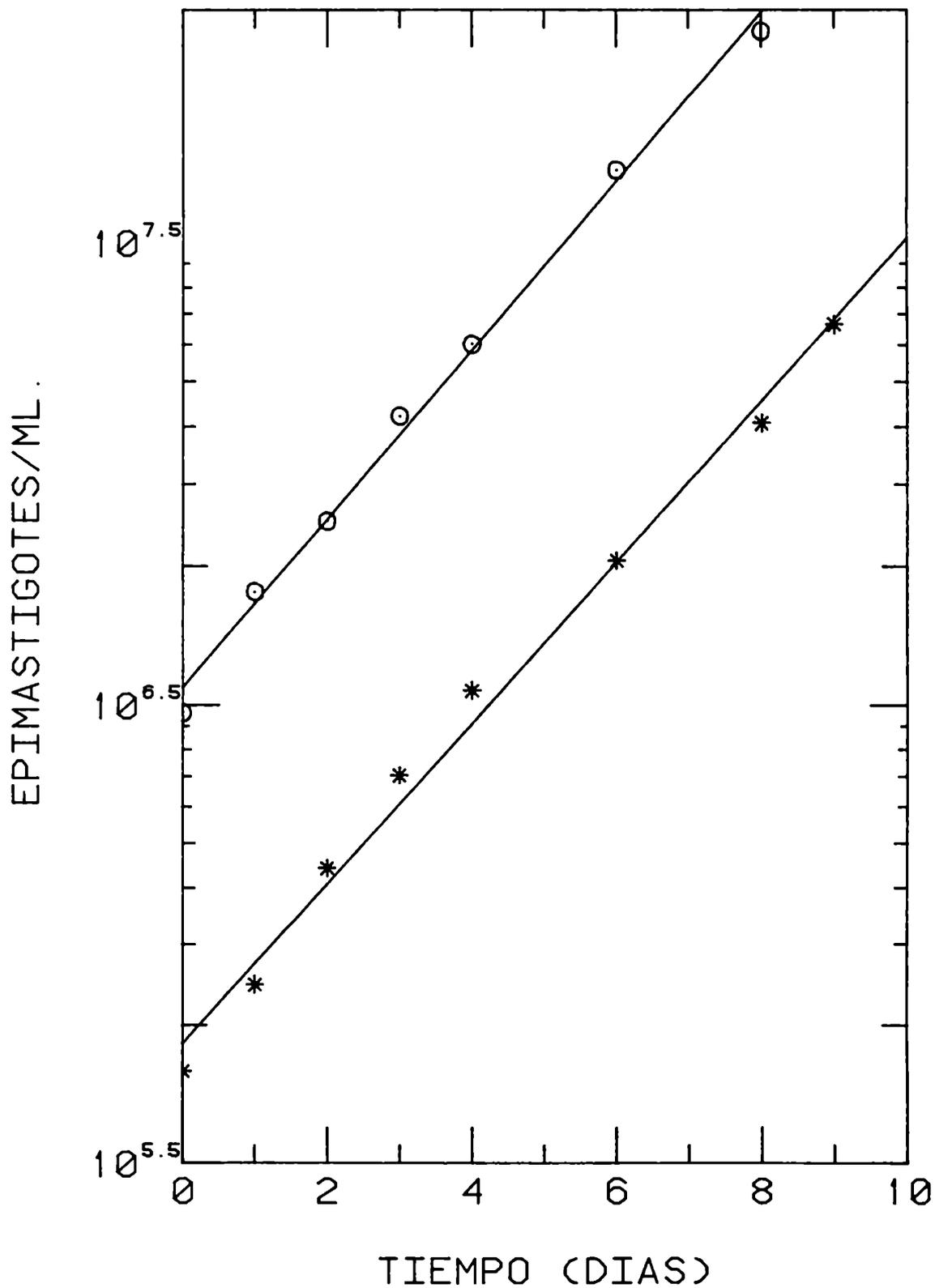


TABLA 6.1A CLON MIRANDA/83	
TIEMPO (DIAS)	EPIMASTIGOTES/ML.
0	500301
1	773680
2	1392560
3	2223200
4	3398600
6	6486000
8	12852000
9	20997000

TIEMPO (DIAS)	CLON MIRANDA/83 EPIMASTIGOTES/ML.
0	3039400
1	5549700
2	7897600
3	13280600
4	19052000
6	45138000
8	90068000

Figura 6.2. Representación gráfica de la evolución de dos cultivos no perturbados de amastigotes del clon Miranda/83 en medio LIT a 26°C, en los cuales se observa una primera fase de crecimiento exponencial, una fase estacionaria o de transformación y finalmente una nueva fase de crecimiento.

Tablas 6.2A-6.2B. Representación de la variación temporal de la concentración de parásitos/ml en la evolución de dos cultivos no perturbados de amastigotes del clon Miranda/83, representados gráficamente en la Figura 6.2.

Tabla 6.2 C. Representación de los tiempos de duplicación de amastigotes extracelulares estimados a partir de la primera fase de crecimiento exponencial de cultivos de amastigotes del clon Miranda/83, el tiempo de duplicación medio y el error estándar.

FIG. 6.2 CLON MIRANDA/83

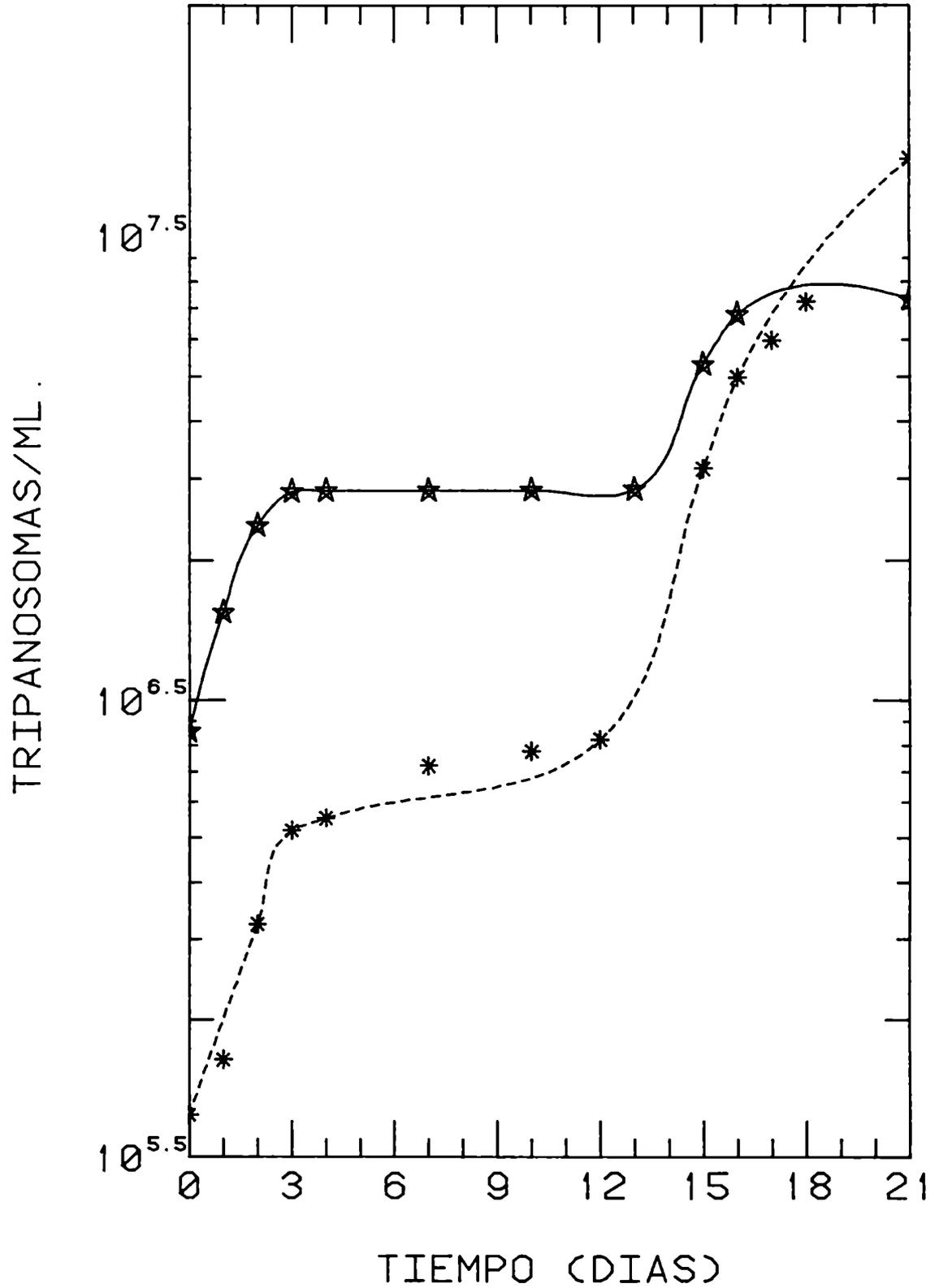


TABLA 6.2A CLON MIRANDA/83
TIEMPO (DIAS) TRIPANOSOMAS/ML.

0	2650000
1	4780400
2	7493100
3	8878000
4	8920800
7	8940800
10	8951700
13	9002800
15	16728400
16	21424000
21	23097000

TIEMPO (DIAS)	TRIPANOSOMAS/ML .
0	395280
1	535880
2	1020200
3	1637800
4	1742560
7	2278600
10	2451280
12	2597360
15	9966800
16	15686800
17	18880700
18	22801000
21	46577000

TABLA 6.2C TIEMPOS DE DUPLICACION EXPERIMENTALES DE AMASTIGOTES EXTRACELULARES EN MEDIO LIT DEL CLON MIRANDA/83

TIEMPOS DE DUPLICACION

CELULA No.	HORAS
1	33.8
2	31.2
3	30.8
4	33.4
5	32.5
6	33.6
7	28.4
8	29.5
9	36.7
10	36.6
11	37.8

T.D. MEDIA = 33.12 HORAS
ERROR ESTANDARD = 0.917

- Figura 6.3. Representación gráfica teórica en la cual se esquematiza la evolución de un cultivo de amastigotes pertenecientes al clon Miranda/83 de T. cruzi, en el cual se realizaron cambios de medio de cultivo al final de cada fase de crecimiento exponencial.
- Figura 6.4. Representación gráfica de la evolución de un cultivo no perturbado de amastigotes pertenecientes al clon Miranda/83 de T. cruzi, en el cual se expresa la transformación de los amastigotes en epimastigotes como porcentaje de amastigotes presentes durante 21 días de evolución del cultivo.
- Figura 6.5. Representación gráfica de la variación del perfil de DNA/organismo durante las primeras 40 horas de evolución de un cultivo de amastigotes del clon Miranda/83 de T. cruzi, en medio de cultivo LIT a 26°C.

FIG. 6.3 CLON MIRANDA/83

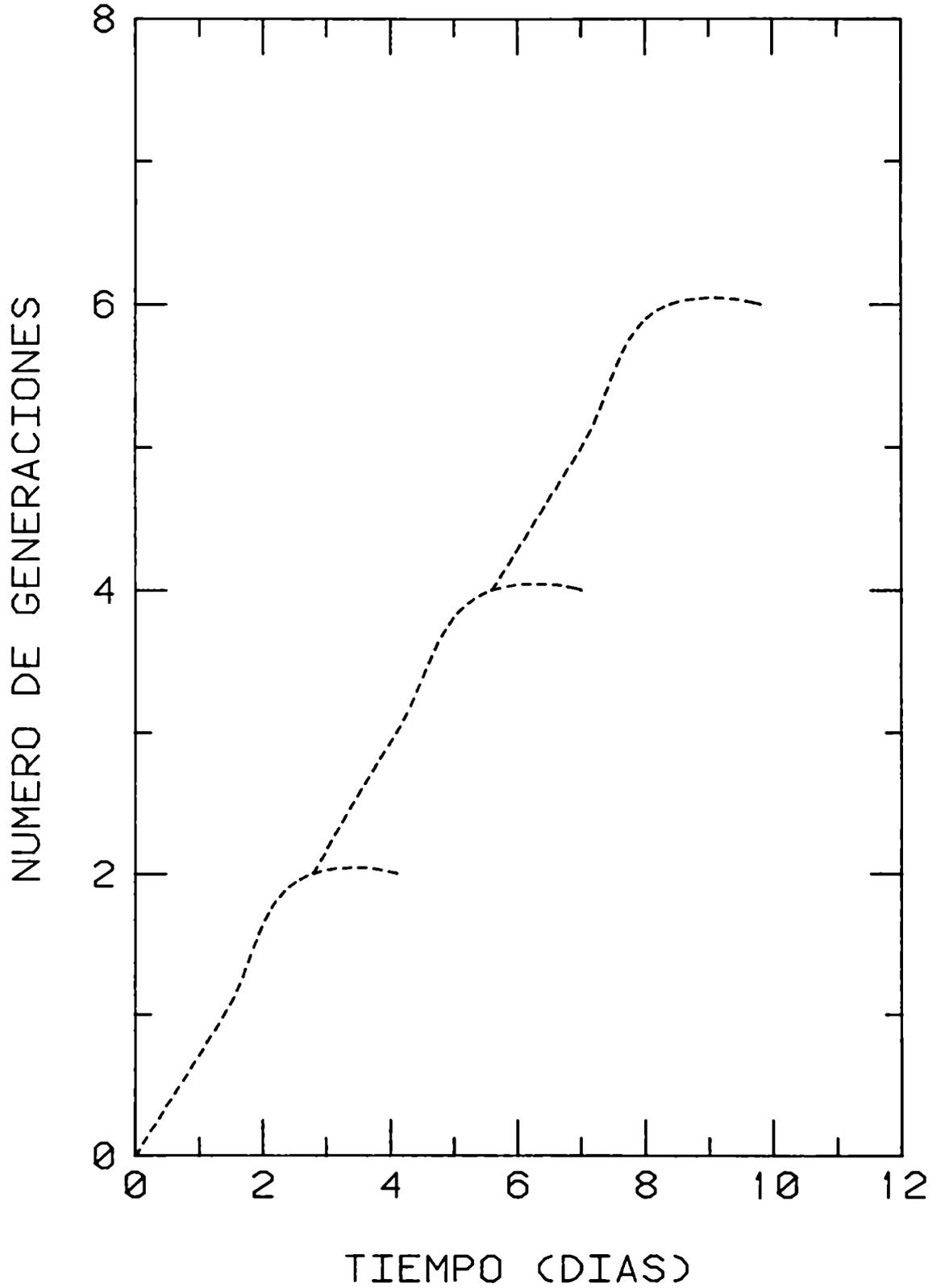


FIG. 6.4 CLON MIRANDA/83

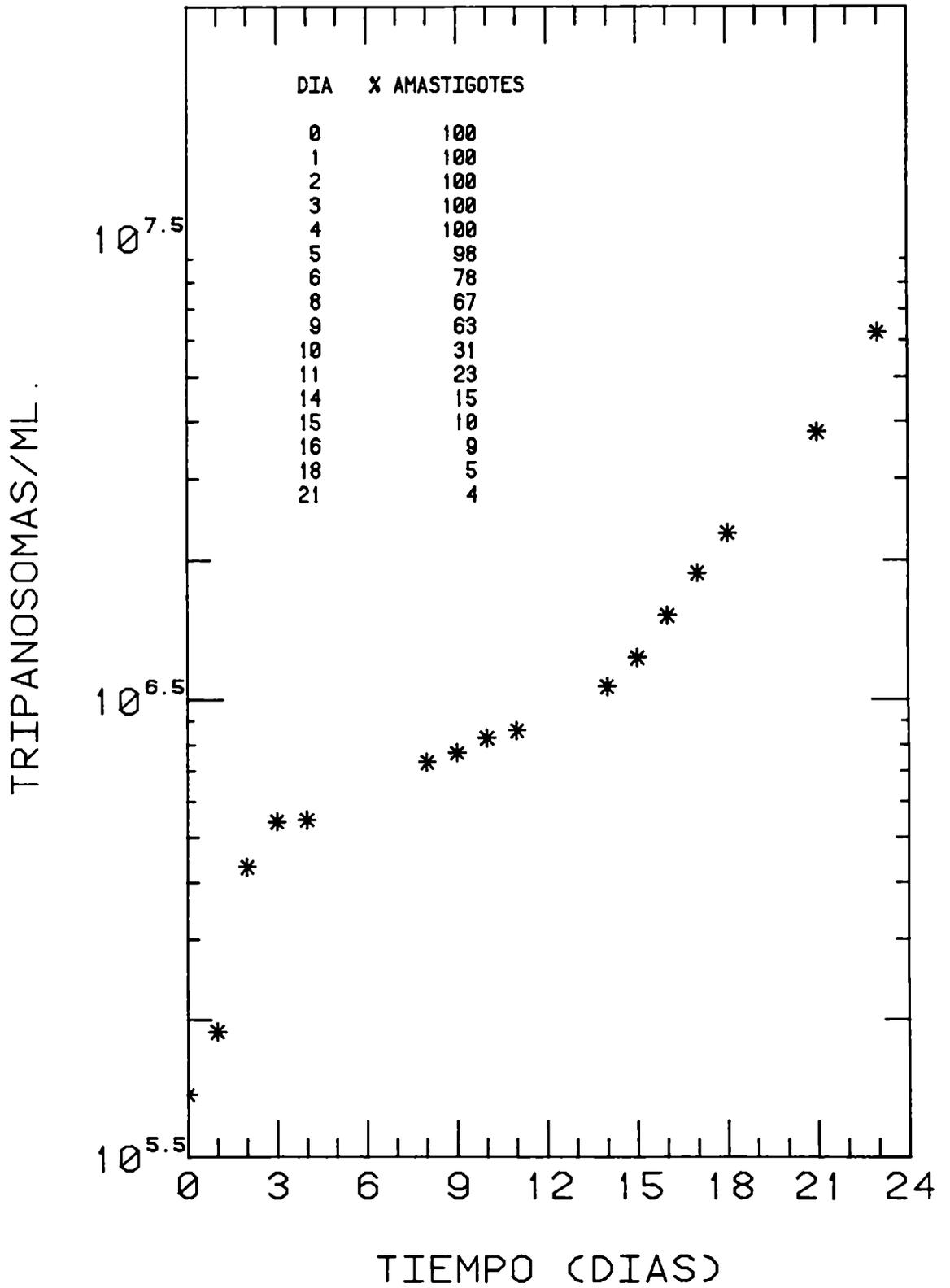
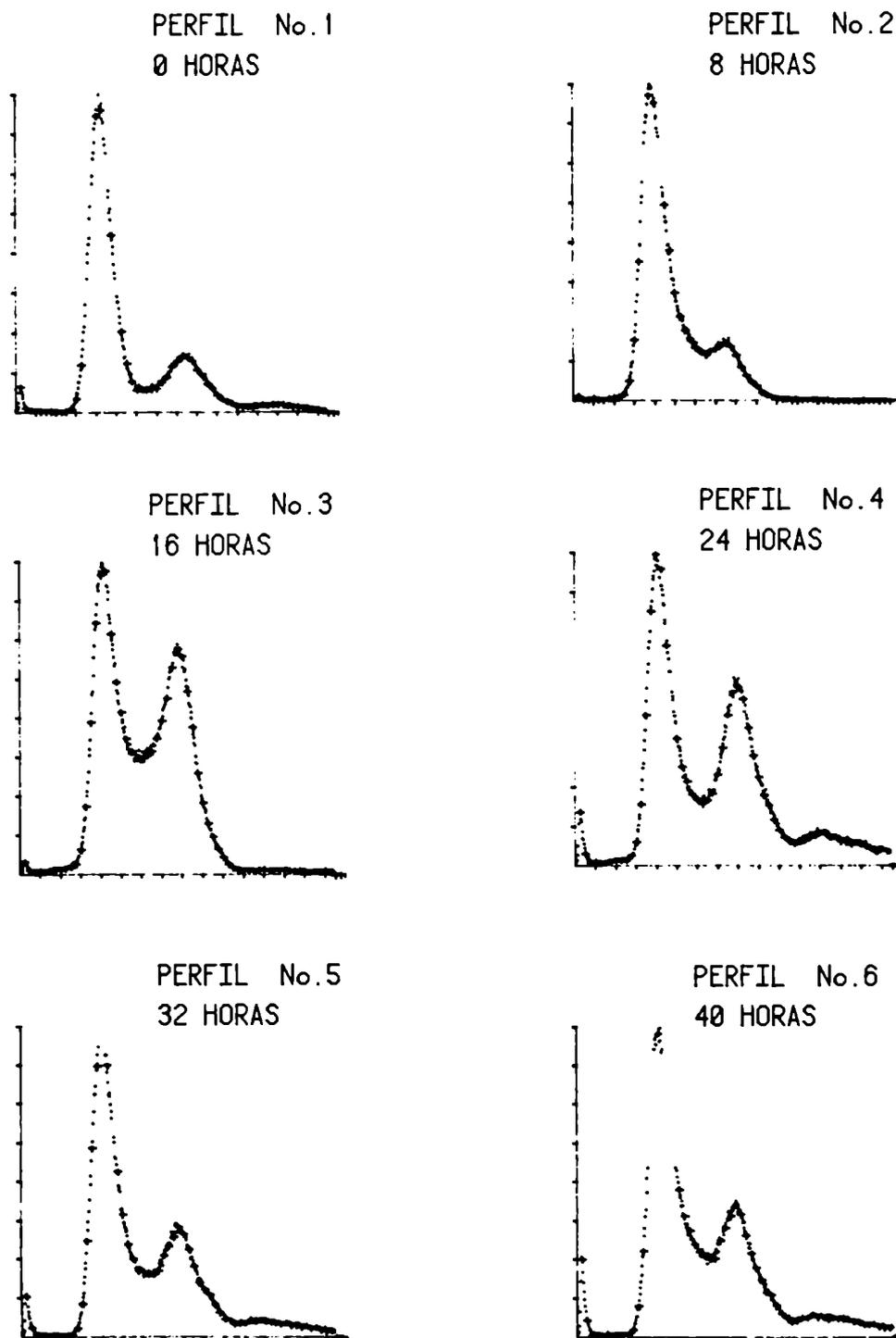


FIG. 6.5 VARIACIONES DE G1, S Y G2 DURANTE LA EVOLUCION DE UN CULTIVO DE AMASTIGOTES DE T. CRUZI



- Foto 1. Microfotografía por contraste de fase de un cultivo de epimastigotes de T. cruzi en el que se observan pequeños acúmulos de amastigotes y epimastigotes (aumento 800X).
- Foto 2. Microfotografía por contraste de fase de un acúmulo de amastigotes de cultivo en medio LIT a 26^oC (aumento 800X).
- Foto 3. Microfotografía por contraste de fase de amastigotes de cultivo dispersados por agitación mecánica (aumento 800X).

