

## Tesis de Posgrado

# Las subpoblaciones de *Trypanosoma Cruzi* presentan diferentes capacidades de penetración : Influencia de factores químicos y biológicos sobre la capacidad de penetración en células de mamífero

Doyle, Patricia Susana

1985

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Doyle, Patricia Susana. (1985). Las subpoblaciones de *Trypanosoma Cruzi* presentan diferentes capacidades de penetración : Influencia de factores químicos y biológicos sobre la capacidad de penetración en células de mamífero. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1906\\_Doyle.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1906_Doyle.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Doyle, Patricia Susana. "Las subpoblaciones de *Trypanosoma Cruzi* presentan diferentes capacidades de penetración : Influencia de factores químicos y biológicos sobre la capacidad de penetración en células de mamífero". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1906\\_Doyle.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1906_Doyle.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

LAS SUBPOBLACIONES DE TRYPANOSOMA CRUZI PRESENTAN DIFERENTES  
CAPACIDADES DE PENETRACION: INFLUENCIA DE FACTORES QUÍMICOS  
Y BIOLÓGICOS SOBRE LA CAPACIDAD DE PENETRACION EN CELULAS DE  
MAMIFERO

AUTOR: PATRICIA SUSANA DOYLE

DIRECTOR: ELSA LEONOR SEGURA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1985

*Tesis 1906  
ej. 2*

## AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Elsa L. Segura, directora de esta Tesis, por guiarme en la realización de este trabajo y por su permanente interés.
- Al Dr. Franklin A. Neva, por permitirme llevar a cabo parte de este trabajo en el Laboratory of Parasitic Diseases.
- A los Dres. James A. Dvorak y Juan C. Engel, cuyas enseñanzas y desinteresado apoyo permanente posibilitaron la realización de este trabajo de Tesis.
- A la Organización Mundial de la Salud, por financiar mis estudios durante un año.
- A James P. Mac Daniel, por su colaboración en el suministro de los cultivos celulares.
- A la Dra. Cristina Wisnivesky-Colli, consejera de estudios.
- A los miembros del Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén".
- A los miembros del Laboratory of Parasitic Diseases, N.I.H.
- A los que colaboraron en la confección e impresión de este trabajo: Nelson Jauregui, Hugo Benitez y Dr. Carlos E. del Prado.

## CAPITULO 1

### INTRODUCCION

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1.1     | Conceptos generales   | 1  |
| 1.1.1   | Epidemiología   | 1  |
| 1.1.2   | Clasificación taxonómica del agente etiológico                                | 2  |
| 1.1.3   | Mecanismos o vías de infección  | 3  |
| 1.1.4   | Formas clínicas de la enfermedad de Chagas                                    | 4  |
| 1.2     | Ciclo de vida del <u>Trypanosoma cruzi</u>                                    | 7  |
| 1.2.2   | Ciclo de vida en el huésped invertebrado                                      | 7  |
| 1.2.2   | Ciclo de vida en el mamífero  | 9  |
| 1.3     | Estadíos del <u>Trypanosoma cruzi</u>   | 11 |
| 1.3.1   | Amastigotes   | 11 |
| 1.3.2   | Epimastigotes   | 12 |
| 1.3.3   | Trípomastigotes   | 14 |
| 1.4     | Las cepas de <u>T. cruzi</u>  | 17 |
| 1.4.1   | Mantenimiento de <u>T. cruzi</u> en el laboratorio                            | 19 |
| 1.5     | La superficie celular de <u>Trypanosoma cruzi</u>                             | 22 |
| 1.5.1   | La membrana plasmática de <u>T. cruzi</u>                                     | 23 |
| 1.5.2   | Utilización de lectinas para el estudio de la superficie celular del parásito | 23 |
| 1.5.3   | Carga de superficie   | 26 |
| 1.5.4   | Movilidad de los componentes de membrana                                      | 26 |
| 1.5.5   | Análisis bioquímico de la membrana celular del parásito                       | 28 |
| 1.6     | Relación entre el parásito y el hospedador vertebrado                         | 32 |
| 1.6.1   | Factores dependientes del huésped vertebrado                                  | 34 |
| 1.6.2   | Factores dependientes del parásito  | 35 |
| 1.6.3   | Respuesta inmune  | 37 |
| 1.6.3.1 | Anticuerpos policlonales  | 39 |
| 1.6.3.2 | Anticuerpos monoclonales  | 41 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.7.  | Interacción entre el <u>Trypanosoma cruzi</u> y la célula<br>célula huésped | 44 |
| 1.7.1 | Interacción entre <u>T. cruzi</u> y células no fagocíticas                  | 50 |
| 1.7.2 | Interacción entre <u>T. cruzi</u> y células fagocíticas                     | 58 |
| 1.8   | Objetivos   | 61 |

## CAPITULO 2

### MATERIALES Y METODOS

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.1   | Origen de las cepas y clones de <u>T. cruzi</u>   | 63 |
| 2.2   | Mantenimiento de los aislamientos y clones de <u>T. cruzi</u><br>en medio de cultivo LIT  | 66 |
| 2.3   | Mantenimiento de los cultivos celulares   | 66 |
| 2.4   | Infeción de los cultivos celulares con parásitos prove-<br>nientes de cultivo axénico y posterior mantenimiento de<br>los parásitos en cultivos celulares | 67 |
| 2.5   | Técnica de congelación  | 68 |
| 2.5.1 | Criopreservación de los cultivos celulares  | 68 |
| 2.5.2 | Criopreservación de epimastigotes de cultivo  | 69 |
| 2.5.3 | Criopreservación de tripomastigotes derivados de<br>cultivo de tejidos  | 69 |
| 2.6   | Metodología experimental para el análisis de la infecti-<br>vidad de clones de <u>T. cruzi</u>  | 69 |
| 2.6.1 | Cultivo de las células de vertebrado  | 70 |
| 2.6.2 | Preparación de los parásitos  | 70 |
| 2.6.3 | Infeción de las células de vertebrado   | 72 |
| 2.7   | Capacidad de penetración de tripomastigotes del<br>clon CA-I/71 de <u>T. cruzi</u> : estudio del efecto de<br>monosacáridos sobre la infectividad         | 74 |
| 2.7.1 | Preparación de los cultivos celulares   | 75 |
| 2.7.2 | Preparación de los parásitos  | 75 |
| 2.7.3 | Infeción de las células de vertebrado   | 76 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.8.  | Capacidad de penetración de tripomastigotes de distintos clones de <u>T. cruzi</u> : estudio del efecto del monosacárido N-acetil-D-glucosamina | 77 |
| 2.8.1 | Preparación de los cultivos celulares   | 78 |
| 2.8.2 | Preparación de los parásitos  | 78 |
| 2.8.3 | Infección de las células de vertebrado  | 80 |
| 2.9   | Estudio del efecto de anticuerpos monoclonales sobre la infección de células de vertebrado por <u>T. cruzi</u>                                  | 82 |
| 2.9.1 | Origen de los anticuerpos monoclonales  | 82 |
| 2.9.2 | Preparación de los cultivos celulares   | 85 |
| 2.9.3 | Preparación de los parásitos  | 85 |
| 2.9.4 | Ensayo de infección de las células de vertebrado  | 86 |

### CAPITULO 3

#### RESULTADOS Y DISCUSION

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 3.1   | Infectividad de clones de <u>T. cruzi</u>   | 88  |
| 3.1.1 | Análisis cuantitativo de la capacidad infectante de clones de <u>T. cruzi</u>   | 88  |
| 3.1.2 | Discusión   | 97  |
| 3.2   | Penetración de tripomastigotes del clon CA-I/71 de <u>T. cruzi</u> en células de mamífero: Estudio del efecto de monosacáridos  | 104 |
| 3.2.1 | Resultados del estudio del efecto de monosacáridos  | 105 |
| 3.2.2 | Discusión   | 106 |
| 3.3   | Capacidad de penetración de tripomastigotes de los clones CA-I/59, /69, /70, y Miranda/80, /83, /88 de <u>T. cruzi</u> en células de mamífero: Estudio del efecto de la N-acetil-D-glucosamina. | 109 |
| 3.3.1 | Resultados del efecto de la N-acetil-D-glucosamina  |     |
| 3.3.2 | Discusión   | 111 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 3.4   | Efecto de los anticuerpos monoclonales B <sub>3</sub> , D <sub>4</sub> ,<br>y MB <sub>5</sub> sobre la capacidad de penetración de tri-<br>pomastigotes de <u>T. cruzi</u> en células de mamífero | 119 |
| 3.4.1 | Resultados del estudio del efecto de los anticuerpos<br>monoclonales  | 119 |
| 3.4.2 | Discusión   | 126 |

#### CAPITULO 4

|                     |     |
|---------------------|-----|
| <u>CONCLUSIONES</u> | 129 |
| <u>BIBLIOGRAFIA</u> | 134 |

CAPITULO 1

INTRODUCCION



## 1.1 Conceptos Generales

En el año 1909, Carlos Chagas describió una nueva tripanosomiasis en Minas Gerais, Brasil (1).

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es la hemoparasitosis humana de mayor incidencia en América, ya que afecta aproximadamente a 20 millones de personas y se estima en 100 millones (2) la población de zonas rurales endémicas potencialmente susceptibles a la infección. Esta enfermedad constituye un problema médico-social de tal magnitud que se han implementado programas sanitarios a niveles nacionales e internacionales con el objetivo de disminuir la transmisión, controlar las áreas endémicas y estudiar los procesos patológicos, con la finalidad de combatir este mal. Entre las instituciones comprometidas a nivel internacional en el lucha activa contra esta enfermedad se encuentran la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud que apoyan programas de investigación básica, aplicada y de control (3).

### 1.1.1 Epidemiología

Carlos Chagas (1) describió al agente etiológico de esta parasitosis, al cual denominó Schizotrypanum cruzi (Trypanosoma cruzi), detallando también el aislamiento del parásito a partir de pacientes febriles y el ciclo evolutivo del mismo en sus distintos huéspedes.

El área de dispersión del agente etiológico de la Tripanosomiasis Americana abarca gran parte del continente americano, desde los Estados Unidos de Norte América hasta la Provincia argentina de Río Negro.

Sin embargo, en el sur de los Estados Unidos de Norte América no hay enfermedad a pesar de encontrarse el agente vector, lo que se atribuye a la no domiciliación de las especies de insectos vectores allí

existentes. De tal modo que la endemia chagásica es propiamente latinoamericana. En la República Argentina, el área endémica abarca la mayor parte del territorio nacional con la sola excepción de las provincias más australes, siendo las del norte, noroeste y centro, las más afectadas.

Es un hecho innegable que la endemia chagásica avanza permanentemente hacia áreas indemnes, facilitada por el fenómeno de las migraciones desde las comunidades rurales en las cuales es intenso el triatomismo, hacia los centros industriales. Estas migraciones permiten el transporte pasivo de los insectos, los cuales son capaces de prosperar aún en zonas ecológicamente desfavorables, aprovechando el microclima que ofrece la morada humana (4). Además, se favorece el riesgo de transmisión por transfusión de sangre, como ocurre en la República Argentina con la existencia de prevalencia serológica para Chagas en provincias donde no existe el vector (5).

En la República Argentina, se estimó que la prevalencia de la infección alcanzó un 6% de la totalidad de los varones de 18 años de edad en el año 1981 (5). La prevalencia de la infección chagásica se encuentra estrechamente relacionada con las condiciones socio-económicas de la población. Uno de sus elementos, la precariedad de las viviendas, hace que sean habitats favorables para la multiplicación del insecto vector, por lo que las campañas de desinsectación adecuadamente planificadas y ejecutadas tienen una importancia relevante en el control de la enfermedad de Chagas.

#### 1.1.2 Clasificación taxonómica del agente etiológico

El protozoo parásito causante de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana se ubica sistemáticamente en 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) (6).

### 1.1.3 Mecanismos o vías de infección

La enfermedad de Chagas se puede adquirir a través de distintas vías o mecanismos:

1) Por intermedio del vector. No cabe duda de que es la principal manera de transmisión de la enfermedad y seguirá siendo la forma predominante hasta que se logre el control de los triatomíneos domiciliarios y peridomiciliarios. La contaminación del hombre se realiza por las deyecciones que el insecto deposita sobre la piel en el momento de picar. Estas deyecciones contienen las formas metacíclicas infectantes del parásito, las cuales penetran al interior del organismo a través de las mucosas (conjuntivas), atravesando epidermis muy delgada como la de los niños, o aprovechando heridas y microheridas producidas por rascado (1,7,8).

2) Por medio de transfusiones. La posibilidad de la transmisión de la enfermedad de Chagas por medio de la transfusión de sangre se conoce desde 1936. En la actualidad se sabe que esta forma de contaminación con el agente patógeno es responsable de un elevado número de casos. El índice más aceptado por los distintos autores de la prevalencia de donadores de sangre positivos para Chagas se estima en un 10 por ciento. El control riguroso en bancos de sangre disminuirá los riesgos de contaminación por esta vía (4,9).

3) Vía transplacentaria o Chagas connatal. Son numerosos los trabajos

que confirman incuestionablemente este mecanismo de transmisión, ya sospechado por Carlos Chagas en 1911.

El período del Chagas materno puede ser indistintamente agudo o crónico, correspondiendo a este último la inmensa mayoría de los hallazgos reportados. La incidencia de la infección chagásica por esta vía no está suficientemente estudiada, aunque se estima entre un 3-5 por ciento de los hijos de madres infectadas (9).

4) Vía oral o digestiva y accidentes de laboratorio. La vía oral ha sido postulada como posibilidad de infección natural por varios investigadores, pero de existir, es seguramente la vía de infección menos frecuente, salvo en accidentes de laboratorio debidos al manipuleo de material que contiene parásitos y al trabajo con animales en experimentación, los cuales son generalmente controlados con medicación oportuna.

#### 1.1.4 Formas clínicas de la enfermedad de Chagas

En la enfermedad de Chagas se distinguen en general tres períodos que caracterizan otras tantas etapas de la evolución de la parasitosis: un período agudo, un período crónico asintomático, denominado también período de latencia y un período crónico sintomático (10,11,12,13). Esta afección es sumamente particular, ya que sólo se hace aparente con un complejo oftalmo-ganglionar en un 5% de los casos, durante la primera fase de la infección: período agudo, mientras que el 95% restante de los individuos infectados no presenta sintomatología específica detectable. Se ha descrito la aparición de síntomas no específicos o de algunos poco significativos, tanto que el afectado no siente la necesidad de efectuar consulta médica (14). Un aspecto importante es que entre el 66-83% de los casos de Chagas agudo se observa en niños menores de 10 años de edad (9).

Por lo que respecta a la gravedad, la mayoría de las infecciones chagásicas corresponden a formas leves o benignas de la enfermedad; un 19% corresponde a formas de mediana gravedad y solamente un 6% está constituido por casos graves. El 75% de los casos leves presentan generalmente escasa sintomatología y en general evolucionan espontáneamente superando el cuadro sintomatológico hacia el período de latencia. Las formas graves y de mediana gravedad se relacionan con los enfermos que presentan la polisintomatología habitualmente descrita como miocarditis aguda o meningoencefalitis chagásica aguda.

#### 1) Fase aguda de la enfermedad

Como se mencionara anteriormente, la fase aguda se observa generalmente en niños de corta edad (11), disminuyendo la sintomatología en forma progresiva (9). Un alto porcentaje de los pacientes presentan edema ocular (signo de Romana) (8) ó cutáneo (chagoma de inoculación) en la zona de inoculación del parásito, después de un período de incubación de 3 a 12 días post-infección.

La sintomatología es variable (9,11), presentándose estado febril, que ocupa un lugar destacado ya que a veces se llega al extremo de ser el único síntoma que prácticamente está siempre presente en los casos diagnosticados de Chagas agudo, acompañado por cefaleas, cansancio, dolores articulares y óseos, edemas de localización diversa, petequias, hepato-esplenomegalia y muy a menudo diarreas y vómitos en lactantes. En estos últimos son sumamente importantes también el compromiso cardíaco y la meningoencefalitis (9,15). La mortalidad en esta fase de la enfermedad de Chagas oscila entre un 2-4% de los casos (14).

## 2) Fase latente

El 65-70% de las personas infectadas con Trypanosoma cruzi no presenta sintomatología hasta los 40 años de edad. Hay que considerar que la enfermedad de Chagas es un proceso de evolución lenta en la mayoría de los casos, con una aparición gradual de la sintomatología, y que la infección por T. cruzi es a menudo inaparente.

Durante este período, la parasitemia se detecta sólo por técnicas parasitológicas indirectas (16), evidenciándose en cambio altos niveles de anticuerpos específicos (17,18).

## 3) Fase crónica

Esta fase de la enfermedad de Chagas se caracteriza por el compromiso y afección de distintos órganos, principalmente el corazón y el tubo digestivo (13, 10). Cabe señalar que la mayor prevalencia de patología en la fase crónica, se presenta en aquellos pacientes que evidenciaron manifestaciones clínicas durante la fase aguda (19,20).

Existe una correlación significativa entre la forma clínica y el área geográfica, aunque se desconoce si este fenómeno se debe a la variabilidad de los huéspedes en las distintas zonas, a diferencias en las poblaciones de parásitos, a las condiciones nutricionales de la población, a condiciones ambientales, a combinaciones de estos factores o a otros aún desconocidos.

En la República Argentina, la manifestación más frecuente de la forma crónica de la enfermedad de Chagas es la lesión cardíaca, la cual se evidencia generalmente varios años después de adquirida la infección, evolucionando lenta pero irreversiblemente (21,22), pudiendo desencadenar la muerte prematura del paciente. Se desconoce hasta el presente la

existencia de curas espontáneas de la infección chagásica.

## 1.2 Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi es un protozoo parásito digenético, cuyo ciclo de vida involucra la alternancia de dos huéspedes: un mamífero y un insecto hematófago que representa al huésped intermediario o vector (Figura 1).

### 1.2.1 Ciclo de vida en el huésped invertebrado

Carlos Chagas describió el ciclo de vida de T. cruzi en el huésped invertebrado (1) y su estudio fue posteriormente profundizado por otros investigadores (23,24). El T. cruzi parasita el tubo digestivo de más de 80 especies de triatomíneos (25) pertenecientes a la subfamilia Triatominae, familia Reduviidae, orden Hemiptera, siendo Triatoma infestans (26,27) el principal vector de la enfermedad de Chagas en la República Argentina. Este insecto es de hábitat domiciliario y peridomiciliario, habiendo especies selváticas transmisoras de la infección. La infección del huésped invertebrado por T. cruzi se produce durante la ingesta del insecto, que succiona las formas sanguíneas del parásito (tripomastigotes) junto con la sangre del mamífero infectado. Los tripomastigotes sufren una serie de transformaciones fisiológicas y morfológicas en el tubo digestivo del insecto, originando inicialmente amastigotes o esferomastigotes los cuales se multiplican durante un corto período de tiempo, transformándose posteriormente en epimastigotes. El estadio epimastigote es la forma multiplicativa del parásito y el responsable del mantenimiento de la infección por T. cruzi en el huésped invertebrado. Fi-

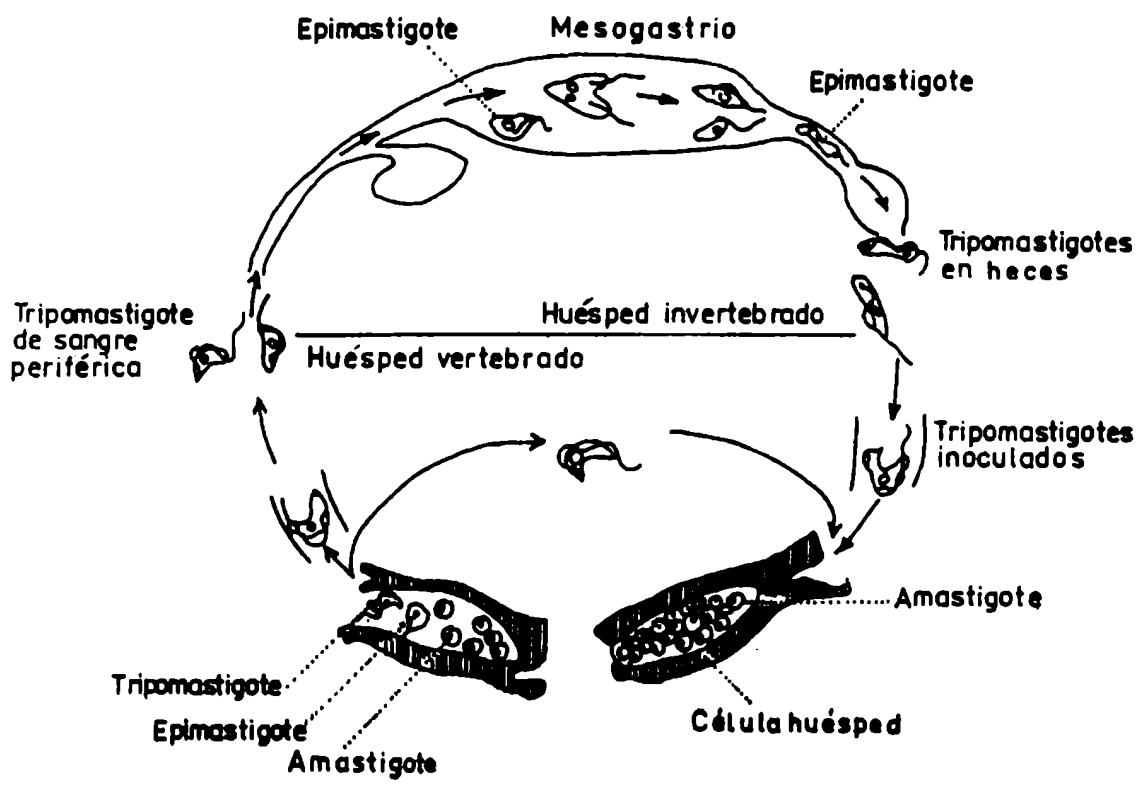


Figura 1 . Ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*.



nalmente, algunos epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos en la ampolla rectal del insecto, que son eliminados con las heces del insecto juntamente con epimastigotes no diferenciados (28,29).

Brack (24) describió el desarrollo del parásito en Rhodnius prolixus experimentalmente infectados, encontrando los tres estadios del parásito: esferomastigotes o amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes. Los epimastigotes presentaron dos tipos morfológicamente distintos: epimastigotes cortos que se multiplican activamente y epimastigotes largos que son incapaces de multiplicarse y aparentemente también de diferenciarse. Tanto los epimastigotes como los esferomastigotes serían los precursores del estadio tripomastigote metacíclico, infectante para el mamífero.

Ciertos aspectos del ciclo evolutivo de T. cruzi en el insecto hematófago son todavía poco conocidos. Por ejemplo, Brener (30) observó la formación de grandes masas de parásitos pocas horas después de la ingesta, sugiriendo la posibilidad de la existencia de fusión celular, hipótesis que no ha sido corroborada hasta el presente.

Asimismo, se desconocen los factores que determinan la distinta susceptibilidad de las numerosas especies de Triatomínos a la infección por Trypanosoma cruzi (16,31) y los factores que inducen la transformación de epimastigotes a tripomastigotes.

Los tripomastigotes metacíclicos son eliminados con la orina y/o las heces del vector, que son generalmente depositadas durante la ingesta sobre la piel o mucosas del mamífero (7,8). Los tripomastigotes metacíclicos presentan la capacidad de penetrar en las células del huésped vertebrado iniciando la siguiente fase del ciclo de vida (32).

### 1.2.2 Ciclo de vida en el mamífero

Además del hombre hay numerosos órdenes de mamíferos, tanto silvestres como domésticos, susceptibles a la infección por T. cruzi (33,34, 35). Se han detectado más de 100 especies de mamíferos, pertenecientes a 8 órdenes distintos, naturalmente infectados con tripanosomas que muestran características idénticas a los T. cruzi aislados de humanos, con respecto a la morfología de las formas sanguíneas, ciclo de vida en triatomíneos y animales experimentales y reacciones de inmunidad cruzadas. Las aves y los anfibios son resistentes a la infección por T. cruzi.

Los tripomastigotes metacíclicos eliminados por el vector penetran en el mamífero por alguna de las diversas vías o mecanismos detallados anteriormente (ver 1.1.3). Los tripomastigotes metacíclicos penetran en las células del vertebrado (32), transformándose en amastigotes libres en el citoplasma de la célula huésped. Los amastigotes son la forma multiplicativa intracelular del parásito en el mamífero y, consecuentemente, son responsables del mantenimiento de la infección en el mamífero.

Un mejor conocimiento del ciclo de vida de Trypanosoma cruzi en las células del huésped vertebrado fue posible gracias al trabajo de Kofoid y col. (36) y Meyer y col. (37,38), quienes lograron reproducir el ciclo de T. cruzi "in vitro" en cultivo de tejidos. Este sistema experimental fue utilizado por numerosos investigadores desde entonces (39,40,41, 42,43,44). Los resultados obtenidos demuestran que una misma célula huésped puede ser infectada por uno o varios parásitos en forma simultánea o no. Una vez que los tripomastigotes penetran en la célula huésped, retienen su movilidad por un corto lapso y posteriormente adquieren forma ovalada o redondeada y el flagelo se acorta notablemente, alcanzando una longitud de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  (45). Una vez concluida la transforma-

ción del tripomastigote en amastigote, este último permanece en estado quiescente durante un lapso variable (44), denominado comúnmente período lag, previo a la iniciación de la fase reproductiva por división binaria. Se desconoce aún el significado de este período quiescente. Se han realizado estudios de la síntesis de DNA por autorradiografía, los cuales indican que hay síntesis de ácido desoxirribonucleico durante este período (46). Asimismo, se demostró que la síntesis de RNA se inicia aproximadamente 2 horas después de la interiorización del parásito en la célula del vertebrado (47). Por lo tanto, no se requeriría síntesis de RNA para el proceso de transformación del tripomastigote en amastigote, que implica el pasaje de una célula arrestada en G<sub>0</sub> (48) a una célula que inicia su ciclo celular.

Antes de la división, los amastigotes aumentan gradualmente de tamaño; a continuación se dividen el cinetoplasto y el núcleo, se forma un nuevo flagelo y finalmente se divide longitudinalmente el cuerpo del parásito (45). El tiempo de duplicación intracelular es variable y depende de la cepa de T. cruzi, mientras que la citocinesis es rápida, completándose en aproximadamente 25 minutos. El número de divisiones y la duración del ciclo intracelular se encuentran bajo control genético del parásito (43). Finalmente, los amastigotes intracelulares sufren una

transformación a tripomastigotes, proceso que se completa en aproximadamente 24 horas (44). No todos los parásitos intracelulares se transforman en tripomastigotes en forma sincrónica. Por lo tanto, en una misma célula infectada por T. cruzi pueden encontrarse todos los estadios de transición entre amastigote y tripomastigote.

Al finalizar el ciclo intracelular de T. cruzi en el mamífero, el movimiento de los parásitos es sumamente intenso, produciéndose la ruptura

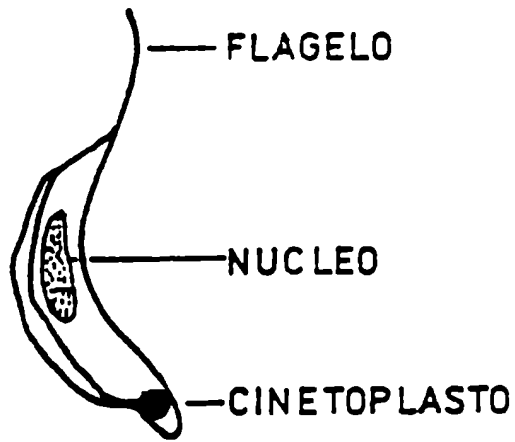
de la célula huésped con la consecuente liberación de los parásitos que con capaces de infectar inmediatamente nuevas células huésped o liberarse al torrente sanguíneo. Los tripomastigotes sanguíneos circulantes son eventualmente ingeridos por el vector, completándose de este modo el ciclo de vida.

### 1.3 Estadíos del Trypanosoma cruzi

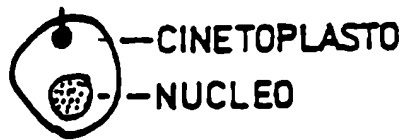
El Trypanosoma cruzi es un protozoo polimórfico, que a lo largo de su ciclo de vida presenta varios estadíos fácilmente identificables por microscopía óptica y electrónica. La definición de las distintas formas del parásito se basa en: la forma general de la célula, la disposición del cinetoplasto con respecto al núcleo y la región por la cual emerge el flagelo del bolsillo flagelar (49). De acuerdo a estos criterios, se pueden identificar tres estadíos del parásito: el amastigote, el epimastigote y el tripomastigote (Figura 2).

A continuación se describen brevemente las tres formas del parásito, con especial énfasis sobre la morfología y ultraestructura del estadío tripomastigote.

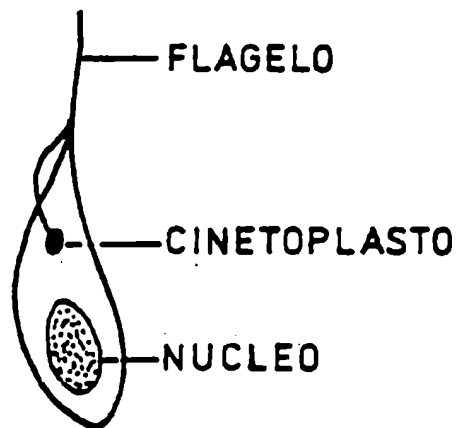
1.3.1 Anastigotes: también llamados esferomastigotes. Los amastigotes son formas esferoides que miden entre 1,5-4  $\mu\text{m}$  de ancho, las cuales se desarrollan intracelularmente en los tejidos del hospedador vertebrado y extracelularmente en el tracto digestivo del insecto, en el cual pueden formar masas de organismos (30,45,50). El cinetoplasto está próximo al núcleo y presenta la apariencia de una doble capa de fibrillas (45). Las observaciones realizadas mediante microscopías de contraste de fase y electrónica han permitido demostrar que estas formas presentan un cor-



**TRIPOMASTIGOTE**



**AMASTIGOTE**



**EPIMASTIGOTE**

Figura 2. Diagrama que ilustra los estadios morfológicos presentes en el ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

to flagelo de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de longitud (45).

Brack (24) designó esferomastigotes a las formas redondeadas presentes en el tubo digestivo del huésped invertebrado, para diferenciarlas de los amastigotes intracelulares presentes en el mamífero, a pesar de no observar diferencias al microscopio electrónico.

1.3.2 Epimastigotes: son formas elongadas que miden entre 20-40  $\mu\text{m}$  de longitud y que presentan una corta membrana ondulante y un flagelo libre anterior. El cinetoplasto está localizado anteriormente al núcleo.

Los epimastigotes son formas extracelulares capaces de dividirse binariamente. Su hábitat natural es el tracto digestivo del huésped invertebrado y son las formas predominantes en cultivos axénicos de T.cruzi.

Este estadio, al igual que el amastigote, presenta un citostoma en el cual se observa una disposición peculiar de partículas alineadas que delimitan una zona pobre en partículas (45).

Los estudios realizados por microscopía electrónica mediante técnicas de crio-fractura, demuestran que el estadio epimastigote del parásito presenta una mayor densidad de partículas intramembranas que los tripomastigotes sanguíneos, lo que indica que tiene una diferente relación proteínas-lípidos en su membrana plasmática (45).

El flagelo, al igual que en los otros dos estadios del parásito, presenta una estructura básica similar a la de otros flagelos, con una disposición 9+2 de los microtúbulos del axonema.

En el epimastigote, así como en el tripomastigote, se encuentra una estructura filamentosa que ha sido denominada paraflagelo o estructura paraxial, cuya función no ha sido aún estudiada en detalle. Esta estructura presenta una disposición relativa constante con respecto al axonema, pero su posición con respecto al cuerpo del parásito varía considerable-

mente, tocando a veces el cuerpo de la célula. La estructura paraxial se presenta sólo en la porción flagelar localizada fuera del bolsillo flagelar (45). El flagelo se adhiere al cuerpo celular por uniones que aparentan ser de tipo desmosoma, formando una corta membrana ondulante (52).

En los tres estadios del parásito, el flagelo se encuentra conectado con dos cuerpos basales ubicados muy próximos entre sí. Es común encontrar células en división con cuatro cuerpos basales, lo que indica que ambos cuerpos basales, uno de los cuales está conectado al flagelo a través de la placa terminal mientras que el otro es adyacente, son capaces de replicarse (45).

La mitocondria es única y presenta crestas al igual que en los otros dos estadios, no habiéndose encontrado diferencias bioquímicas en el metabolismo respiratorio de las tres formas del parásito (53). El cinetoplasto es una región especializada de la mitocondria única de las familias Trypanosomatidae y Bonodidae que está constituida por material filamentoso. Los cuerpos basales se encuentran próximos al cinetoplasto en las tres formas del parásito. Por microscopía electrónica pudo demostrarse que el cinetoplasto está compuesto por fibrillas similares a las encontradas en el nucleóide bacteriano, pudiendo comprobarse que está constituido por DNA. El cinetoplasto del epimastigote presenta el material filamentoso en una línea de fibras densamente empaquetadas paralelas al eje longitudinal del protozoo, lo que da una apariencia de una doble capa de fibras (45).

Una estructura morfológica similar se encuentra en las formas amastigotes. Algunas fibrillas de DNA parecen contactar con la membrana mitocondrial interna. El DNA-cinetoplástico representa entre el 20-25% del DNA total del epimastigote de T. cruzi y está constituido por una red de

20.000-30.000 minicírculos de un peso molecular de  $0,9 \times 10^6$ .

El análisis del DNA por enzimas de restricción demostró que los minicírculos son heterogéneos en cuanto a la secuencia de bases (45). Los minicírculos se encuentran en un alto número de copias por parásito y su función es hasta el momento desconocida (54).

El DNA-cinetoplástico presenta también maxicírculos (55) de aproximadamente  $10 \mu\text{m}$  de diámetro con un PM de aproximadamente  $26 \times 10^6$ , que están presentes en un bajo número de copias por célula y contienen la información genética correspondiente a algunas de las proteínas mitocondriales.

En el citoplasma del epimastigote se encuentran vesículas pinocíticas, lisosomas, glicosomas (56), gránulos densos que tienen actividad peroxidasa (57) y peroxisomas. También se observan retículo endoplásmico liso y rugoso y un complejo de Golgi ubicado entre el núcleo y el cinetoplasto, en la región cercana al bolsillo flagelar.

El núcleo del epimastigote, al igual que el del amastigote, es redondeado, midiendo aproximadamente  $2,5 \mu\text{m}$ , y tiene una organización estructural aparentemente similar a la encontrada en otras células eucariotas (45).

**1.3.3 Tripomastigotes:** estas formas miden aproximadamente  $25 \mu\text{m}$  de longitud y  $2 \mu\text{m}$  de ancho. Presentan una característica forma de C, un cinetoplasto grande oval o redondeado de aproximadamente  $1,2 \mu\text{m}$  de diámetro próximo al extremo posterior del cuerpo, un flagelo libre anterior y una membrana ondulante con 2-3 ondas planas (45).

Se han descrito dos tipos de tripomastigotes sanguíneos, que también se encuentran en el sobrenadante de cultivos de células de vertebrado in-



fectadas por T. cruzi. El primer tipo es delgado, con un núcleo alargado, un cinetoplasto subterminal y un corto flagelo libre. Se lo denomina tripomastigote delgado (slender). El otro tipo de tripomastigote es ancho, con un núcleo oval, un cinetoplasto terminal y un largo flagelo libre y se lo conoce con la denominación de tripomastigote ancho (broad). La predominancia de una u otra forma de tripomastigote, dependería de la cepa o aislamiento de T. cruzi. Se ha sugerido que las formas delgadas serían principalmente responsables de la infección de las células de vertebrado, mientras que las formas anchas infectarían al huésped invertebrado (28).

El cinetoplasto del tripomastigote, que es posterior al núcleo, presenta básicamente dos aspectos. El primero consiste en la disposición de las fibrillas en tres o cuatro capas paralelas entre sí (58, 59). Esta estructura se denominó cinetoplasto en forma de canasto (58) y es poco frecuente, no habiéndose observado en tripomastigotes sanguíneos. El segundo tipo de cinetoplasto se caracteriza por la disposición dispersa de los filamentos de DNA, que pierden el ordenamiento típico del cinetoplasto de la mayoría de los tripanosomátidos (45).

En el tripomastigote la mitocondria es tubular y se extiende desde el cinetoplasto hacia el extremo anterior del parásito (28).

Los tripomastigotes presentan una cubierta filamentosa, denominada glicocáliz, localizada en la cara externa de la membrana plasmática, la cual es más gruesa (15 nm, aproximadamente) que la de los estadios epimastigote y amastigote (5 nm, aproximadamente) (45). Al igual que en los otros estadios del parásito, se observan microtúbulos subpeliculares por debajo de la membrana celular, excepto en algunas áreas del bolsillo flagelar. Un grupo de microtúbulos, sin aparente continuidad con los microtúbulos subpeliculares, aparece en estrecha relación con el cuerpo basal (60). Se observan también dos cuerpos basales típicos. El complejo de Golgi se en-

cuentra ubicado entre el cinetoplasto y el núcleo, observándose ramificaciones del retículo endoplásmico rugoso cerca del complejo de Golgi, lo que sugiere la existencia de una actividad secretora del mismo en los tripomastigotes (28).

Se han descrito también cuerpos multivesiculares que intervendrían en secreción y lisosomas (45).

El núcleo tiene una organización estructural similar a la de las otras formas del parásito pero es elongado. Mide aproximadamente 2,5  $\mu\text{m}$  y se encuentra localizado en la región central de la célula. Es evidente la continuidad existente entre la membrana nuclear externa y el retículo endoplásmico. El material cromático se distribuye en masas en la periferia del núcleo por debajo de la membrana nuclear y el nucleolo es ligeramente excéntrico (45).

El flagelo también presenta la estructura axonémica típica 9 + 2 y emerge del cuerpo del parásito en el bolsillo flagelar, considerado como un sitio de secreción y/o excreción (28), así como también de ingestión de macromoléculas por pinocitosis. El flagelo se encuentra extensamente adherido al cuerpo celular del parásito por uniones de tipo desmosoma (52). Cuando se inicia el movimiento flagelar, la onda se propaga a lo largo del flagelo y al alcanzar la región en la cual éste se encuentra adherido al cuerpo del parásito induce un movimiento aparente del cuerpo, dando la impresión visual de una membrana ondulante. El movimiento puede propagarse desde el extremo libre del flagelo o viceversa. Por lo tanto, la membrana ondulante de los tripanosomátidos no es una estructura real.

Los tripomastigotes se encuentran transitoriamente (ver 1.2.2) en los tejidos y en la sangre del huésped vertebrado, así como también en

la ampolla rectal, las heces y la orina del huésped invertebrado, en cuyo caso reciben la denominación de tripomastigotes metacíclicos. Asimismo, se encuentran en cultivos axénicos del parásito en fase estacionaria de crecimiento y en la fase líquida de cultivos celulares infectados por T. cruzi. Estas formas del parásito son incapaces de dividirse.

#### 1.4 Las cepas de Trypanosoma cruzi

Una cepa o aislamiento es un conjunto de poblaciones originadas a partir de un grupo de tripanosomas de una especie o subespecie dada, los cuales están presentes en determinado momento en un huésped o en un cultivo y que presentan o poseen una o más características definitorias (61).

Las cepas o aislamientos de Trypanosoma cruzi están constituidas, por lo tanto, por poblaciones de parásitos que en general son mantenidas bajo distintas condiciones de laboratorio. Los aislamientos de T. cruzi provienen de distintas fuentes, ya sea de hospedadores selváticos, de animales domésticos, de insectos domiciliarios o de pacientes con enfermedad de Chagas.

Las cepas de T. cruzi han sido caracterizadas por medio de criterios biológicos y bioquímicos, con el objetivo final de clasificar a las mismas en grupos con características comunes y de establecer correlaciones entre estos parámetros y las diversas manifestaciones clínicas y epidemiológicas de la Tripanosomiasis americana. Entre los criterios bioquímicos utilizados para caracterizar a las poblaciones de T. cruzi, se encuentran el análisis comparativo de los productos del clivaje del DNA cinetoplástico y nuclear por endonucleasas de restricción específica (esquizodemas) (62,63,64) y el análisis comparativo de los perfiles

enzimáticos de algunas enzimas (zimodemas) (65,66).

Las características biológicas utilizadas para clasificar cepas o aislamientos de T. cruzi incluyen: cuadro histopatológico, morfología de los parásitos sanguíneos, parasitemia en sangre, tropismo tisular, patogenicidad, virulencia y constitución antigénica (67,68,69,70,71, 72,73,74). Mediante el estudio de estos parámetros se ha demostrado que existen diferencias entre aislamientos, lo que implica que existen variaciones intra-específicas en Trypanosoma cruzi.

Sin embargo, durante el curso de varios estudios de caracterización de cepas de T. cruzi, se evidenció la aparición de variaciones en algunas características biológicas y bioquímicas de las cepas, como por ejemplo, la disminución o aumento de la capacidad infectante de aislamientos mantenidos en el laboratorio según distintos protocolos (75,76, 77,78,), variaciones en la duración del ciclo intracelular (79), variaciones en el tiempo de duplicación de los amastigotes intracelulares (79), en los patrones isoenzimáticos (80), etc.

Lambrecht postuló que Trypanosoma cruzi está compuesto por poblaciones heterogéneas de parásitos y que las condiciones de laboratorio utilizadas para mantener a los aislamientos de parásitos ejercerían una presión selectiva sobre las distintas subpoblaciones presentes, causando la aparente inestabilidad de los parámetros biológicos y bioquímicos (81).

Esta hipótesis ha sido confirmada recientemente mediante la caracterización biológica de clones de T. cruzi, que constituyen poblaciones genéticamente homogéneas de parásitos, ya que provienen de aislamientos unicelulares. Entre los parámetros estudiados se encuentran la cinética de crecimiento de las formas epimastigote en medio de cultivo libre de

células (82), el contenido de DNA total por organismos de epimastigotes en distintas fases de crecimiento y de tripomastigotes derivados de cultivo de células (48), el volumen modal de epimastigotes de T. cruzi en medio axénico (82), el ciclo intracelular en cultivo de células (44), los antígenos del estadio epimastigote (83), el cuadro histopatológico en ratones endocriados (84) y la afinidad de epimastigotes de distintos clones por un anticuerpo monoclonal (85).

En base al análisis de estos parámetros se demostró la existencia de heterogeneidad biológica en aislamientos de Trypanosoma cruzi provenientes de pacientes chagásicos, aunque se desconoce aún el origen de dicha heterogeneidad.

#### 1.4.1 Mantenimiento de T. cruzi en el laboratorio

Trypanosoma cruzi puede ser mantenido indefinidamente en el laboratorio tanto in vivo como in vitro. Es posible mantener a T. cruzi in vivo en distintas especies de reduvidos, vectores naturales del parásito, mantenidos en insectarios (86). Estos insectos se han utilizado también para el xenodiagnóstico, que es un método de diagnóstico parasitológico indirecto, y para el estudio del parásito en el huésped invertebrado (16, 23). T. cruzi también se mantiene mediante pasajes seriados en animales de laboratorio, entre ellos el ratón, mono, hamster, conejo, perro, etc. (84,87,88,89,90,91,28).

Todos los estadios del ciclo de vida del Trypanosoma cruzi, tanto los presentes en el mamífero como en el insecto vector, pueden ser cultivados in vitro sin dificultad. Cuando se inoculan tripomastigotes sanguíneos o parásitos obtenidos a partir del hospedador invertebrado, en medio de cultivo axénico, o sea libre de células, a 26-28°C, los parásitos se

transforman en epimastigotes, los cuales presentan la capacidad de dividirse, alcanzándose altas concentraciones de parásitos por ml, en medios de cultivo bifásicos y monofásicos que permiten el cultivo de epimastigotes de T. cruzi indefinidamente por pasajes seriados. Este sistema, fácilmente reproducible, ha sido utilizado para obtener parásitos para estudios bioquímicos e inmunológicos. Se supone que los epimastigotes provenientes de cultivos axénicos son equivalentes a los epimastigotes que se encuentran en el tubo digestivo del hospedador invertebrado (45).

El estado multiplicativo de T. cruzi en el hospedador invertebrado es obligatoriamente intracelular (1,32). Los estudios bioquímicos e inmunológicos del amastigote son escasos debido a las dificultades existentes para aislar este estado del parásito. Como se mencionara anteriormente, Kofoid y col. (36) fueron los primeros investigadores que informaron sobre la posibilidad de cultivar al T. cruzi en cultivo de tejidos con éxito, infectando células de vertebrado in vitro y reproduciendo el ciclo intracelular del parásito, lo que posibilitó entre otras cosas, el estudio del ciclo intracelular del parásito gracias al desarrollo de la metodología de cultivo de células y de metodología adecuada para la observación continua de este estado del parásito mediante microscopía de alta resolución (43,44,92).

Existen técnicas que posibilitan el aislamiento de amastigotes a partir de tejidos musculares de animales infectados experimentalmente (93) ó a partir de cultivos de células (94).

Sin embargo, las células huésped se deben romper para extraer a los amastigotes intracelulares, siendo virtualmente imposible eliminar la contaminación por restos celulares de las células huésped, aún so-

metiendo a los amastigotes a técnicas de purificación posteriores. El posible daño de los amastigotes durante los procedimientos de extracción y purificación y el bajo rendimiento de parásitos han limitado considerablemente el estudio del estadio intracelular del parásito (95,96).

Quando se inoculan formas sanguíneas, tripomastigotes metacíclicos, tripomastigotes derivados de cultivo de tejidos, o epimastigotes de T. cruzi en medio axénico a 26-28°C, se observa la aparición de amastigotes capaces de multiplicarse y la formación de acúmulos (1,97). Estas formas son morfológicamente similares a los amastigotes intracelulares. Asimismo, se ha publicado que bajo condiciones determinadas de cultivo es posible obtener amastigotes en cultivos axénicos (98). Recientemente, la utilización de clones de T. cruzi permitió el desarrollo de una metodología adecuada para el mantenimiento de este estadio durante tiempo indefinido (43). También se ha demostrado que los tripomastigotes sanguíneos se transforman en amastigotes extracelulares en el sobrenadante de cultivo de una línea establecida de Triatoma infestans, proponiéndose el término de estáfilomastigotes para designar estas formas (51). Se requiere, sin embargo, una caracterización más profunda de estos amastigotes extracelulares a fin de establecer homologías y/o diferencias con los amastigotes intracelulares.

El estadio tripomastigote puede obtenerse, para su mantenimiento y caracterización en el laboratorio, a partir de diversas fuentes, a saber, sangre de mamíferos infectados natural o experimentalmente (tripomastigotes sanguíneos), de heces u orina del insecto vector (tripomastigotes metacíclicos), o bien de cultivos axénicos, formas que se suponen equivalentes a las presentes en el insecto vector (tripomastigotes metacíclicos), y finalmente de cultivo de tejidos, formas que se consideran equi-

valentes a las presentes en el mamífero. En cultivos libres de células mantenidos a 26-28°C algunos epimastigotes se transforman en tripomastigotes al final de la fase de crecimiento logarítmico (75,99,100). El porcentaje de tripomastigotes varía de una cepa a otra y depende también de la composición del medio de crecimiento. Se han obtenido recientemente algunos clones de las cepas Y y CL, que presentan un alto grado de diferenciación a tripomastigotes (de hasta un 95%) cuando los parásitos se cultivan en medio adecuado (101). Estos tripomastigotes son capaces de infectar animales experimentales y células de vertebrado.

La utilización de técnicas de cultivo de células posibilitó la obtención de tripomastigotes para estudios bioquímicos, inmunológicos, biológicos, etc. T. cruzi presenta la capacidad de infectar una gran cantidad de tipos celulares provenientes de distintos animales y del hombre. Neva y col. (102) lograron infectar con facilidad tejidos embrionarios de pollo, ratón, piel humana, riñón humano y amnios humano. Prácticamente todas las líneas celulares mantenidas en las habituales condiciones de laboratorio son susceptibles a la infección por T. cruzi, así como también cultivos celulares primarios, tales como cultivos de músculo esquelético, músculo cardíaco, macrófagos, etc. Los tripomastigotes de T. cruzi obtenidos en el sobrenadante de cultivos celulares son infectantes para animales experimentales y para cultivos celulares vírgenes.

#### 1.5 La superficie celular del Trypanosoma cruzi

La superficie celular del Trypanosoma cruzi presenta dos componentes: la membrana plasmática y una cubierta formada por los microtúbulos



subpeliculares. Aunque actualmente se conoce que en la mayoría de las células eucariontes hay microtúbulos y microfilamentos asociados con la membrana plasmática, esta asociación es sumamente notoria en los tripanosomátidos, en los cuales ambos componentes de la superficie celular permanecen relacionados aún después de la lisis de los protozoos y del aislamiento de la fracción enriquecida en membranas.

#### 1.5.1 La membrana plasmática de T. cruzi

La membrana plasmática de T. cruzi, al igual que la de otros tipos celulares, está compuesta por proteínas, lípidos e hidratos de carbono. El glicocáliz se encuentra en la superficie exterior de la membrana plasmática y está formada por un material filamentososo rico en hidratos de carbono. Los estudios citoquímicos y por microscopía electrónica muestran que está presente en todos los estadios del parásito, aunque su espesor difiere (ver 1.3.3).

#### 1.5.2 Utilización de lectinas para el estudio de la superficie celular del parásito

Las estructuras ricas en hidratos de carbono presentes en la superficie celular de los tres estadios del T. cruzi han sido estudiadas mediante el uso de lectinas. Inicialmente se informó que los epimastigotes provenientes de cultivos acelulares se aglutinaban intensamente con la lectina Concanavalina A (Con A), mientras que los tripomastigotes no se aglutinaban (45). Sin embargo, estudios posteriores realizados utilizando tripomastigotes provenientes tanto de cultivos axénicos como de sangre de ratones infectados, demostraron que los tripomastigotes también poseen receptores para la Con A en su super-

ficie celular y que se aglutinan con concentraciones relativamente bajas de la lectina (103). La presencia de receptores de Con A sobre la superficie celular del T. cruzi se detectó también por microscopía óptica, mediante la utilización de Con A marcada con fluoresceína (104, 105) y por microscopía electrónica utilizando Con A conjugada con peroxidasa (103) y a ferritina (45). No se detectó unión de Con A en tripomastigotes de la cepa o aislamiento MR de T. cruzi (105). Se ha demostrado recientemente que los epimastigotes de T. cruzi parecen tener al menos 2 tipos de receptores para la Con A, uno de baja capacidad pero de alta afinidad y otro de alta capacidad pero de baja afinidad. Uno de estos receptores tiene una constante de afinidad por Con A cinco veces mayor que la encontrada en tripomastigotes (106).

Un estudio detallado de la superficie celular del amastigote, epimastigote y tripomastigote de T. cruzi fue llevado a cabo por Pereira y col. (107). Estos autores probaron lectinas altamente purificadas, con especificidades de unión por N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, D-galactosa, D-manosa y ácido siálico. Los resultados obtenidos con aglutinina de germen de trigo (WGA), que reconoce N-acetil-glucosamina y ácido siálico, demostraron que sólo los epimastigotes se aglutinan con bajas concentraciones de esta lectina. Los tripomastigotes sanguíneos y derivados de cultivo de tejidos, sólo se aglutinaron a concentraciones mayores de la lectina. Katzin y Colli (106) encontraron que los tripomastigotes presentan dos tipos de receptores con distinta afinidad y capacidad por WGA. La naturaleza de los receptores a WGA en epimastigotes y en tripomastigotes se estudió más detalladamente con WGA marcada (106, 107). Los resultados obtenidos sugieren que la WGA interactúa con ácido siálico en epimastigotes de T. cruzi, ya que el tratamiento con neuraminidasa impide la unión de los

receptores con WGA y la aglutinación de las células.

En el caso de los tripomastigotes, la cromatografía de afinidad con WGA-sefarosa permitió identificar una glicoproteína de Peso Molecular 85.000 que es específica del estadio tripomastigote. La unión de la WGA con esta glicoproteína no se altera por el tratamiento con neuraminidasa de los tripomastigotes intactos o de las glicoproteínas aisladas (106).

Los resultados obtenidos con la forma intracelular del parásito, indican la ausencia de ácido siálico en la superficie celular (107).

La hemaglutinina Wistaria floribunda, una lectina con especificidad por N-acetil-galactosamina, aglutina tanto epimastigotes como tripomastigotes provenientes de cultivos acelulares, pero no aglutina amastigotes ni tripomastigotes sanguíneos (45).

La aglutinina de maní (PNA, de Arachys hypogea) que es específica para los disacáridos D-gal  $\beta$ -1  $\rightarrow$  3 D-Gal Nac y D-Gal  $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-D-GlcNac, sólo aglutinó las formas intracelulares de T. cruzi (107). Es interesante destacar que las dos estructuras arriba mencionadas se encuentran comúnmente en carbohidratos complejos localizados sobre la superficie celular, pero solamente reaccionan con la lectina en células con poco ácido siálico, ya que el ácido siálico puede si no enmascarar las estructuras y evitar que estén disponibles para la interacción.

Los estudios de la superficie celular del Trypanosoma cruzi con lectinas suministran datos, que demuestran la existencia de diferencias cualitativas y cuantitativas en los hidratos de carbono expuestos sobre la superficie celular del parásito en los tres estadios de su ciclo de vida. Los resultados contradictorios obtenidos con algu-

nas lectinas (105, 107) son consecuencia probablemente de la pureza de la lectina utilizada, de la cepa del parásito y del método utilizado para la aglutinación celular (108).

### 1.5.3 Carga de superficie

T. cruzi presenta sitios aniónicos sobre su superficie celular, los cuales se evidenciaron con partículas de ferritina cationizada y de hidróxido de hierro coloidal (109, 110). La reactividad de T. cruzi con hierro coloidal es bloqueada completamente por el tratamiento previo de las células con neuraminidasa, lo que confirma la existencia de ácido siálico en la superficie del parásito. Todos los estadios morfológicos del T. cruzi presentan una carga neta de superficie cuya intensidad varía de una forma a otra. Los tripomastigotes son los que presentan mayores valores de carga neta negativa de superficie (45).

### 1.5.4 Movilidad de los componentes de membrana

El estado físico de los lípidos de una membrana se describe según su fluidez. Los lípidos, al igual que otras sustancias, pueden existir en fases sólida o líquida de distinta viscosidad, dependiendo de la temperatura. Como es el lípido el que provee la matriz en la cual se encuentran incluidas las proteínas de la membrana, el estado físico del lípido será importante para la movilidad de las proteínas y glicoproteínas. La demostración de que las proteínas de la membrana están en un estado dinámico es uno de los mayores hallazgos que favorecen el modelo del mosaico fluido de Singer y Nicolson (111).

Lamentablemente, no hay estudios detallados del rol de los lípidos

con respecto a la fluidez de la membrana plasmática del Trypanosoma cruzi. Sin embargo, hay indicaciones de que al menos algunos componentes de la membrana plasmática de este parásito pueden sufrir difusión lateral en el plano de la membrana, como por ejemplo, la agregación de las partículas de la membrana en réplicas obtenidas por criofractura y la inducción de la formación de agregados y de casquete polar, fenómenos que se denominan comúnmente patching y capping respectivamente, de antígenos de membrana y de receptores de membrana para concanavalina A (104).

Las observaciones experimentales realizadas sugieren que la fluidez de la membrana del estadio epimastigote de T. cruzi es baja, al menos para los sitios antigénicos y de unión de Con A (45).

Se ha demostrado que hay componentes citoplasmáticos asociados a la membrana plasmática, tales como microfilamentos y microtúbulos, los cuales tienen una marcada influencia en la movilidad de los componentes de membrana. Las evidencias indican que en muchas células los microtúbulos son los responsables de anclar a las proteínas de membrana, mientras que los microfilamentos producirían su movilización.

En estas células, la incubación en presencia de drogas que interfieren con los microtúbulos, tales como la colchicina y la vinblastina, aumenta la movilidad de los componentes de membrana. Por el contrario, la incubación de las células con citochalasina B, que interfiere con los microfilamentos, disminuye la movilidad de los mismos componentes (112).

El tratamiento de T. cruzi con colchicina y vinblastina no indujo la movilidad de los sitios antigénicos y de unión con Con A (45).

En tripomastigotes sanguíneos se indujo también la formación de

casquetes polares (capping) de los receptores de Con A (113,114). Algunos experimentos en los cuales los tripomastigotes se marcaron simultáneamente con anticuerpos y con Con A, demostraron que los dos receptores son independientes (104). Es interesante destacar que el número de tripomastigotes de T. cruzi con casquetes polares varió de acuerdo al aislamiento del parásito utilizado. Por ejemplo, los tripomastigotes de la cepa Y forman fácilmente casquetes polares, mientras que fue difícil inducir capping en parásitos de la cepa CL (114).

El proceso de capping indica claramente que las membranas de los tripomastigotes sanguíneos y de los amastigotes intracelulares, que son las dos formas de desarrollo del parásito en el huésped vertebrado, son fluidas. Se sugirió que hay un desprendimiento de los complejos Ag-Ac del casquete polar (114). Por lo tanto, es también posible que la movilización de los antígenos de superficie de T. cruzi por los anticuerpos, sea uno de los mecanismos que hacen al parásito resistente a las defensas inmunes del huésped.

Se necesitan nuevos estudios para establecer fehacientemente si existe o no una correlación entre la movilidad lateral de los componentes de membrana y la habilidad del parásito para sobrevivir en el hospedador.

#### 1.5.5 Análisis bioquímico de la membrana celular

Se ha demostrado por estudios citoquímicos que T. cruzi no presenta polisacáridos de reserva (45). Los carbohidratos presentes se encuentran asociados principalmente a la membrana plasmática del parásito, observándose también una baja reactividad indicativa de presencia de hidratos de carbono en las membranas intracelulares del complejo

de Golgi, del retículo endoplásmico y de algunas vesículas citoplasmáticas (115). Por lo tanto, los datos bioquímicos sobre glicoproteínas o polisacáridos de Trypanosoma cruzi pueden considerarse derivados de las membranas celulares.

Un complejo macromolecular conteniendo hidratos de carbono se aisló de epimastigotes de T. cruzi (116). La electroforesis en gel de poli-acrilamida de las fracciones glicoproteicas aisladas, mostró la presencia de cuatro bandas positivas para el reactivo de Schiff que fueron designadas bandas A, B, C y D respectivamente. El diagrama del gel se alteró drásticamente como consecuencia del tratamiento con enzimas proteolíticas, sugiriendo su naturaleza glicoproteica.

La banda D resistió el tratamiento con enzimas proteolíticas, recibiendo la denominación de lipopéptido fosfoglicano (LPPG) (118, 117). Los datos experimentales sugieren que el LPPG es un componente asociado a la membrana del epimastigote y que formaría parte del receptor para Con A.

Afirmando estos estudios, se aislaron antígenos de superficie (119) y polisacáridos antigénicamente activos de T. cruzi (120, 121) y recientemente se ha aislado una glicoproteína, con un peso molecular de 25.000, de epimastigotes de T. cruzi que es reconocida por suero de pacientes chagásicos y que está localizada en la superficie del amastigote, del epimastigote y del tripomastigote (122, 123).

Uno de los enfoques utilizados para el análisis de las glicoproteínas asociadas a la superficie celular, ha sido la utilización de procedimientos enzimáticos de marcación, utilizándose las técnicas de la lactoperoxidasa y la galactosa-oxidasa. Debido a que ambas enzimas no penetran la membrana plasmática, se marcan radioactivamente sólo aquellas proteínas y glicoproteínas de la membrana plasmática accesibles a la

acción de las enzimas. Las proteínas marcadas se identifican posteriormente por autoradiografía de las electroforesis en geles de poliacrilamida. Ambos procedimientos, así como la técnica del iodogen, han sido utilizados para analizar componentes de membrana de T. cruzi. El método del iodogen aparentemente no da lugar a la aparición de artefactos y asegura la marcación sólo de proteínas de superficie, dando resultados altamente reproducibles (124). Snary y Hudson (125), utilizando el método de la lactoperoxidasa, encontraron proteínas marcadas en los tres estadios del parásito; cada estadio presentó proteínas características, aunque se encontraron bandas comunes a las tres formas de desarrollo. Estos autores encontraron entre otras, una glicoproteína de P.M. 90.000 presente en los tres estadios del parásito, que contiene un 18% de hidratos de carbono (126).

Utilizando la misma metodología, Zingales y col. encontraron dos glicoproteínas marcadas con iodo radioactivo en epimastigotes, de pesos moleculares 100.000 y 8-90.000, respectivamente (127).

De acuerdo a los resultados obtenidos por Nogueira y col. (128,129), la superficie celular del tripomastigote sanguíneo presenta un componente principal de P.M. 90.000, que no fue detectado en epimastigotes o en tripomastigotes derivados de cultivos acelulares, que presentarían un componente de P.M. 75.000, que consideran característico de los estadios del parásito presentes en el insecto.

Araujo y Remington (96) observaron un esquema más complejo de bandas, encontrando dos bandas principales de P.M. 100.000 y 90.000 en tripomastigotes derivados de cultivo de tejidos y un grupo de bandas (3-4) de pesos moleculares comprendidos entre 68.000 y 94.000, así como una banda de P.M. 45.000 en amastigotes y epimastigotes. Estos autores tam-



bién describen la aparición de componentes de alto peso molecular en los tres estadios de T. cruzi. En el caso de los tripomastigotes, el estudio comparativo de tres cepas de T. cruzi permitió determinar la existencia de algunas bandas de bajo peso molecular presentes en parásitos de las cepas CL y MR, que no se encuentran en tripomastigotes de la cepa Y. En tripomastigotes de la cepa MR, se encontró una banda de P.M. 30.000, ausente en las cepas Y y CL. Este hallazgo es interesante, ya que los tripomastigotes de la cepa MR difieren de los de las cepas Y y CL en cuanto a su afinidad por determinadas lectinas (105).

Zingales y col., (130) indican que los tripomastigotes presentan un mayor número de bandas de glicoproteínas de superficie que los epimastigotes. Utilizando la técnica del iodogen e inmunoprecipitación, encontraron recientemente, que los epimastigotes presentan bandas de pesos moleculares comprendidos entre 62.000 y 150.000, dos de los cuales (de P.M. 95.000 y 80.000) estarían también presentes en el tripomastigote. Los tripomastigotes presentan una serie de bandas de P.M. comprendidos entre 68.000 y 100.000. Da, así como proteínas de alto peso molecular, y un antígeno de P.M. 85.000 que sería específico de este estadio. Recientemente, Katzin y col. purificaron una glicoproteína de P.M. 85.000 de tripomastigotes de la cepa Y, que no se detectó en amastigotes y epimastigotes (131,132).

Yoshida estudió la constitución antigénica de superficie de tripomastigotes metacíclicos de tres cepas de T. cruzi, encontrando diferencias notables, ya que una proteína de P.M. 100.000, apenas detectable en la superficie de parásitos de las cepas Y y CL, constituye el principal antígeno de superficie de los tripomastigotes metacíclicos de la cepa G (133).

Recientemente, se ha estudiado la glicosilación de residuos asparagina en proteínas de T. cruzi. El oligosacárido transferido a la proteína está constituido por manosa y N-acetil-glucosamina (134,135) y existen diferencias en las glicoproteínas maduras de los estadios epimastigote y amastigote (136).

En resumen, las glicoproteínas presentes en la superficie celular de T. cruzi varían en los distintos estadios del parásito y, se han encontrado diferencias en las proteínas de superficie de algunas cepas de T. cruzi. Es importante señalar que algunas de las diferencias encontradas por los distintos autores en cuanto al peso molecular de las glicoproteínas o proteínas puede ser consecuencia de proteólisis parcial durante la experimentación. Otros factores que pueden influenciar los resultados son la cepa o aislamiento del parásito, el origen de los parásitos y la metodología utilizada.

#### 1.6 Relación entre el parásito y el hospedador vertebrado

Uno de los mayores enigmas de la enfermedad de Chagas es la diversidad de manifestaciones clínicas, patológicas e inmunológicas que se evidencian después de la infección con el agente causal. Los tripanosomas que infectan vertebrados exhiben todo el rango de virulencia posible, desde la producción de una infección rápidamente letal hasta una relación comensal que no presenta efectos deletéreos detectables en el huésped vertebrado.

Es importante cuando se hable de la relación huésped-parásito tener en consideración las definiciones de virulencia e infectividad. La virulencia es la capacidad que presenta un parásito de dañar y causar enfermedad en un huésped. Hay otras dos características de las

infecciones parasitarias: infectividad y transmisibilidad, que están tan íntimamente relacionadas con la virulencia que a menudo se confunden los términos. Sin embargo, la infectividad no está relacionada formalmente con la virulencia, ya que la virulencia describe los efectos patogénicos observables en el huésped después de haber tenido lugar la infección por el parásito, mientras que la infectividad está dada por la capacidad que presentan los parásitos de invadir al huésped (137).

En el caso del Trypanosoma cruzi en el huésped vertebrado, la infectividad está directamente relacionada con la capacidad de penetración del parásito en el mamífero, mientras que la virulencia del parásito estaría determinada no sólo por la infectividad del mismo, sino también por otros factores, por ejemplo: edad, magnitud y modulación de la respuesta inmune desencadenada en el mamífero, duración del ciclo intracelular, sensibilidad del parásito a la respuesta inmune del hospedador, etc. Por este motivo, muchos tripanosomas estercorarios parecen ser altamente infectantes y sin embargo presentan una virulencia muy baja.

De un modo similar, la transmisibilidad del parásito depende de la disponibilidad de parásitos durante la ingesta del vector, de la tasa de crecimiento en el vector, de la estabilidad del parásito fuera del huésped, especialmente en los casos de transmisión indirecta del parásito tales como transfusiones de sangre o transmisión oral, etc.

La virulencia es una característica sumamente difícil de cuantificar. La mayoría de las evaluaciones son subjetivas, aunque en general se usa una escala de cinco puntos que utiliza los siguientes adjetivos: virulencia despreciable, baja, moderada, alta y extrema (137).

Los mecanismos por los cuales el Trypanosoma cruzi interactúa con

el hospedador vertebrado, induciendo o no la aparición de lesiones, son múltiples y dependen de varios factores que pueden influir cualitativa y cuantitativamente con el desarrollo de la infección.

#### 1.6.1 Factores dependientes del huésped vertebrado

Entre los factores dependientes del mamífero que son capaces de influir el desarrollo de las infecciones por T. cruzi, los más relevantes son:

- 1) El sexo y la edad. El estudio de los casos humanos indica que los niños y adolescentes son más susceptibles a la infección chagásica que los adultos y ancianos. Lo mismo ocurre en animales infectados experimentalmente (87,138). Nauchka (138) demostró que el ratón macho es más susceptible a la infección que la hembra.
- 2) Constitución genética. Se ha demostrado que la susceptibilidad de los ratones a la infección por T. cruzi está influenciada por el fondo genético de los hospedadores (139). Pizzi y col. (140) sugirieron que la reacción inflamatoria, el nivel de parasitemia y la tasa de mortalidad de los ratones infectados depende en gran medida de la constitución genética del ratón. Algunas cepas de ratón son sumamente susceptibles a la infección por T. cruzi mientras que otras son altamente resistentes (140). Kuhn estudió la resistencia de varias cepas de ratón a T. cruzi y encontró diferencias notables, concluyendo que la capacidad de un animal para resistir la infección por T. cruzi es aparentemente un fenómeno poligenético (141).
- 3) Efecto de la inmunosupresión. Interferón. Las hormonas esteroides, especialmente la cortisona, elevan la parasitemia durante la fase aguda de la infección (137), aunque aparentemente no afectan las infec-

ciones crónicas (28). La timectomía neonatal trae como consecuencia parasitemias más altas y menor sobrevivencia de los ratones infectados experimentalmente (142) y el período agudo es más grave en ratones genéticamente atímicos (143,144), sugiriendo que la inmunidad timo dependiente juega un papel importante en el desarrollo de la infección. James y col. (145) investigaron el efecto del interferón sobre la etapa aguda de la infección en ratones endocriados de la cepa C<sub>57</sub> BL/6j, encontrando que el interferón, o los mecanismos efectoros inducidos por el interferón, producen resistencia a la infección por T. cruzi.

Kierzenbaum y Sonenfeld encontraron que el interferón presenta un efecto inhibitorio de la infección de células de vertebrado por T. cruzi (146).

4) Reinfeción. Se ha sugerido que la reinfeción repetida puede ser uno de los factores responsables de la severidad de la parasitemia y de la cardiopatía observada en algunos casos (137). Se ha demostrado que el estadio crónico de la enfermedad en el ratón se puede obtener inoculando dosis subletales de poblaciones parasitarias con capacidad letal (147,148) o bien con otras poblaciones no letales para el ratón (149).

5) Factores nutricionales. La parasitemia es más alta y las lesiones más severas en animales con deficiencias nutricionales (137).

#### 1.6.2 Factores dependientes del parásito

Entre los factores dependientes del parásito capaces de influenciar el desarrollo de la infección por el Trypanosoma cruzi se pueden mencionar:

1) Polimorfismo. Se ha descrito la existencia de formas tripomastigo-

tes delgados (slender) y anchos (broad). Brener considera que las formas delgadas son más infectantes, inducen parasitemias más altas y presentan mayor letalidad (28). Existen cepas con marcada predominancia de uno u otro tipo morfológico (150).

2) Constitución antigénica. Se han identificado distintos tipos de antígenos que podrían estar relacionados con las diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas (151).

Asimismo, se ha demostrado que fracciones subcelulares antigénicas del parásito son capaces de inducir la aparición de lesiones en conejo (152) y en ratón (153).

3) Número de parásitos inoculados. Ya en 1953, Silva y Nussenzweig demostraron que la severidad de la lesión y la tasa de sobrevivencia de animales en experimentación depende del número de parásitos inoculados (154). Este fenómeno se conoce generalmente como relación dosis-respuesta.

4) Virulencia. Algunas cepas o aislamientos de T. cruzi presentan una alta virulencia y son capaces de originar infecciones severas con altas tasas de mortalidad, ya sea con inóculos bajos o aún cuando se inocula un solo parásito (137). Otras cepas de T. cruzi, por el contrario, presentan una baja virulencia.

Theodor von Brandt y col. (77), estudiando en forma comparativa la patogenicidad e infectividad en ratas blancas de cuatro aislamientos de T. cruzi, encontraron diferencias notables entre ellos. En el curso de este estudio, la cepa Guatemala no produjo mortalidad de las ratas cuando se llevaron a cabo los experimentos iniciales. Sin embargo, unas meses más tarde su virulencia había aumentado tanto que la mayoría de las ratas moría al cabo de 3-4 semanas post-inoculación.

Este fenómeno se observa frecuentemente con parásitos recientemente aislados.

Chiari (155) encontró diferencias en la infectividad in vivo de la cepa Y de T. cruzi mantenida en cultivo axénico bajo condiciones de laboratorio durante lapsos variables comprendidos entre 1,5 y 18 años. Un hecho similar fue observado por Corsini y col. (156), mientras que Segura y col. (76) encontraron una variación en la capacidad infectante de una cepa de T. cruzi, como consecuencia de la modificación de la composición del medio de cultivo.

### 1.6.3 Respuesta inmune

La entrada de una sustancia extraña en un organismo, activa los mecanismos de defensa que eventualmente culminan con la destrucción de la partícula, sea ella inerte o viva. La primera defensa que se pone en juego es la captación de la partícula por células fagocíticas especializadas denominadas macrófagos. El estudio filogenético de este mecanismo muestra que es un proceso meramente nutricional en los seres biológicamente menos evolucionados. Sin embargo, con la aparición de células o sistemas más evolucionados, este proceso pasa a convertirse en un mecanismo que interviene en la resistencia del organismo a distintos agentes, inicialmente como una manifestación de inmunidad no específica.

La inmunidad específica implica no sólo la adaptación de funciones filogenéticamente pre-existentes, como por ejemplo la fagocitosis por los macrófagos, sino también la aparición de nuevas funciones, órganos especializados, líneas celulares, pasos metabólicos, etc., dedicados exclusivamente a este fin. En los vertebrados superiores existe un

alto grado de complejidad y especificidad evidenciado por la síntesis de proteínas, denominadas anticuerpos, secretados por células productoras, y el desarrollo de la memoria inmunogénica (157).

Aparentemente, todas las manifestaciones del sistema inmune tienen un rol significativo en la resistencia al T. cruzi. Las células efectoras no específicas, tales como los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares, así como las respuestas específicas mediadas por los linfocitos T y B, participan en la defensa del mamífero contra estos hemoflagelados (141). Sin embargo, aunque las respuestas inmunes celular y humoral, así como también los mecanismos de fagocitosis, tienen gran importancia en la infección por Trypanosoma cruzi, se desconoce cómo actúan las respuestas específicas in vivo para controlar al parásito y por qué no parece posible desarrollar una inmunidad esterilizante contra el T. cruzi. Durante la fase aguda de la enfermedad el sistema inmune responde reduciendo drásticamente el número de parásitos en la sangre y en los tejidos; sin embargo, el huésped alberga al parásito durante el período crónico y aparentemente durante toda su vida (141).

T. cruzi permanece gran parte de su ciclo de vida protegido de la respuesta inmune del hospedador, ya que es un parásito intracelular. Los linfocitos son capaces de destruir células infectadas, liberando las formas intracelulares al medio extracelular, donde son más vulnerables. Desafortunadamente, el mamífero aparentemente se sensibiliza a sus propios antígenos de este modo, y se han detectado autoanticuerpos que podrían participar en el desarrollo de severas lesiones en el paciente.



### 1.6.3.1 Anticuerpos policlonales

Las inmunoglobulinas son moléculas proteicas portadoras de sitios que reconocen la estructura de los determinantes o epitopes situados en la superficie de la sustancia extraña, denominada antígeno, y se unen a ellos. La unión del antígeno con el anticuerpo desencadena ciertos procesos tendientes a neutralizar y eliminar al antígeno. La respuesta mediada por anticuerpos es muy heterogénea. La inmunización de un animal con un agente antigénico trae como consecuencia la elaboración de anticuerpos dirigidos contra las distintas moléculas antigénicas del material inyectado y contra los distintos determinantes de las mismas, produciéndose una gama de inmunoglobulinas que reconocen en grado variable a todos los determinantes. Por esta razón, los antiseros convencionales contienen mezclas de anticuerpos que difieren de un animal a otro.

La detección de la respuesta inmune humoral se utiliza con fines diagnósticos en la enfermedad de Chagas.

Actualmente se está tratando de relacionar los resultados del análisis de los títulos de anticuerpos de pacientes sintomáticos y asintomáticos contra los diferentes antígenos de T. cruzi, con las diversas manifestaciones clínicas (158). Los anticuerpos de pacientes chagásicos crónicos mostraron diferencias con respecto al comportamiento serológico y a su capacidad para lisar parásitos (159). Todas las poblaciones de T. cruzi son capaces de inducir la formación de anticuerpo; sin embargo, no todas las cepas son capaces de estimular la formación de anticuerpos neutralizantes y líticos que interactúan con el tripomastigote sanguíneo (159).

Varias investigaciones demostraron que las preparaciones de formas

de cultivo muertas pueden inducir una resistencia efectiva contra tripanosomas que serían letales en animales no inmunizados con el antígeno. González-Cappa y col. (160) han encontrado una excelente protección inmunizando ratones con epimastigotes muertos, previamente al desafío con T. cruzi. Segura y col. obtuvieron una marcada sobrevida de ratones inmunizados con homogeneizados del parásito y con fracciones subcelulares de epimastigotes de la cepa Tulahuen (161,162,163).

Es bien conocido que los epimastigotes de T. cruzi se lisan en presencia de suero de mamífero mientras que los tripomastigotes son resistentes, habiéndose demostrado que esta lisis está mediada por la vía alternativa del complemento (164). Como la lisis mediada por complemento involucra principalmente la participación de la membrana celular del parásito, es posible que las diferencias de susceptibilidades encontradas entre epimastigotes y tripomastigotes de T. cruzi reflejen diferencias en las propiedades de membrana. Las formas amastigote son también resistentes a la lisis mediada por complemento (164).

Los estudios realizados preincubando formas sanguíneas de T. cruzi con suero conteniendo anticuerpos contra el parásito indican que la superficie celular puede variar de un aislamiento de T. cruzi a otro. Este aspecto ha sido extensivamente analizado por Krettli (165) y Krettli y Brenner (166). Estos autores demostraron que los tripomastigotes sanguíneos de la cepa Y se aglutinan en presencia de suero, mientras que no se aglutinan las formas sanguíneas de la cepa CL.

Se ha demostrado que los tripomastigotes sanguíneos se lisan en presencia de anticuerpos específicos y complemento (167). Krettli (165) demostró que los tripomastigotes de la cepa CL son incapaces de activar el complemento y no se lisan, a diferencia de los tripomastigotes de la

cepa Y de T. cruzi, lo que indica la existencia de diferencias en propiedades de superficie de los tripomastigotes sanguíneos de ambas cepas. Resultados posteriores sugieren que esta diferencia podría atribuirse al hecho de que los tripomastigotes de la cepa CL presentan la capacidad de fragmentar las moléculas de inmunoglobulinas adheridas a su superficie, de modo tal que sólo los fragmentos Fab permanecen asociados a la membrana del parásito, mecanismo que se conoce con el nombre de fabulación (168).

Se ha determinado que los animales infectados crónicamente con T. cruzi presentan tanto anticuerpos líticos como no líticos, los cuales pueden ser determinados por inmunofluorescencia, presentándose lisis por el agregado de complemento (169), y que los anticuerpos líticos no se detectan en animales tratados y considerados curados por exámenes de gota gruesa y hemocultivo, lo que abre la posibilidad del uso de los anticuerpos contra las formas sanguíneas detectados por lisis mediada por complemento como un criterio de cura de la enfermedad de Chagas (170).

#### 1.6.3.2 Anticuerpos monoclonales

Cada anticuerpo es producido específicamente por una línea de linfocitos y de células plasmáticas derivadas. Por lo tanto, el aislamiento de un linfocito y su proliferación en cultivo produciría una progenie capaz de sintetizar un solo anticuerpo en grandes cantidades, el que se denomina anticuerpo monoclonal. Lamentablemente, las células secretoras de anticuerpos no pueden mantenerse en un medio de cultivo.

Hay ciertos tumores malignos, denominados mielomas, cuyas células poseen un gran capacidad de proliferación y producen grandes cantidades de inmunoglobulinas anormales, denominadas proteínas mielómicas. Cada

tumor es en realidad un clon de células descendientes de una única célula progenitora. Estas células pueden cultivarse indefinidamente. En 1975, Kohler y Milstein (171) pudieron fusionar células de mieloma de ratón con linfocitos de bazo de ratones inmunizados con un determinado antígeno. La progenie de células híbridas resultantes de la fusión, denominada hibridoma, expresaba tanto la propiedad de producir anticuerpos específicos del linfocito, como el carácter inmortal de las células mielómicas (Figura 3).

Los hibridomas se mantienen en el laboratorio según las técnicas habituales de cultivo de células animales. Las células híbridas pueden clonarse y expandirse en cultivos productores de grandes cantidades de anticuerpos monoclonales.

Los clones se conservan durante lapsos muy prolongados y pueden inyectarse en animales a fin de obtener altas concentraciones de anticuerpos monoclonales.

La fusión celular puede ocurrir espontáneamente, pero en general se requiere de agentes para incrementar el porcentaje de fusiones y que permitan un estricto control de las mismas. El agente más comúnmente utilizado es el polietilenglicol (PEG), aunque recientemente se ha reemplazado en muchos laboratorios por la electrofusión (172).

Las primeras líneas de mieloma utilizadas para la producción de hibridomas producían inmunoglobulinas, por lo cual los anticuerpos monoclonales presentaban contaminación. Actualmente se utilizan líneas celulares no secretoras, que presentan un defecto en la enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa, por lo cual los híbridos se seleccionan en general en un medio selectivo conteniendo hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) (173).

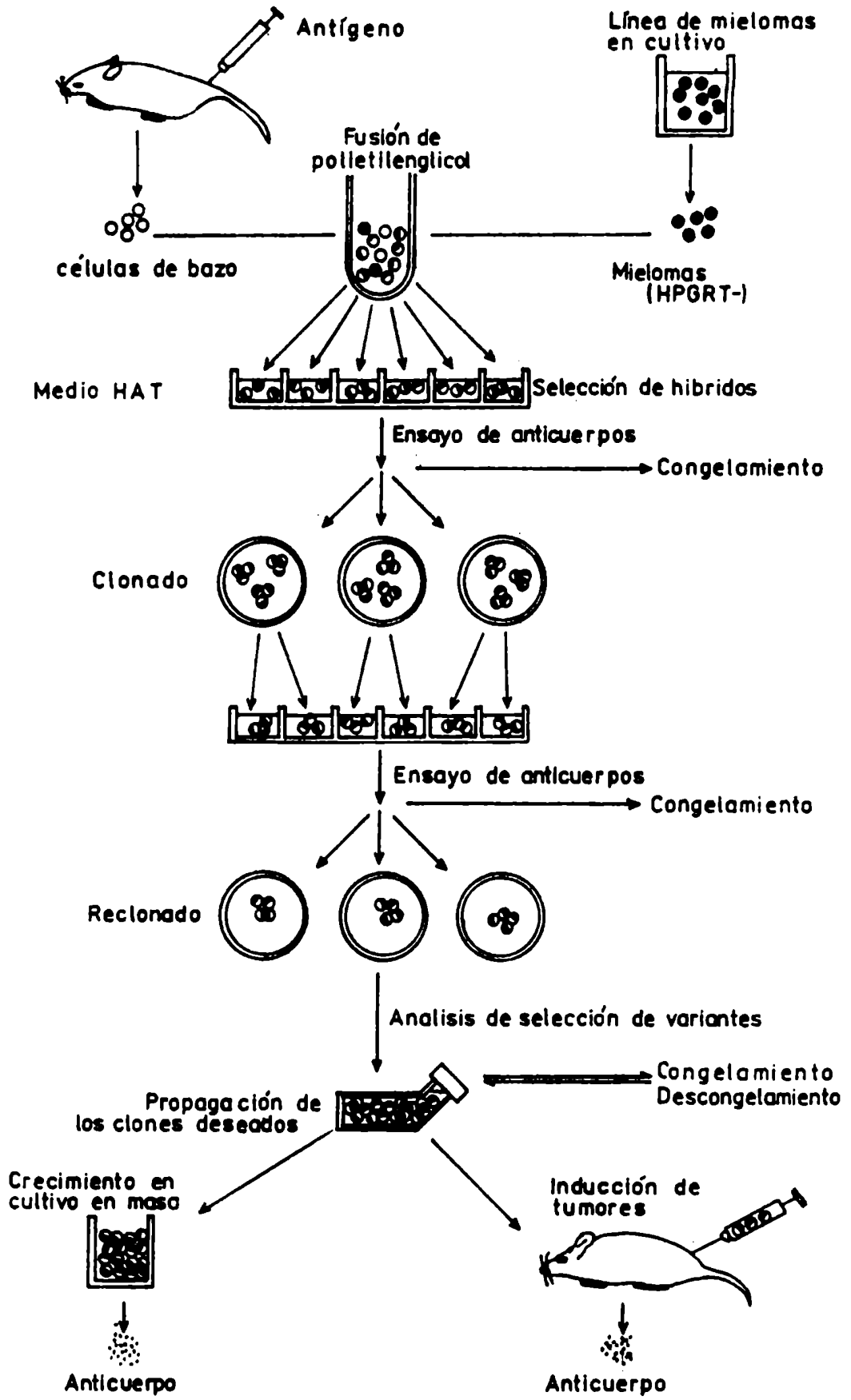


Figura 3. Método convencional de obtención de anticuerpos monoclonales.

Las células que sobreviven y que conservan la capacidad secretora serán las que iniciarán una nueva línea celular híbrida de crecimiento prolongado; o sea serán los hibridomas.

Los anticuerpos monoclonales obtenidos por esta metodología constituyen una herramienta notable en muchas áreas de la medicina y de la investigación biológica.

El uso de los anticuerpos monoclonales abrirá nuevas posibilidades para el aislamiento de componentes específicos de la membrana plasmática del Trypanosoma cruzi. Snary y col. (174) han obtenido un anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno de P.M. 72.000 presente en epimastigotes de T. cruzi, aunque se ha demostrado que este antígeno no se encontraría universalmente expresado, ya que hay algunas cepas y clones del parásito que no reconocen a este anticuerpo monoclonal (85).

Se han obtenido anticuerpos monoclonales que reconocen sólo a epimastigotes o a amastigotes de T. cruzi (175), demostrándose por inmunofluorescencia que los sitios antigénicos reconocidos por estos anticuerpos monoclonales no están distribuidos uniformemente en toda la superficie del parásito.

Recientemente, Colli (176) obtuvo tres anticuerpos monoclonales por inyección de tripomastigotes inactivados con 8-metoxi-psoralen en ratones, los cuales fueron capaces de inhibir la interiorización de tripomastigotes de la cepa Y de T. cruzi en células de vertebrado in vitro. El porcentaje de inhibición osciló entre un 55-75%. Estos anticuerpos monoclonales fueron capaces de inmunoprecipitar la glicoproteína de P.M. 85.000, denominada Tc-85, presente en la superficie del tripomastigote.

### 1.7 Interacción entre el Trypanosoma cruzi y la célula huésped

El problema del reconocimiento celular es de importancia fundamental en muchas áreas de la biología (177,178). Hay básicamente dos tipos de mecanismos de reconocimiento: uno depende de la habilidad de las células para reconocer sustancias difusibles, tales como factores quimiotácticos, y el otro depende de características de la superficie celular.

Las moléculas de superficie involucradas en el reconocimiento celular de células procariontes y eucariontes son los carbohidratos, los que frecuentemente están asociados con proteínas y/o lípidos. Como moléculas de información, los hidratos de carbono tienen muchas ventajas sobre las proteínas o los ácidos nucleicos, por su habilidad para presentar una gran variedad de configuraciones espaciales, por presentar distintos tipos de uniones (por ejemplo, uniones  $\alpha$  y  $\beta$ ) y por formar estructuras ramificadas (por ejemplo, por uniones O y N glicosídicas). De este modo, un oligosacárido de 12 residuos de 3 manosas, 3 N-acetilglucosaminas, 3 galactosas y 3 ácidos siálicos, puede presentar  $10^{24}$  estructuras posibles. Los hidratos de carbono de la membrana celular están constituidos por nueve unidades básicas: cuatro azúcares de 6 carbonos (glucosa, galactosa, manosa, fucosa), dos azúcares de 5 carbonos (arabínosa, xilosa), dos amino-azúcares (N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina) y ácido siálico. Estos azúcares son unidos por glicosil-transferasas de distintas especificidades para formar oligosacáridos ramificados. Las glicoproteínas y los glicolípidos están insertados asimétricamente en la membrana celular, con los determinantes hidrocarbonados en la superficie externa. Los hidratos de carbono expresados en la superficie celular están involucrados en fenómenos de

reconocimiento en una gran variedad de especies animales y vegetales. Las moléculas de carbohidratos son reconocidas por moléculas de proteínas o glicoproteínas, denominadas lectinas, las que establecen interacciones complementarias. El término lectinas se utilizó inicialmente para describir moléculas derivadas de plantas que reconocen hidratos de carbono, tales como fitohemaglutinina y concanavalina A, ambas extraídas de porotos. Las especificidades de algunas lectinas se muestran en la tabla 1 (177).

La mayoría de las lectinas interactúa específicamente con un único azúcar, aunque algunas presentan una especificidad más amplia que incluye azúcares muy relacionados (179). Algunas lectinas interactúan sólo con estructuras complejas de hidratos de carbono, tales como las presentes en glicoproteínas. Algunas moléculas proteicas presentan actividad de unión (binding) sin ser estrictamente lectinas y se las denomina de tipo lectina. Estas proteínas de tipo lectina incluyen a proteínas de transporte, hormonas y toxinas. Algunas de estas proteínas presentan múltiples sitios de unión y pueden aglutinar células, mientras que otras presentan sólo un sitio y no pueden hacerlo, no cumpliendo con la estricta definición de una lectina.

El rol biológico de las lectinas y el reconocimiento de carbohidratos ha sido descrito en una gran variedad de especies primitivas y en interacciones celulares en especies más evolucionadas y en mamíferos (177,178).

Por ejemplo, las bacterias se unen a la membrana del macrófago por un mecanismo que parece involucrar el reconocimiento de azúcares de la membrana bacteriana por receptores de tipo lectina presentes en el macrófago, y esta unión puede ser inhibida por monosacáridos. La glucosa



TABLA I

## ESPECIFICIDADES DE ALGUNAS LECTINAS

| <u>Planta</u>                          | Especificidad por Hidrato de Carbono     |
|--|--|
| Fitoemglutinina (PHA)<br>(poroto rojo) | D-Gal Nac                                |
| Aglutinina de germen de trigo<br>(WGA) | (D-GlcNac) <sub>2</sub> ;<br>ác. siálico |
| Ricinus comunis                        | β-D-Gal                                  |
| Aglutinina de soja                     | D-GalNac; D-Gal                          |
| Concanavalina A                        | α-D-Man; α-D-Glc                         |
| Lens culinaris<br>(lenteja)            | Man ; Glc                                |
| Arachis hypogea<br>(maní)              | Gal                                      |
| <u>Bacterias</u>                       |  |
| Escherichia coli                       | Man                                      |
| Salmonella typhimurium                 | Man                                      |
| Pseudomonas aeruginosa                 | Gal                                      |
| <u>Animales</u>                        |  |
| de hígado de rata                      | Gal                                      |
| de hígado de aviar                     | Glc Nac                                  |
| de Helix pomatia<br>(caracol)          | Gal Nac                                  |

y la galactosa inhiben la unión de numerosas especies de bacterias a macrófagos. En Salmonella typhimurium se han encontrado mutantes del tipo salvaje que no son inhibidas por ninguno de los azúcares que inhiben al tipo salvaje (177).

Algo similar ocurre en Klebsiella aerogenes. La adhesión de Escherichia coli a células epiteliales está mediada por moléculas de tipo lectina presentes en su pared celular (177, 199).

Actualmente está claro que la interacción entre hidratos de carbono y lectinas juega un rol importantísimo en la actividad de células fagocíticas (177,178,200), tales como la unión e ingestión de bacterias, eritrocitos tratados con sialidasa, levaduras y células tumorales. Pero también esta interacción tiene lugar entre células no fagocíticas, como por ejemplo, se ha demostrado que el reconocimiento especie-específico de hidratos de carbono de superficie está involucrado en las interacciones entre el espermatozoide y el huevo en el ascidio Ciona intestinalis (177).

Existen actualmente numerosas evidencias de que la interacción entre T. cruzi y la célula huésped del vertebrado estaría mediada por glicoproteínas presentes tanto en la superficie del parásito como en la superficie de la célula huésped.

Generalmente sólo son visibles los resultados netos de las interacciones entre el parásito y la célula huésped, por lo que hay numerosas preguntas sin respuesta en el conocimiento de las interacciones que tienen lugar entre T. cruzi y la célula de vertebrado. Para responder a estas preguntas es necesario un mejor conocimiento de algunos de los eventos biológicos básicos, lo que es sumamente difícil o imposible de determinar en sistemas in vivo.

49

Kofoid y col. (36) demostraron que es posible estudiar la interacción entre T. cruzi y las células de vertebrado in vitro, concluyendo que el ciclo intracelular era similar al ciclo del parásito en el mamífero. Estos autores abrieron la posibilidad de estudiar las interacciones entre T. cruzi y las células huésped en sistemas de menor complejidad. Los pasos iniciales en esta interacción consisten en la atracción del parásito por la célula huésped (180), la adhesión a la membrana celular y la penetración del parásito por su extremo posterior (40) en la célula huésped del vertebrado. Por microscopías óptica y de contraste de fase es posible visualizar a los tripomastigotes al contactar con la célula huésped; sin embargo es imposible determinar con certeza el instante en que tiene lugar la penetración del parásito en la célula huésped. Una misma célula puede ser invadida en forma múltiple por T. cruzi; más aún las células huésped infectadas continúan siendo susceptibles a la infección por T. cruzi durante todo el curso del ciclo intracelular del parásito (40). Después de invadir la célula huésped del vertebrado, el tripomastigote se reorganiza, transformándose en amastigote, el cual permanece quiescente durante un lapso variable, denominado período lag, antes del inicio de la reproducción. La duración del período lag es característica de la subpoblación de T. cruzi estudiada y se estima que se hallaría comprendida entre las 12-72 horas (43). Por lo tanto, todos los parásitos intracelulares encontrados con anterioridad a la iniciación de la reproducción son aquellos parásitos que se interiorizaron en la célula huésped. Esto significa que el número de parásitos intracelulares, encontrados pocas horas después de la exposición de las células huésped a tripomastigotes infectantes, puede ser utilizado como una medida cuantitativa de la habilidad de una po-

blación de parásitos para penetrar en una población de células huésped. En consecuencia, aunque el proceso de penetración no puede ser observado directamente, es posible determinar la cinética de la interiorización parasitaria (42).

Según se mencionó anteriormente, un número significativo de células de vertebrado son penetradas por más de un parásito. Este hecho no se ve reflejado por datos expresados como porcentaje de células infectadas. Además, el porcentaje de células infectadas comienza a decrecer significativamente aproximadamente 12 horas post-infección, lo que se debe probablemente a la multiplicación normal de las células huésped. Este problema puede ser solucionado si se estudia a los cultivos infectados dentro de las ocho horas de exposición a los parásitos. Si se utiliza la media del número de parásitos por célula como medida de la penetración se logra una mejor definición de la naturaleza de la distribución de los parásitos en la población de células de vertebrado y se cuantifica el fenómeno de la penetración múltiple de parásitos en una misma célula huésped.

La distribución de Trypanosoma cruzi en una población de células de vertebrado se ve adecuadamente definida por una ecuación binomial negativa (Figura 4). Otros parásitos también presentan este tipo de distribución en sus huéspedes respectivos (42).

Este tipo de sistemas parásito-célula huésped in vitro puede ser utilizado como una herramienta en estudios dirigidos a identificar los componentes del tripomastigote y de la célula huésped responsables del proceso de infección, para comprender el mecanismo de la relación huésped-parásito a nivel de membranas celulares, así como también para estudiar el efecto de factores físicos, químicos y biológicos sobre la

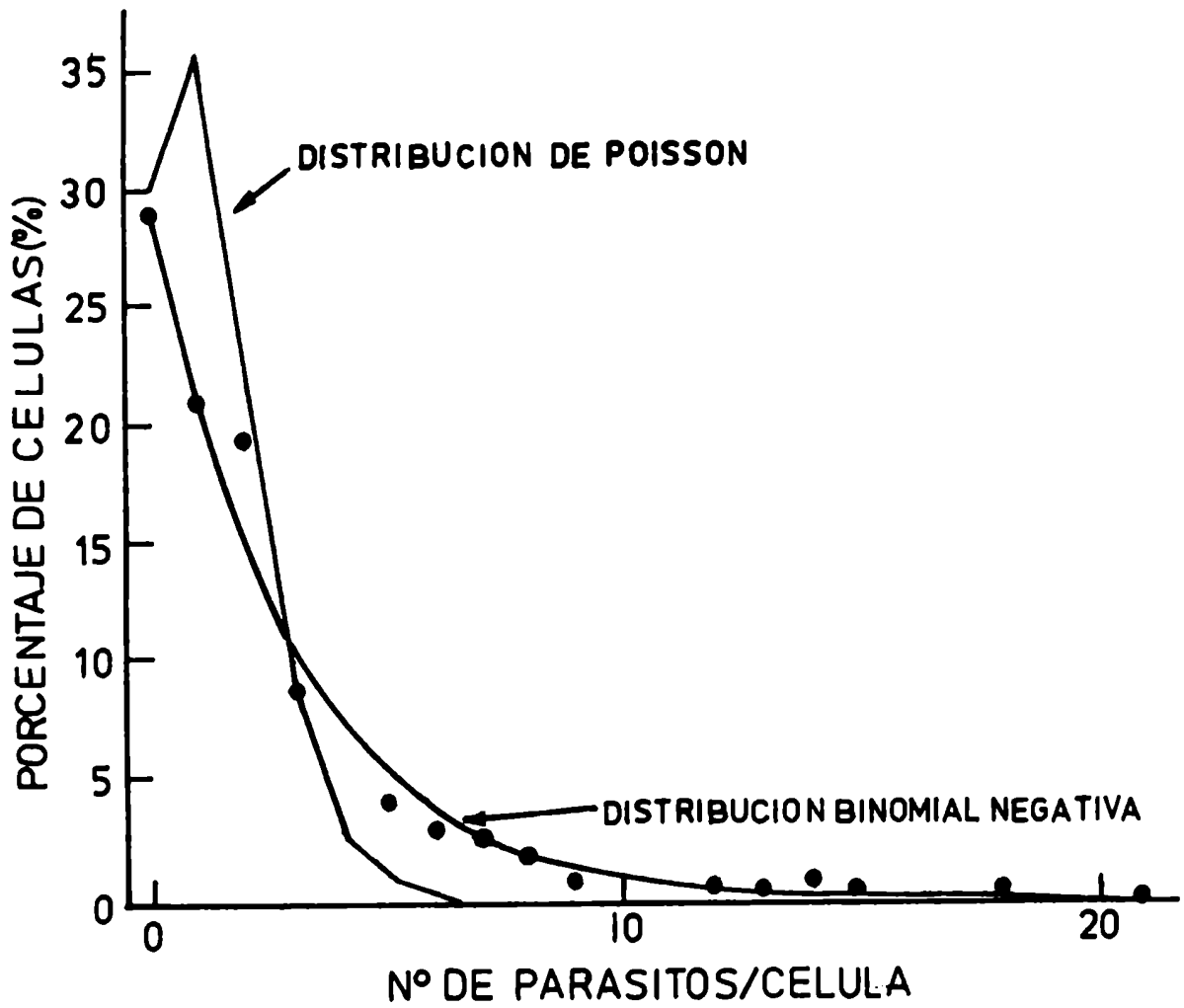


Figura 4. Representación gráfica de la distribución de parásitos en una población de células BESM expuestas a  $0,9 \times 10^5$  tripomastigotes de la cepa Ernestina de *T. cruzi* durante 4 horas (círculos sólidos), comparada con las predicciones de las distribuciones binomial negativa y de Poisson. Los datos experimentales se corresponden adecuadamente con la distribución binomial negativa. (Según Hyde y Dvorak, 42).

interacción entre T. cruzi y la célula del vertebrado.

Se ha visto que la incorporación de partículas en células comprende dos pasos: la adhesión y la interiorización. En T. cruzi es posible cuantificar la adhesión como una fase independiente de la infección, que es un proceso que incluye a la adhesión y a la interiorización del parásito (181,182).

#### 1.7.1 Interacción entre T. cruzi y células no fagocíticas

Las infecciones por T. cruzi no se distribuyen uniformemente en todos los tejidos de un animal, sino que ciertos tejidos se ven afectados más severamente que otros. Bice y Zeledón (68) demostraron que la magnitud de la infección y la localización de los parásitos presentes en los tejidos de ratones infectados experimentalmente por T. cruzi, varían con la cepa del parásito utilizada.

Los resultados obtenidos in vitro se correlacionan con esta observación. Por ejemplo, se observa una mayor interiorización de tripomastigotes de la cepa Ernestina de T. cruzi en células de músculo esquelético que en células de riñón o de neoplasma (39), mientras que la cepa Y de T. cruzi ha sido descrita como macrófago trópica (28). Las causas de estas diferencias no han sido definidas hasta el presente, pero estas diferencias indican que la célula huésped no presenta un rol pasivo en el proceso de infección. Algunas evidencias que corroboran esta afirmación se detallan a continuación.

Se encontraron diferencias en la infección de células fibroblásticas por T. cruzi cuando se utilizaron cultivos confluentes y no confluentes de células huésped, siendo los primeros menos susceptibles a la infección por T. cruzi (183).

Asimismo pudo determinarse en un sistema T. cruzi-células Hela, que la infección está modulada por el ciclo celular de las células de mamífero y que la penetración del parásito es máxima durante la fase S del ciclo celular (184).

Se encontraron diferencias de infectividad cuando se sometió a células fibroblásticas a diversos tratamientos, tales como por ejemplo, periodato y tripsina, previamente a la infección por T. cruzi y cuando se utilizaron células expuestas a drogas que alteran el citoesqueleto celular, tales como citocalasina B, colchicina y vinblastina, que interactúan con los microfilamentos y microtúbulos que controlan la movilidad de los componentes de membrana (185,181). En estos casos, la infección de las células huésped por T. cruzi se vió significativamente reducida con respecto a los controles.

Piras y col., encontraron que la tripsinización de células Vero trae aparejada una menor susceptibilidad a la adhesión e interiorización de tripomastigotes derivados de cultivo de tejidos, que retornó a los valores normales por incubación de las células en medio de cultivo 4-5 horas después de la tripsinización (183,181). Esta recuperación se vió bloqueada en presencia de tunicamicina durante el período de recuperación celular, aunque la adhesión retornó a valores normales. Se pudo determinar que la tunicamicina suprimió la incorporación de manosa estimulada por la tripsinización previa de las células de mamífero.

Por lo tanto, es muy factible que la composición y/o distribución de algunos componentes de la membrana de la célula huésped desempeñen un papel específico y prominente en la adhesión y penetración del parásito y es de suma importancia intentar indentificarlos.

Como se mencionara anteriormente, uno de los mecanismos conocidos de interacción célula-célula involucra las glicoproteínas de superficie presentes en una de las células y las proteínas de tipo lectina complementarias presentes en la otra (186). Los experimentos realizados por Henriquez y col. (183) sometiendo a los cultivos de tres tipos distintos de células de vertebrado, Vero, MA-103 y células embrionarias de músculo de pollo, a tratamientos con lectinas previamente a la infección por T. cruzi mostraron que la Con A, WGA, Ricino I y PHA produjeron una inhibición en la interiorización del parásito que osciló entre el 20% y el 90%, dependiendo del tipo de lectina y de la célula huésped. Esta inhibición no se evidenció cuando la célula huésped fue pre-tratada con la lectina y el correspondiente azúcar-hapteno en forma simultánea. Cuando se utilizó más de una lectina en forma simultánea, la inhibición fue superior a la obtenida por la exposición de las células a cada una de las lectinas por separado (183).

Recientemente se encontró que la fibronectina, que es una glicoproteína de alto peso molecular presente en la sangre, el tejido conectivo y la superficie celular, se une a tripomastigotes de T. cruzi por una reacción específica y reversible. La presencia de anticuerpos anti-fibronectina en el medio de cultivo inhibe la infección de células fibroblásticas de rata, sugiriendo que la fibronectina actuaría como un sitio de reconocimiento para la adhesión de los parásitos (187). Estos resultados confirman que la adhesión y la interiorización de T. cruzi serían eventos independientes entre sí y se ha postulado que habría dos glicoproteínas de la célula huésped involucradas en las fases de adhesión y penetración, respectivamente (181).

Por otro lado, el tripomastigote de Trypanosoma cruzi penetra acti-



vamente en la célula de vertebrado, desempeñando un papel fundamental en la interacción con la célula huésped. Se han determinado hasta el momento numerosos factores que alteran la infección, contribuyendo al conocimiento de los mecanismos que intervienen en la interacción entre ambas entidades.

Con respecto a los factores físicos analizados, ha podido determinarse que existe una relación entre la temperatura, en el rango comprendido entre 19 y 35°C, y la capacidad infectante de los tripomastigotes (39). Asimismo, la interiorización del parásito presenta una relación con el volumen de la célula huésped; las células más pequeñas son penetradas por más parásitos por unidad de área (42).

El análisis cuantitativo de la fase de penetración de tripomastigotes de la cepa Ernestina de T. cruzi demostró que la habilidad de los parásitos para interiorizarse disminuye en función del tiempo (42) y es dependiente de la concentración de parásitos utilizada. Piras y col. (188) por el contrario, encontraron que la habilidad de los tripomastigotes recién liberados de cultivos celulares para infectar células fibroblásticas se encuentra sólo parcialmente expresada y que estos parásitos pueden incrementar notoriamente su capacidad de adhesión e infección por un proceso de incubación in vitro en medio de cultivo con el agregado de suero fetal bovino, proceso que depende del tiempo de incubación de los parásitos.

Algunos autores establecen una correlación entre la morfología del parásito y su infectividad. Bertelli y Brener (150) indican que la presencia de tripomastigotes delgados (slender) es esencial para que ocurra el proceso de infección. También se ha determinado que los tripomastigotes de la cepa EP de T. cruzi sufren una transformación morfo-

lógica a formas de tipo amastigote, con un paralelo aumento de la capacidad infectante, al ser incubados en medio de cultivo (188,198).

Otros autores no encuentran una correlación entre la presencia de tripomastigotes delgados y la capacidad infectante de las cepas CL e Y (189), por lo cual las evidencias disponibles hasta el momento impiden corroborar una posible correlación entre ambos parámetros.

La presencia de suero en el medio de cultivo no es esencial para la adhesión y la invasión de células de mamífero (182). En este sentido el comportamiento de los tripomastigotes de T. cruzi difiere del de otro parásito intracelular obligado, el esporozoíto de la malaria, que requiere indefectiblemente la presencia de suero normal para poder interactuar con la célula huésped. No obstante, se obtiene una menor interiorización de los tripomastigotes de T. cruzi en ausencia de suero, lo que puede atribuirse probablemente a una disminución de la capacidad de supervivencia de los parásitos en esas condiciones (182), ya que se conoce que los tripomastigotes se destruyen en ausencia de proteínas en el medio (190).

Andrews y Colli (182) observaron que la exposición de tripomastigotes provenientes de cultivo de tejidos a altas concentraciones de suero fetal bovino (superiores al 20% (V/V)), así como también a altas concentraciones de distintos sueros normales provenientes de varias fuentes y de varias especies, produjo un efecto inhibitorio tanto de la adhesión como de la penetración de los parásitos, que fue revertido por el tratamiento de los parásitos con tripsina. Estos resultados se interpretaron como indicadores de que un factor presente en el suero se unía a los parásitos. Por el contrario, Piras y col., (181,191) no sólo no encontraron efecto inhibitorio del suero fetal bovino, sino

que se evidenció un aumento de la capacidad infectante de los tripomastigotes en esas condiciones. Más aún, se evidenció un aumento de la adhesión y de la penetración de los parásitos por acción de la tripsina, aún en ausencia de suero fetal bovino. Estas diferencias en los resultados obtenidos podrían deberse a diferencias en las metodologías experimentales o a las distintas concentraciones de tripsina utilizadas, siendo también factible que puedan atribuirse a diferencias en las cepas de parásitos.

La preincubación de los tripomastigotes con sueros de pacientes chagásicos trae como consecuencia un 60% de inhibición de la interiorización de los parásitos en células de mamífero, cuando se compara con el efecto de sueros humanos normales o suero anti-epimastigote obtenido en conejo. Estos resultados sugieren que los antígenos involucrados en el proceso de interiorización son aquellas glicoproteínas específicas del estadio tripomastigote (130).

Colli y col., estudiaron el efecto de distintos antisueros sobre la infectividad de T. cruzi. El suero hiperinmune preparado contra la fracción de proteínas del tripomastigote, eluidas de la región comprendida entre los 75 kDa y los 90 kDa de geles de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio, inhibe hasta un 80% la interiorización de los tripomastigotes (176). El antisuero preparado contra los polipéptidos comprendidos en el rango de 80-90 kDa y de 50-60 kDa (192) inhibió hasta un 85% la interiorización del parásito en células de mamífero, mientras que un anticuerpo policlonal obtenido contra proteínas de epimastigotes de pesos moleculares comprendidos en el mismo rango, presentó un efecto inhibitorio mucho menos pronunciado, alcanzándose una inhibición de hasta un 35%.

Como se mencionó anteriormente, el análisis por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida de las proteínas iodinizables de superficie del T. cruzi permitió determinar la existencia de varias glicoproteínas comprendidas en el rango de 68 kDa y 120 kDa, así como también de glicoproteínas de alto peso molecular en el estadio tripomastigote. La glicoproteína 5 denominada Tc-85, contiene N-acetil-D-glucosamina y se cree que estaría involucrada en la penetración del parásito (176). El tratamiento de los tripomastigotes con tripsina trajo aparejada la pérdida de la mayoría de las glicoproteínas de superficie del parásito, excepto las proteínas 3, 4 y 8, de pesos moleculares 85,85 y 68 kDa, respectivamente, evidenciándose concomitantemente una marcada inhibición de la capacidad infectante de los parásitos. La reincubación de los parásitos en medio de cultivo conteniendo suero fetal bovino permitió la recuperación de la capacidad de penetrar células de mamífero, detectándose paralelamente una recuperación de las glicoproteínas de superficie. El tratamiento de los tripomastigotes tripsinizados con cicloheximida inhibe la recuperación de las proteínas de superficie y de la capacidad infectante (132). Estos resultados confirman la importancia de las glicoproteínas de superficie en la interacción parásito-célula huésped, aunque se necesitan más evidencias para determinar el rol específico de cada una de estas proteínas de superficie en los procesos de adhesión e infección.

Recientemente, se estudió el rol de los residuos de manosa presentes en las membranas celulares de T. cruzi y de la célula huésped con respecto al proceso infectante. El tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa de los parásitos trajo como consecuencia la remoción de los residuos de manosa presentes en la superficie y produjo un aumento notorio de la habi-

lidad de los parásitos para asociarse tanto con mioblastos de corazón de rata como con macrófagos de ratón, sugiriendo que los residuos de manosa presentes en la superficie del T. cruzi modularían la asociación de los parásitos a las células de mamífero (193).

El estudio de la acción de ciertos inhibidores de la biosíntesis de macromoléculas, tales como la actinomicina D, puromicina y tunicamicina, de proteasas, de inhibidores de proteasas y combinaciones de inhibidores sobre la adhesión e infección, permitió determinar que la mayoría de estos tratamientos tuvieron efectos inhibidores o estimulantes sobre estos procesos. La puromicina y la cicloheximida bloquean tanto la adhesión como la penetración de los parásitos, mientras que la actinomicina D y la tunicamicina bloquean la interiorización de los tripomastigotes. El efecto de la tunicamicina sugiere que habría una/s glicoproteína/s, con uniones N-glicosídicas entre los oligosacáridos, presente en la superficie celular del parásito e involucrada en el proceso de penetración de T. cruzi (181).

Según Piras y col. (191), la/s glicoproteína/s sensible a tunicamicina se expresa principalmente en presencia de los factores del complemento presentes en el suero, y habría otros componentes del suero, entre ellos varias sialoglico-proteínas, que estimularían también la interiorización del parásito.

En base a estos resultados, Piras y col. (181) postulan que los siguientes procesos tendrían lugar en el tripomastigotes de T. cruzi:

- 1) la translación de un RNA pre-existente con la información necesaria para la adhesión y 2) la transcripción de RNA y la biosíntesis de la/s glicoproteína/s involucradas en la penetración, y sugieren que la capacidad de adhesión estaría presente en el tripomastigote recién libera-

do.

La inhibición irreversible de la síntesis proteica por pactamicina de las formas sanguíneas del parásito, produjo una inhibición de la infección de distintas células de mamífero, lo que corrobora el requerimiento de síntesis proteica para posibilitar la invasión celular por T. cruzi (194).

El tratamiento con lectinas no es lo suficientemente selectivo como para indentificar a los receptores involucrados en estos fenómenos. En consecuencia, se estudió el efecto de distintos monosacáridos comúnmente presentes en la superficie celular, sobre la infección de células de vertebrado por Trypanosoma cruzi. Solamente la N-acetil-D-glucosamina presentó un efecto inhibitorio de la adhesión y penetración de tripomastigotes de las cepas Ernestina e Y de T. cruzi, que fue de aproximadamente un 90% y un 70% respectivamente (195,196). La preincubación de las células huésped con el monosacárido mencionado, no produjo inhibición de la infección por el parásito (195), implicando que los tripomastigotes de T. cruzi se adhieren a receptores que contienen N-acetil-D-glucosamina presentes en la superficie de la célula huésped a través de una lectina del tipo de la aglutinina de germen de trigo. En base a estos resultados se sugirió la existencia de una posible correlación entre la glicoproteína Tc-85 y la inhibición de la infección de células de vertebrado por efecto de la N-acetil-D-glucosamina (197).

#### 1.7.2 Interacción entre T. cruzi y células fagocíticas

Impresionado por la facilidad con que el parásito se multiplicaba dentro de los macrófagos, Díaz (201) excluyó inicialmente la posibilidad de que los macrófagos ejercieran un papel defensivo contra T. cruzi.

Sin embargo, posteriormente se demostró que las formas de cultivo del parásito, eran rápidamente destruídas (87). Posteriormente, se ha demostrado que los parásitos opsonizados son más fácilmente ingeridos por los macrófagos, y que al menos para varias cepas de T. cruzi, los tripomastigotes son destruídos por los macrófagos.

Según algunos autores, la penetración del tripomastigote de T. cruzi en el macrófago no es sólo un proceso activo por parte del parásito, sino que el macrófago interviene fagocitando activamente al parásito (185,202). Los estudios realizados por Dvorak y Schmuñis utilizando microscopía de contraste de fase, sugieren que los tripomastigotes penetran activamente, encontrándose libres en el citoplasma del macrófago, y que eventualmente son destruídos por la célula que es incapaz de sobrevivir a la infección por esta forma de parásito (203); según otros autores, la supervivencia o no del macrófago depende de la relación cuantitativa parásitos:macrófago (202).

Una análisis de la interacción de tripomastigotes sanguíneos, derivados de cultivo de tejidos y derivados de cultivos axénicos, con macrófagos de ratón, permitió determinar que la incorporación fue alta para los tripomastigotes derivados de cultivo de tejidos, intermedia para tripomastigotes derivados de cultivo axénico y baja para tripomastigotes sanguíneos (184). Asimismo, un mayor número de macrófagos se infectó con parásitos de la cepa Y que de la cepa CL, para los tres tipos de tripomastigotes, lo que sugiere que la habilidad de los parásitos para infectar macrófagos es una característica básica de cada cepa del parásito (189).

Es posible también disociar las fases de adhesión e interiorización de T. cruzi en macrófagos (185).

La tripsinización de los tripomastigotes sanguíneos estimula significativamente su interiorización en macrófagos (128) y este efecto ha sido interpretado como debido a la remoción de una glicoproteína de superficie de P.M. 90.000, que actuaría como factor antifagocítico.

Se ha sugerido que el proceso de capping actuaría impidiendo la ingestión de tripomastigotes opsonizados por el macrófago, ya que la fagocitosis mediada por anticuerpos requeriría la presencia de anticuerpos distribuidos homogéneamente en toda la superficie del parásito (45). Es interesante notar que los tripomastigotes opsonizados de la cepa CL de T. cruzi no forman casquete polar (cap) fácilmente (114) y son destruidos por los macrófagos (204) mientras que los de la cepa Y forman "cap" fácilmente y sobreviven dentro de los macrófagos. Se necesitan más estudios para determinar si existe o no una relación entre la habilidad que presenta T. cruzi para movilizar lateralmente los componentes de membrana y su habilidad para sobrevivir dentro de los macrófagos.

Es poco probable que los mecanismos de interacción entre tripomastigotes y macrófagos sean idénticos a los que tienen lugar entre tripomastigotes y células no fagocíticas.



## 1.8 Objetivos

El objetivo del presente trabajo de Tesis es el estudio in vitro, según un novedoso enfoque, de la interacción entre Trypanosoma cruzi y la célula huésped no fagocítica del mamífero, utilizando poblaciones genéticamente homogéneas de parásitos (clones) provenientes de dos pacientes chagásicos crónicos de la República Argentina, con la finalidad de:

1. Investigar comparativamente la capacidad infectante de distintas subpoblaciones de T. cruzi, con el objeto de dilucidar si las variaciones de infectividad descritas para las cepas del parásito pueden atribuirse a la existencia de heterogeneidad en la población con respecto a este parámetro biológico.
2. Investigar el efecto del monosacárido N-acetil-D-glucosamina sobre la interacción del estadio tripomastigote de distintos clones de T. cruzi en células de mamífero, con la finalidad de determinar si el efecto inhibitorio de este monosacárido puede ser generalizado, o si por el contrario, la falta de inhibición total de la infectividad descrita para las cepas de T. cruzi estudiadas, podría atribuirse a la existencia de heterogeneidad en el/los receptor/es involucrado/s en el proceso de infección de la célula huésped no fagocítica.
3. Investigar el efecto sobre la interiorización del tripomastigote en la célula huésped, de otros monosacáridos comúnmente presentes en la superficie celular, a saber, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, arabinosa, xilosa, ribosa y N-acetil-D-galactosamina.

4. En este trabajo se exponen, además, los resultados obtenidos a partir del análisis cuantitativo del efecto de tres anticuerpos monoclonales, obtenidos contra la fracción flagelar del Trypanosoma cruzi, sobre la capacidad de penetración del parásito en células de mamífero.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

## 2.1 Origen de las cepas y clones de T. cruzi

En este trabajo se utilizaron las cepas Ernestina (203) e Y (154) de Trypanosoma cruzi. La cepa Ernestina fue aislada en el año 1964 en Bahía, Brasil, a partir de una paciente con enfermedad de Chagas agudo a quien se le aplicó un xenodiagnóstico. La cepa Ernestina se sometió a un único pasaje en cultivo de células de amnios humano, seguido por 6 pasajes en medio de cultivo bifásico ágar-sangre. Posteriormente, la cepa fue mantenida paralelamente en cultivo axénico y en cultivo de células de músculo esquelético y piel de feto bovino (BESM) en forma ininterrumpida hasta el presente. Recientemente, el medio de cultivo bifásico se reemplazó por medio de cultivo LIT (205).

La cepa Y de T. cruzi fue aislada por Silva y Nussenzweig en el año 1953 (154) y mantenida en ratón por pasajes seriados cada 7 días. La cepa Y utilizada en este estudio procede del laboratorio del Dr. W. Gutteridge, en donde se mantuvo hasta el año 1978. A partir de esa fecha se mantuvo en el Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas Dr. Mario Fatala Chabén, por pasajes semanales en medio de cultivo bifásico ágar-sangre.

A partir de 1984 se mantuvo paralelamente en medio axénico y en cultivo de células BESM (ver 2.4).

Los clones de Trypanosoma cruzi provienen de dos orígenes distintos. Los clones CA-I provienen de una cepa de T. cruzi aislada a partir del xenodiagnóstico aplicado a un paciente de 45 años de edad, afectado por una miocarditis chagásica crónica, oriundo de la provincia de San Luis (206). La cepa CA-I se mantuvo inicialmente por inoculación intraperitoneal en ratones de la cepa Rockland durante un lapso de 5 años. Luego se inoculó en un perro al cual se le efectuó posteriormente un xenodiag-

nóstico. Las 10 ninfas del tercer estadio de Triatoma infestans utilizadas para el xenodiagnóstico fueron sacrificadas entre los 30-45 días post-infección y se clonaron los parásitos contenidos en el tubo digestivo de los insectos.

Los clones Miranda se originaron por expansión de los parásitos clonados a partir de insectos utilizados en el xenodiagnóstico aplicado a un paciente de 26 años de edad, en Chagas crónico asintomático, residente en la provincia de Santiago del Estero (82).

Los clones se obtuvieron por el aislamiento de células individuales, mediante la adaptación de una técnica de micromanipulación (207). Los insectos utilizados en el xenodiagnóstico se esterilizaron por inmersión en solución de White (208) durante 30 minutos.

Se disecó luego el tubo digestivo de cada insecto, el cual fue seccionado en una placa de Petri de 3.5 cm de diámetro, conteniendo 2 ml de medio de cultivo LIT (205), cuya composición química se detalla en la Tabla 2, con el agregado de 10% (V/V) de suero fetal bovino inactivado por calor, 0,05% de Hemina, 200 U/ml de Penicilina y 200 µg/ml de Estreptomina, liberándose el contenido intestinal al medio. El medio se centrifugó a 100 g durante 10 minutos en tubos cónicos de centrífuga estériles, con tapa a rosca, con el objeto de eliminar los restos de tejido presentes y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 1500 g durante 10 minutos, con el objeto de concentrar los parásitos. El pellet se resuspendió en medio LIT a una concentración final de  $1-2 \times 10^4$  parásitos/ml. La operación de clonado se realizó en una cápsula de Petri plástica con una perforación circular de 20 mm de diámetro, cubierta por un cubreobjetos circular de 25 mm de diámetro fijado a la placa de Petri, e impermeabilizado por una cobertura interna de teflón, a excepción de 5 áreas de 1 mm de diámetro equidistantes entre sí (43). Las cápsulas de

Petri se esterilizaron por luz U.V. previamente a su uso.

Sobre cada una de las 5 áreas translúcidas se colocó una gota de la suspensión de parásitos con una microjeringa Hamilton, cubriéndose la placa de Petri y observándose las gotas en posición invertida al microscopio óptico. Las gotas conteniendo un solo parásito fueron aspiradas individualmente con jeringas de tuberculina de 1 ml conteniendo 0,1 ml de medio LIT y transferidas a tubos plásticos con tapa a rosca conteniendo 1 ml de ágar nutritivo (DIFCO) con 10% de sangre de conejo desfibrinada.

La jeringa se lavó dos veces consecutivas en 0,1 ml de medio LIT, transfiriéndose el lavado al tubo de cultivo para asegurar el pasaje del parásito.

Sólo se clonaron formas epimastigote. Los parásitos aislados se incubaron a 26°C, efectuándose controles mensuales durante un año para determinar la existencia de desarrollo y su evolución. Según este procedimiento se obtuvieron los siguientes clones, CA-I/59, 64, 65, 67, 69, 70, 71, 72 y 73 y Miranda/75, 76, 77, 78, 80, 81, 83, 84, 88 y 91, los que se expandieron en medio LIT y se mantuvieron posteriormente en el mismo medio de cultivo por pasajes seriados cada 21 días.

TABLA 2. COMPOSICION QUIMICA DEL MEDIO DE CULTIVO LIT (205)

|                     |          |
|---------------------|----------|
| Infusión de hígado  | 5 g /1   |
| Triptosa            | 5 g /1   |
| ClNa                | 4 g /1   |
| ClK                 | 0,4 g /1 |
| PO <sub>4</sub> HNa | 8 g /1   |
| Dextrosa            | 2 g /1   |

TABLA 3. COMPOSICION QUIMICA DE LA SOLUCION TRIPSINA-EDTA

|              |          |
|--------------|----------|
| Tripsina     | 2,5 g /l |
| EDTA         | 1 g /l   |
| PBS Dulbecco | 1 1      |

## COMPOSICION QUIMICA DEL PBS DULBECCO

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| ClNa                             | 8 g /l    |
| PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> | 0,46 g /l |
| PO <sub>4</sub> HK               | 0,2 g /l  |
| ClK                              | 0,2 g /l  |
| H <sub>2</sub> O destilada       | 1 1       |

## 2.2 Mantenimiento de los aislamientos y clones de T. cruzi en medio de cultivo LIT

Las cepas Ernestina e Y, así como también los clones CA-I/59, /69, /70, /71 y /72 y los clones Miranda/76, /80, /83 y /88 utilizados en este trabajo, se mantuvieron en estado de desarrollo exponencial, mediante pasajes seriados cada 7 días en tubos de cultivo estériles de vidrio, con tapa a rosca de baquelita, conteniendo 5 ml de medio de cultivo LIT. Los cultivos se iniciaron a una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  parásitos/ml y se incubaron a  $26^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$ .

## 2.3 Mantenimiento de los cultivos celulares

Se utilizaron cultivos celulares primarios de músculo esquelético y piel de feto bovino (BESM) (Flow Laboratories, Cat. N°0.1-304). Los

cultivos de células BESM se mantuvieron en frascos plásticos estériles de 75 cm<sup>2</sup> de superficie, conteniendo 10 ml de medio RPMI-1640 (209), suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado a 56°C durante 30 minutos, y se incubaron a 37°C en una atmósfera conteniendo 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Los cultivos confluentes se desprendieron mediante dos lavados sucesivos con una solución de tripsina-EDTA (ácido etilen-diamino tetracético) sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>, cuya composición química se detalla en la tabla 3, extrayéndose inmediatamente la solución. Las células desprendidas se resuspendieron en medio de cultivo, efectuándose una dilución 1:10 (V/V) y el volumen se fraccionó en frascos de cultivo estériles de 75 cm<sup>2</sup> que fueron mantenidos en las mismas condiciones anteriormente descritas.

#### 2.4 Infección de los cultivos celulares con parásitos provenientes de cultivo axénico y posterior mantenimiento de los parásitos en cultivos celulares

Para infectar cultivos celulares parcialmente confluentes se utilizaron parásitos provenientes de cultivo en medio LIT, utilizándose un inóculo inicial de 10<sup>8</sup> parásitos. Los cultivos de células BESM se incubaron a 37°C durante 24 horas y posteriormente se efectuaron dos lavados del cultivo celular con medio RPMI-1640 para eliminar el exceso de parásitos contenido en el sobrenadante. Los cultivos infectados se incubaron en las mismas condiciones que los cultivos celulares no infectados, efectuándose un cambio diario del medio de cultivo y un control diario bajo microscopio invertido de contraste de fase, con el fin de observar la evolución de las células infectadas. Una vez completado el ciclo intracelular de los parásitos, los tripomastigotes liberados al medio de cultivo se



utilizaron para infectar cultivos vírgenes de células BESM. A tal efecto se utilizaron inóculos de aproximadamente  $1 \times 10^6$  tripomastigotes por frasco de cultivo de  $75 \text{ cm}^2$  de superficie. Transcurrido un lapso de 6 horas, los parásitos se eliminaron por lavado de los frascos de cultivo con medio RPMI-1640 con 5% de suero fetal bovino y se incubaron en las mismas condiciones anteriormente descritas, efectuándose diariamente un cambio del medio de cultivo. Se mantuvieron de esta manera a las cepas y clones por pasajes seriados, espaciados entre sí según la duración del ciclo intracelular total respectivo.

## 2.5 Técnica de congelación

Tanto las células BESM como los parásitos utilizados se criopreservaron en Nitrógeno líquido.

### 2.5.1 Criopreservación de los cultivos celulares

Se seleccionaron cultivos confluentes de células BESM en los dos primeros pasajes, los cuales se tripsinaron según se describió anteriormente (ver 2.3), resuspendiéndose a las células en medio RPMI-1640 con el agregado de 10% de suero fetal bovino inactivado. Las células se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y resuspendieron en el mismo medio de cultivo con el agregado de 7,5% (V/V) de dimetil sulfoxido, a una concentración final de  $1-2 \times 10^6$  células/ml. La suspensión de células se fraccionó en viales de polipropileno (Internat. Med. Nunc, Dinamarca), a razón de 0,5 ml por vial. La operación se efectuó en baño de hielo. La congelación se realizó en un recipiente de Telgopor, en congeladora de  $-70^\circ\text{C}$  durante 24 horas, a fin de disminuir la temperatura a razón de aproximadamente  $1^\circ\text{C}/\text{minuto}$ , y posteriormente los viales se introdujeron

directamente en nitrógeno líquido para su conservación, descongelándose de acuerdo a las necesidades de uso.

#### 2.5.2 Criopreservación de epimastigotes de cultivo

Las cepas y clones de T. cruzi se criopreservaron en fase de crecimiento exponencial. Los parásitos se lavaron con medio LIT, centrifugaron y resuspendieron finalmente en medio de cultivo LIT con 7,5% (V/V) de dimetil sulfóxido a una concentración final de  $2$  a  $5 \times 10^6$  parásitos/ml. La suspensión de parásitos se fraccionó a razón de 0,5 ml por vial y se congeló según el procedimiento descrito para las células de mamífero. Posteriormente, se retiró una muestra para determinar la viabilidad de los parásitos en medio de cultivo LIT.

#### 2.5.3 Criopreservación de Tripomastigotes derivados de cultivo de tejidos

Se criopreservaron tripomastigotes de las cepas Ernestina e Y de T. cruzi y de todos los clones del parásito utilizados, mediante la utilización de la misma técnica anteriormente descrita (ver 2.5.2), con la excepción de que los parásitos se resuspendieron en medio RPMI-1640 con el agregado de 10% (V/V) de suero fetal bovino inactivado y 7,5% (V/V) de dimetil sulfóxido. Se controló la viabilidad de los tripomastigotes descongelando muestras e infectando cultivos de células BESM, en las cuales se desarrolló el ciclo intracelular completo del parásito.

#### 2.6 Metodología experimental para el análisis de la infectividad de clones de T. cruzi

Se expusieron células BESM a la infección por tripomastigotes derivados

de cultivo de tejidos de los clones CA-I/71 y /72 y Miranda/76 y /80 en las condiciones que se detallan a continuación.

#### 2.6.1 Cultivo de las células de vertebrado

Se utilizaron células BESM mantenidas rutinariamente según la metodología descrita en 2.3. Previamente a su uso para el ensayo experimental, las células se dispersaron con solución de Tripsina-EDTA y se re-suspendieron en medio RPMI-1640 con 5% de suero fetal bovino inactivado a 56°C durante 30 minutos, diluyéndose a una concentración final de  $2 \times 10^4$  células/ml. El recuento celular se efectuó en cámara de Neubauer.

Se tomaron alícuotas de 2 ml de la suspensión celular, perfectamente homogeneizada por agitación mecánica, que se colocaron estérilmente en placas de Petri de plástico de 35 mm de diámetro, conteniendo tres cubreobjetos cuadrados de 12 mm de lado, perfectamente limpios y estériles. Los cubreobjetos se manipularon con pinzas de relojero estériles de punta curva y fina. Las placas de Petri se incubaron a 37°C, en atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub>: 95% de aire durante 24 horas.

Para los ensayos experimentales se utilizaron sólo los cubreobjetos con células perfectamente separadas entre sí por una distancia de al menos un diámetro celular.

#### 2.6.2 Preparación de los parásitos

En esta serie de ensayos experimentales se utilizaron tripomastigotes derivados de cultivo de tejidos de los clones CA-I/71, y /72 y Miranda/76 y /80 de T. cruzi. Se infectaron cultivos semiconfluentes de células BESM en frascos de 75 cm<sup>2</sup> de superficie, con aproximadamente  $1 \times 10^6$  tripomastigotes, durante 6 horas. Diariamente se efectuó un cambio de medio de

cultivo, con el objeto de eliminar los restos celulares y las formas epimastigote y amastigote del sobrenadante de los cultivos. Solamente se utilizaron las formas tripomastigote resultantes del primer ciclo intracelular de los cuatro clones de T. cruzi. Como los ciclos intracelulares de los clones de T. cruzi utilizados no tienen igual duración (Engel, Doyle y Dvorak, comunicación personal) (44), se infectó a los cultivos celulares a distintos tiempos de acuerdo a la duración del ciclo intracelular de cada uno de los clones, que fue de 4,5 días para los clones CA-I/71 y /72, de 6 días para el clon Miranda/76 y de 9 días para el clon Miranda/80. Todos los cultivos se lavaron con medio RPMI-1640, con 5% (V/V) de suero fetal bovino, 24 horas antes de la recolección del sobrenadante conteniendo los parásitos. La contaminación con formas amastigote, epimastigote e intermedias nunca superó al 5%.

El sobrenadante conteniendo a los tripomastigotes se centrifugó a 300 g durante 10 minutos, con el objeto de eliminar restos celulares y el sobrenadante se centrifugó nuevamente 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. Se tomaron alícuotas de las suspensiones de cada uno de los clones, las que fueron diluídas a razón de 1/40 a 1/4000 según la concentración de parásitos en la suspensión, en un volumen final de 20 ml de una solución de electrolitos (Coulter Isoton II) (Tabla 4). El número de parásitos en cada una de las muestras se determinó en un contador electrónico de partículas (Coulter Counter, modelo B o ZBI, Coulter Electronics Inc., HIALEAH, Florida). Las diluciones de las muestras se realizaron con el propósito de ajustar el número de células entre  $5 \times 10^3$  y  $4 \times 10^4$  parásitos/ml y minimizar así el error de conteo del aparato. Cada muestra fue analizada por triplicado, promediándose los resultados obtenidos. Finalmente, se procedió a diluir las

suspensiones de tripomastigotes a una concentración final de  $2 \times 10^6$  parásitos/ml para cada uno de los clones estudiados.

TABLA 4. COMPOSICION QUIMICA DE LA SOLUCION COULTER-ISOTON II

|                 |          |
|-----------------|----------|
| Cl Na           | 7,93 g/l |
| EDTA (disódico) | 0,38 g/l |
| ClK             | 0,40 g/l |
| $PO_4 H_2 Na$   | 0,19 g/l |
| $PO_4 HNa_2$    | 1,95 g/l |
| FNa             | 0,30 g/l |

### 2.6.3 Infección de las células de vertebrado

Los cubreobjetos con las células adheridas se retiraron de la placa de Petri, secándose las aristas con papel de filtro, con el objeto de minimizar el error introducido por dilución en la suspensión parasitaria, y se colocaron estérilmente en placas de Petri secas de 35 mm de diámetro debidamente rotuladas. Inmediatamente se expuso a las células a alícuotas de 2 ml de las suspensiones de parásitos, incubándose los cultivos a 37°C en las mismas condiciones de atmósfera y humedad descritas (ver 2.6.1), durante 2 horas y media. Transcurrido ese lapso, los cubreobjetos se extrajeron con pinza de relojero y se enjuagaron mediante 10 inmersiones sucesivas en 3 vasos de precipitados de 25 ml de capacidad, conteniendo 20 ml de solución PBS, con el objeto de eliminar los parásitos no adheridos.

Los cubreobjetos se colocaron en placas de Petri secas de 35 mm de diámetro y se cubrieron inmediatamente con 2 ml de una solución de glutaraldehído en PBS al 3% (V/V) (Merck), fijándose las células durante 12 horas a 4°C. Los cubreobjetos se montaron luego en forma invertida con glicerina (Mallinkrodt) sobre portaobjetos de vidrio limpios, desengrasados y rotulados, sellándose los bordes.

Previamente a la observación de los preparados se procedió a cubrir los rótulos de los portaobjetos numerándoselos al azar, a fin de efectuar la lectura de los mismos a ciegas y minimizar el error introducido por el operador.

Los preparados se observaron por microscopía de contraste de fase en un microscopio Zeiss, Modelo 47-3012-9902 (C. Zeiss, West Germany), a un aumento de 400 X.

Se realizaron entre 4 y 5 ensayos experimentales independientes para todos los clones de T. cruzi estudiados y en cada uno de ellos se efectuaron preparados por triplicado o cuadruplicado correspondientes a cada clon. En cada uno de estos preparados se determinó el número de parásitos intracelulares/100 células BESM. Los resultados obtenidos se expresan como índices de penetración, los cuales se obtienen por la normalización de la media del número de parásitos intracelulares por célula según el modelo: Índice de penetración (IP) es igual a E/C, siendo E, la media del número de parásitos intracelulares por célula considerada independientemente para cada uno de los clones de T. cruzi estudiados, y C, la media del número de parásitos intracelulares por célula para el clon Miranda/76 del correspondiente ensayo experimental, ya que dicho clon fue utilizado como un estándar interno en todas las series de ensayos realizados.

O sea:

$$\text{Indice de penetración (IP)} = \frac{E \text{ (experimento)}}{C \text{ (control)}}$$

Siendo: E, la media del N° de parásitos intracelulares/célula ( $\bar{X}$ ) considerada independientemente para cada uno de los clones de T. cruzi estudiados, en un experimento dado.

y C, la media del N° de parásitos intracelulares/célula ( $\bar{X}$ ) del clon Miranda/76 en el correspondiente experimento.

Los datos obtenidos fueron utilizados para alimentar una computadora Tektronix, modelo 4051 (Tektronix Inc., Beaverton, Oregon), especialmente programada para calcular la media del número de parásitos intracelulares/célula, la desviación estandard y el error estandard. Los resultados experimentales obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el test "t" de Student (210), determinándose los niveles de significación. Las diferencias entre datos observados para niveles de confianza superiores o iguales al 95% se consideraron estadísticamente significativos.

## 2.7 Capacidad de penetración de tripomastigotes del clon CA-I/71 de T. cruzi: estudio del efecto de monosacáridos sobre la infectividad

Se expusieron células BESM a tripomastigotes derivados de cultivo de tejidos de la cepa Ernestina y del clon CA-I/71 de T. cruzi en presencia de monosacáridos, con el objeto de determinar el efecto de éstos sobre la capacidad infectante de los parásitos.

Se utilizaron los monosacáridos  $\alpha$ -D(+) glucosa, D(+) galactosa,  $\alpha$ -D(+) fucosa, D(+) manosa, D(-) arabinosa, D(+) xilosa, D(-) ribosa, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina. Todos los monosacáridos

utilizados se adquirieron en Sigma Chemical Co., siendo del mayor grado de pureza disponible.

#### 2.7.1 Preparación de los cultivos celulares

Los cubreobjetos con las células BESM adheridas (ver 2.6.1) se lavaron con medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) (216), suplementado con un 1% (W/V) de seroalbúmina bovina, Fracción V (BSA, Sigma Chem.Co., Cat. N°A 4503), durante 30 minutos a 37°C en las condiciones de cultivo habituales, a fin de eliminar el suero fetal bovino. El lavado se efectuó colocando a los cubreobjetos en placas de Petri secas de 35 mm de diámetro, previo secado del excedente de medio, los que fueron cubiertos con 2 ml de medio MEM con 1% de BSA.

#### 2.7.2 Preparación de los parásitos

Se utilizaron tripomastigotes de la cepa Ernestina y del clon CA-I/71 producto del primer ciclo intracelular de los parásitos. El ciclo intracelular de la cepa Ernestina es de aproximadamente 7 días. El medio de cultivo se renovó diariamente. El sobrenadante de cultivo del clon CA-I/71 fue centrifugado inicialmente a 300 g durante 10 minutos, con el objeto de eliminar restos celulares, y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 1500 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet formado por los parásitos se resuspendió en MEM con 1% de BSA, recentrifugándose a 1500 g durante el mismo lapso, con el objeto de eliminar los restos de suero. Este procedimiento se repitió nuevamente y el pellet resultante se resuspendió perfectamente en 20 ml del medio de cultivo antes mencionado, fraccionándose en 10 tubos plásticos cónicos con tapa a rosca a razón de 2 ml de suspensión en cada uno de ellos. Se extrajo una muestra de la suspensión



parasitaria que fue diluida en solución Coulter Isoton II y se determinó el número de parásitos en un contador Coulter-Counter, según se describió anteriormente (ver 2.6.2). La muestra se analizó por triplicado, promediándose los resultados obtenidos.

Los 10 tubos conteniendo la suspensión parasitaria, se centrifugaron nuevamente a 1500 g durante 10 minutos a 4°C y los pellets obtenidos se resuspendieron independientemente en los siguientes medios: MEM con el agregado de 1% de BSA y MEM con 1% de BSA y 20 mM de cada uno de los nueve monosacáridos anteriormente mencionados, en forma independiente (ver 2.7).

El sobrenadante de cultivo de la cepa Ernestina conteniendo los tripomastigotes, se sometió simultáneamente a la misma secuencia de lavados con medio MEM con 1% de BSA, detallada para los parásitos del clon CA-I/71, con la excepción de que finalmente la suspensión parasitaria se fraccionó equitativamente en dos tubos cónicos de 10 ml con tapa a rosca, determinándose también la concentración de tripomastigotes mediante la extracción de una muestra (ver 2.6.2). Ambos tubos se centrifugaron luego a 1500 g durante 10 minutos a 4°C y los pellets obtenidos se resuspendieron respectivamente en medio MEM con 1% de BSA y en el mismo medio con el agregado de 20 mM de N-acetil-D-glucosamina. La cepa Ernestina de T. cruzi se utilizó como control en todos los ensayos experimentales realizados. Finalmente, todas las suspensiones de tripomastigotes, tanto de la cepa Ernestina como del clon CA-I/71, se diluyeron a una concentración final de  $1 \times 10^6$  parásitos/ml.

### 2.7.3 Infección de las células de vertebrado

A continuación se retiraron los cultivos de células BESM de las

placas de Petri, escurriéndose cuidadosa y rápidamente el medio de cultivo y se colocaron en placas de Petri secas y estériles, exponiéndose inmediatamente a las suspensiones de parásitos durante 2 horas a 37°C en las mismas condiciones experimentales de atmósfera y humedad descritas. Transcurrido ese lapso, los cultivos se lavaron, fijaron y montaron sobre portaobjetos (ver 2.6.3).

Se realizaron 3 experimentos independientes para todos los monosacáridos estudiados, excepto para el monosacárido N-acetil-D-glucosamina, para el cual se efectuaron 6 experimentos independientes.

Los resultados se expresaron como índices de penetración (IP), con la salvedad de que en este caso E, es la media del número de parásitos intracelulares por célula en un cultivo tratado con uno de los monosacáridos y C, es la media del número de parásitos intracelulares por célula en el cultivo control correspondiente no tratado, o sea incubado en presencia de medio MEM con 1% de BSA.

O sea:

$$IP \text{ (índice de penetración)} = E/C$$

siendo E, la  $\bar{X}$  en un cultivo tratado con un monosacárido,

y C, la  $\bar{X}$  en el correspondiente control.

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el test "t" de Student (210), considerándose estadísticamente significativas las diferencias para niveles de confianza superiores o iguales al 95%.

## 2.8. Capacidad de penetración de tripomastigotes de distintos clones de T. cruzi: estudio del efecto del monosacárido N-acetil-D-glucosamina

Se estudió el efecto de una concentración 20 mM de N-acetil-D-glucosamina sobre la infectividad de varios clones de T. cruzi según la meto-

dología que se detalla a continuación.

#### 2.8.1 Preparación de los cultivos celulares

Los cultivos de células BESM se realizaron de acuerdo a la metodología descrita para el estudio de la capacidad de penetración de los tripomastigotes del clon CA-I/71 detallada anteriormente (ver 2.7.1) con la excepción de que se incubaron en solución salina balanceada de Hanks (Tabla 5) con 1% de BSA durante 30 minutos, previamente a su uso.

#### 2.8.2. Preparación de los parásitos

Se utilizaron tripomastigotes derivados de cultivo de tejidos de los siguientes clones de T. cruzi: CA-I/59, /69, /70 y Miranda/80, /83 y /88 y tripomastigotes de la cepa Y de T. cruzi.

La duración de los ciclos intracelulares de cada uno de estos clones es distinta. El clon CA-I/59 presenta un ciclo intracelular en cultivo de células de vertebrado de aproximadamente 4,5 días, el clon CA-I/69 de aproximadamente 5 días, el clon CA-I/70 de aproximadamente 6 días, el clon Miranda/80 de 9 días (44), el clon Miranda/83 de aproximadamente 7 días y el clon Miranda/88 de aproximadamente 10 días (Engel, Doyle y Dvorak, comunicación personal).

Por lo tanto, los cultivos de los clones de T. cruzi se iniciaron a distintos tiempos, a fin de recolectar sólo los tripomastigotes producto del primer ciclo intracelular de los parásitos para cada ensayo experimental.

En todos los experimentos se utilizó la cepa Y de T. cruzi como control.

TABLA 5. COMPOSICION QUIMICA DE LA SOLUCION SALINA BALANCEADA DE  
HANKS (HBSS) (239)

---

Solución A

|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| NaCl                                  | 8 g   |
| KCl                                   | 0,4g  |
| MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O | 0,2g  |
| H <sub>2</sub> O destilada            | 40 ml |

Solución B

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| CaCl <sub>2</sub>          | 0,14 g |
| H <sub>2</sub> O destilada | 10 ml  |

Solución C

|  |        |
|--|--------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12 H <sub>2</sub> O | 0,15 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                        | 0,06 g |
| glucosa  | 1 g    |
| H <sub>2</sub> O destilada                             | 50 ml  |

Solución D

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| NaHCO <sub>3</sub>         | 0,14 g |
| H <sub>2</sub> O destilada | 10 ml  |

Solución final

- Mezclar soluciones A y B
  - 1 volumen solución (A+B) + 1 volumen solución C + 18 volúmenes de H<sub>2</sub>O destilada
  - Agregar 2,5 ml de solución D cada 100 ml de HBSS
-

El sobrenadante de cada uno de los cultivos conteniendo los tripomastigotes se recolectó independientemente en tubos de centrifuga cónicos de 10 ml de capacidad, centrifugándose inicialmente a 300 g durante 10 minutos. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 1500 g durante 10 minutos a 4°C y el pellet se resuspendió en 10 ml de Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS) (tabla 5) (211), con el agregado de 1% (w/v) de BSA, realizándose posteriormente un segundo lavado con la misma solución. A continuación, se extrajo una muestra de la suspensión parasitaria perfectamente homogeneizada, efectuándose el recuento de los parásitos en cámara de Neubauer, por triplicado para cada uno de los clones estudiados. Los resultados obtenidos se promediaron.

Se procedió luego a fraccionar los 10 ml de suspensión parasitaria homogeneizada en 2 tubos cónicos de centrifuga de 10 ml de capacidad, a razón de 5 ml de suspensión en cada uno de ellos, los que se centrifugaron finalmente a 1500 g durante 10 min a 40°C. Los pellets resultantes se resuspendieron respectivamente en HBSS con el agregado de 1% de BSA y en el mismo medio más el agregado de 20 mM de N-acetil-D-glucosamina, adecuándose el volumen final con el objeto de obtener una concentración final de  $2 \times 10^6$  parásitos/ml para cada uno de los clones y la cepa Y de T. cruzi.

### 2.8.3 Infección de las células de vertebrado

Los cultivos de células BESM sobre cubreobjetos se retiraron de la solución HBSS con 1% de BSA, secándose las aristas sobre papel de filtro. A continuación se colocaron en placas de Petri secas de 35 mm

de diámetro, y se expusieron inmediatamente a alícuotas de 2 ml de las suspensiones parasitarias, incubándose a posteriori por un lapso de 2 horas en las condiciones habituales de temperatura y humedad. Transcurrido ese lapso se lavaron, fijaron y montaron sobre portaobjetos según se detallara anteriormente (ver 2.6.3).

Se realizaron entre 2 y 3 experimentos independientes para todos los clones estudiados y la cepa Y de T. cruzi.

Los preparados se observaron bajo microscopía de contraste de fase (ver 2.6.3), determinándose la media aritmética del número de parásitos intracelulares por célula, para 100 células en cada uno de los triplicados realizados en cada ensayo experimental.

Los resultados se expresaron nuevamente como índices de penetración según el modelo E/C, siendo E, la media del número de parásitos intracelulares por célula obtenida incubando al sistema células huésped-parásitos en presencia de N-acetil-glucosamina, y C, la media del número de parásitos intracelulares por célula obtenida para el respectivo cultivo control. Por ejemplo,

$$IP \text{ (índice de penetración)} = E/C \cdot \frac{\bar{X}(\text{CA-I/59}) \text{ (con HBSS + 20 mM N-AcGlu)}}{\bar{X}(\text{CA-I/59}) \text{ (con HBSS)}}$$

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el test "t" de Student (ver 2.6.3).

## 2.9 Estudio del efecto de anticuerpos monoclonales sobre la infección de células de vertebrado por T. cruzi.

En esta serie de experimentos, se estudió el efecto de tres anticuerpos monoclonales, designados respectivamente con las nomenclaturas B<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> y MB<sub>5</sub>, sobre la capacidad infectante del estadio tripomastigote in vitro.

### 2.9.1. Origen de los anticuerpos monoclonales

La cepa de T. cruzi utilizada para la obtención de los anticuerpos monoclonales fue la cepa Tulahuen (212), la cual se mantiene por pasajes semanales. Para la obtención de los anticuerpos monoclonales, se utilizó la fracción subcelular (flagelar) (161) del estadio epimastigote (213). Los parásitos se cultivaron en medio bifásico completo (214) sin agitación, y se cosecharon en la fase de crecimiento logarítmico.

Para la inmunización se utilizaron ratones machos BALB/c de cincuenta días de edad, que fueron inyectados intraperitonealmente con 200 µg de fracción flagelar liofilizada con  $1,25 \times 10^9$  unidades de Bordetella pertusis como adjuvante (213). El esquema de inmunización consistió en 3 dosis intraperitoneales totales, efectuadas cada 7 días. La última inoculación (booster) se efectuó también intraperitonealmente y tres días más tarde los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y sumergidos inmediatamente en una solución desinfectante. Posteriormente, se hizo una incisión en el abdomen y se extrajo el bazo, que se colocó en una caja de Petri con 10 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (Gibco) (10,05 mg/ml), bicarbonato de sodio (2 mg/ml), glutamina (0,292 mg/ml), estreptomycin (0,1 mg/ml), penicilina (100 U/ml) y anfotericina B (0,002 mg/ml).

El bazo se colocó estérilmente en una grilla metálica y se disgregó con el émbolo de una jeringa plástica, recogiendo el material en una caja de Petri de 35 mm de diámetro conteniendo 1 ml de medio. La grilla se lavó con otros 2 ml de medio y los 3 ml finales de suspensión se transfirieron a un tubo cónico estéril de polipropileno, en el cual se colectaron los homogenados de entre 3-5 bazos. La suspensión se dejó decantar durante 2 minutos y transcurrido ese lapso se transfirió el sobrenadante a otro tubo de iguales características. Se centrifugó a 1000 rpm en una centrífuga Sorvall de mesa GLC-4 durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Por este procedimiento se obtuvo un rendimiento de  $5-10 \times 10^7$  células por bazo. Las células se resuspendieron en 5 ml de  $\text{ClNH}_4$  0,17 M frío, agitándose bien, y el tubo se sumergió en hielo durante 10 minutos, con el objeto de producir la lisis de los glóbulos rojos. Luego se agregaron 10 ml de medio Eagle suplementado con 20% (v/v) de suero fetal bovino inactivado a  $56^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Se centrifugó a 300 g durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en medio sin suero y se contaron en cámara de Neubauer. Se utilizaron las células requeridas para la fusión, congelándose el resto de la suspensión, en alícuotas de  $10^8$  células, en nitrógeno líquido.

Para la fusión se utilizaron las células de mieloma x 63 Ag 8.653, que es una línea de plasmacitoma de ratón. Las células de mieloma se cosecharon, centrifugaron y resuspendieron en medio sin suero a una concentración de  $10^8$  células. Posteriormente se mezclaron ambas suspensiones celulares. La relación de células esplénicas a células de mieloma fue 1:1. A continuación, las células se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , se removió el sobrenadante y se agregaron 0,7 ml de polietilenglicol (PEG) 4000 al 50% (p/v). Esta operación se realizó con el tubo sumergido en un baño de agua a  $37^\circ\text{C}$ , agregándose el PEG lentamente



durante 90 segundos. Se agregaron luego 10 ml de medio sin suero (RPMI-1640) durante 2 minutos y se centrifugó a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células sedimentadas se resuspendieron en medio HAT (173), conteniendo 13,61  $\mu\text{g/ml}$  de hipoxantina, 3,78  $\mu\text{g/ml}$  de timidina, 1,75  $\mu\text{g/ml}$  de aminopterina y 20% (v/v) de suero fetal bovino inactivado. La suspensión celular se distribuyó en multiplacas de 96 pocillos, a razón de 100  $\mu\text{l}$  (aproximadamente 50 células) por pocillo. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de aire y anhídrido carbónico al 5%. Cuando se evidenció crecimiento suficiente de los híbridos, se reemplazó el medio HAT por medio HT (sin aminopterina) durante 15 días. Finalmente, las células se mantuvieron en una mezcla al 50% (v/v) de medio RPMI-1640 con 20% de suero fetal bovino inactivado y el mismo medio pero condicionado.

El clonado de las células híbridas se realizó por dilución límite (215) y los clones se expandieron, congelándose posteriormente en nitrógeno líquido.

Para determinar la secreción de inmunoglobulinas, se realizó la prueba inmunoenzimática ELISA con la enzima peroxidasa y el antígeno homólogo (fracción flagelar solubilizada) (213).

Los anticuerpos monoclonales obtenidos se seleccionaron por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y por presentar inmunólisis mediada por complemento (ILMC).

Para los ensayos de penetración se utilizaron 4 anticuerpos monoclonales de la serie obtenida contra la fracción flagelar de T. cruzi, denominados respectivamente B<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> y MB<sub>5</sub>. Todos los anticuerpos presentan características de IgG<sub>1</sub>. Uno de ellos, el D<sub>4</sub>, reconoce antígenos de amastigotes y tripomastigotes y presenta actividad protectora en transferencia pasiva a ratones. El anticuerpo monoclonal B<sub>3</sub> reconoce a los

estadios amastigote y tripomastigote. El anticuerpo monoclonal MB<sub>5</sub>, reconoce a los estadios amastigote y tripomastigote de T. cruzi, presenta actividad lítica mediada por complemento y actividad protectora en ratones que son posteriormente desafiados. El anticuerpo monoclonar C<sub>4</sub> no presenta actividad contra el T. cruzi y fue utilizado como control, además del control efectuado con sobrenadante de mieloma.

Los híbridos se expandieron posteriormente in vivo, para lo cual se inocularon ratones BALB/c de 45 días con 0,5 ml de Pristane (2,6,10,14 tetrametil pentadecano, Sigma) por vía intraperitoneal. Transcurridas 2 semanas se inocularon 10<sup>6</sup> células híbridas/ratón por vía intraperitoneal. El fluido ascítico de los tumores formados se comenzó a recoger entre el 5° y el 9° día post-inoculación. Se obtuvieron entre 7-10 ml de fluido ascítico total/ratón, extraídos durante un lapso de 6 días, conteniendo aproximadamente 10 mg/ml de anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos monoclonales utilizados en este trabajo fueron desarrollados por Ada R. de Campanini y Jacqueline Bua.

### 2.9.2 Preparación de los cultivos celulares

Se utilizaron cultivos de células BSM sobre cubreobjetos de vidrio preparados según la metodología detallada anteriormente (ver 2.6.1).

### 2.9.3 Preparación de los parásitos

En esta serie de experimentos se utilizaron tripomastigotes derivados de cultivo de tejidos del clon CA-I/71 y de la cepa Y de T. cruzi. Los cultivos se iniciaron también a distintos tiempos a fin de recolectar simultáneamente los parásitos producto del primer ciclo intracelular pa-

ra cada experimento. Se realizó una primera centrifugación a 300 g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se recentrifugó a 1500 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en medio RPMI-1640 con 5% de suero fetal bovino inactivado, determinándose la concentración de parásitos de una muestra mediante recuento en cámara de Neubauer. La suspensión parasitaria se llevó a una concentración de  $5 \times 10^5$  tripomastigotes/ml y se fraccionó en 5 tubos cónicos con tapa a rosca, a razón de 1 ml de suspensión por tubo.

En forma paralela a la preparación de los parásitos, se descongelaron alícuotas de 0,10 ml de los fluidos ascíticos conteniendo los distintos anticuerpos monoclonales, así como también del medio sobrenadante de los cultivos de mieloma. Se efectuaron diluciones 1/10 de los fluidos ascíticos y del sobrenadante de mieloma en medio RPMI-1640 con 5% de suero fetal bovino inactivado. A continuación, se agregó independientemente 1 ml de cada una de las diluciones de los fluidos ascíticos conteniendo los anticuerpos monoclonales a cada uno de los tubos conteniendo la suspensión de parásitos, de modo tal que la concentración final obtenida fue de aproximadamente 0,5 mg/ml de anticuerpo monoclonal.

#### 2.9.4 Ensayo de infección de las células de vertebrado

Los cultivos de células BESM se colocaron en placas de Petri de 35 mm y se cubrieron inmediata e independientemente con 2 ml de cada una de las suspensiones parasitarias conteniendo los 4 anticuerpos monoclonales y el sobrenadante de células de mieloma. La incubación se efectuó a 37°C, en las habituales condiciones de humedad y tensión de CO<sub>2</sub>, durante un lapso de dos horas y media. Los cubreobjetos se lavaron, fijaron y montaron sobre portaobjetos (ver 2.6.3).

Se realizaron 3 experimentos independientes para el clon CA-I/71 y 2 para la cepa Y, y en cada uno de ellos las determinaciones se efectuaron por triplicado. Se determinó la media del número de parásitos intracelulares por célula ( $\bar{X}_i$ ) mediante la observación de 100 células en cada preparado (ver 2.6.3).

Los resultados se expresaron como índices de penetración (IP), obtenidos por la normalización de las medias del número de parásitos intracelulares por célula ( $\bar{X}$ ) obtenidas en presencia de cada uno de los anticuerpos monoclonales, con respecto a la media obtenida en presencia del sobrenadante de mieloma en cada experimento.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1 Infectividad de clones de T. cruzi

El estadio reproductivo de T. cruzi en el huésped mamífero se desarrolla intracelularmente. Esto implica que el parásito debe presentar la capacidad de penetrar activamente en la célula huésped no fagocítica para poder completar su ciclo evolutivo (40).

El objetivo de este estudio fue determinar si existen diferencias en las capacidades de penetración en la célula huésped, y por ende en las capacidades infectantes, de subpoblaciones de T. cruzi provenientes de un mismo aislamiento y de distintos aislamientos del parásito. La determinación de la existencia de diferencias en la infectividad de subpoblaciones provenientes de una misma cepa, que confirmaría la existencia de heterogeneidad dentro de un aislamiento de T. cruzi con respecto a este parámetro biológico (81), sólo es posible si se utilizan poblaciones genéticamente homogéneas (clones) de parásitos, obtenidas a partir de aislamientos unicelulares de organismos.

En este trabajo se presentan los resultados del análisis cuantitativo in vitro de la capacidad infectante de cuatro clones de Trypanosoma cruzi provenientes de dos orígenes distintos, los clones CA-I/71, CA-I/72 y los clones Miranda/76, Miranda/80.

#### 3.1.1 Análisis cuantitativo de la capacidad infectante de clones de T. cruzi

Los tripomastigotes de los cuatro clones de T. cruzi estudiados presentaron la capacidad de infectar células de músculo esquelético y piel de feto bovino in vitro. Como después de la invasión de las células de vertebrado, el tripomastigote se reorganiza a amastigote y permanece morfológicamente quiescente durante el período lag, todos los parásitos

intracelulares encontrados dos horas y media después de la exposición de las células de vertebrado a la población parasitaria son el resultado de la penetración.

La distribución de los parásitos en la población de células de vertebrado se vio adecuadamente definida por una distribución binomial negativa. En la Tabla 6 se detallan los resultados obtenidos a partir del recuento del número de parásitos intracelulares por célula, determinado en 100 células de vertebrado observadas en un preparado correspondiente al clon CA-I/71 y otro correspondiente al clon Miranda/80 respectivamente, con el objeto de ejemplificar cómo se obtuvieron los datos experimentales utilizados para calcular las medias aritméticas del número de parásitos intracelulares por célula.

En las tablas 7 y 8 se detallan los resultados de las medias aritméticas de los parásitos intracelulares obtenidas en cinco experimentos independientes realizados para los clones Miranda/76 y Miranda/80, respectivamente, y en las tablas 9 y 10 los resultados obtenidos en cuatro experimentos independientes realizados para los clones CA-I/71 y CA-I/72. En dichas tablas se detallan los valores de las medias aritméticas del número de parásitos intracelulares por célula ( $\bar{X}_i$ ) obtenidos en cada uno de los preparados realizados en los experimentos independientes, así como también las medias de los mismos ( $\bar{X}$ ), las desviaciones estándar (DS) y los errores estándar (ES).

El rango de variación de las  $\bar{X}_i$  correspondientes al clon Miranda/76 fue de 0,8 a 1,37 parásitos intracelulares por célula, determinado en 100 células para cada preparado. El rango de variación interexperimental de las  $\bar{X}$  se encontró comprendido entre 0,87 y 1,31 parásitos intracelulares por célula (tabla 7).

TABLA 6. NUMERO DE PARASITOS INTRACELULARES POR CELULA DETERMINADO EN UN PREPARADO DEL CLON CA-I/71 Y EN OTRO DEL CLON MIRANDA/80.

| Número de parásitos intracelulares/célula: | NUMERO DE CELULAS         |                         |
|--|---------------------------|-------------------------|
|  | CA-I/71                   | Miranda/80              |
| 0  | 14                        | 92                      |
| 1  | 19                        | 8                       |
| 2  | 15                        | 0                       |
| 3  | 8                         | 0                       |
| 4  | 11                        | 0                       |
| 5  | 5                         | 0                       |
| 6  | 6                         | 0                       |
| 7  | 5                         | 0                       |
| 8  | 4                         | 0                       |
| 9  | 2                         | 0                       |
| 10   | 3                         | 0                       |
| 11   | 2                         | 0                       |
| 12   | 3                         | 0                       |
| 13   | 1                         | 0                       |
| 14   | 0                         | 0                       |
| 15   | 1                         | 0                       |
| 16   | 0                         | 0                       |
| 17   | 1                         | 0                       |
| TOTAL                                      | 396 parásitos/100 células | 8 parásitos/100 células |

Media aritmética del clon CA-I/71 ( $\bar{X}_1$ ) = 3,96

Error Estandard del clon CA-I/71 (ES) = 0,378

Media aritmética del clon Miranda/80 ( $\bar{X}_2$ ) = 0,08

Error Estandard del clon Miranda/80 (ES) = 0,0027



TABLA 7. MEDIAS ARITMETICAS DEL NUMERO DE PARASITOS INTRACELULARES DEL CLON MIRANDA/76 OBTENIDAS EN 5 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

| Clon       | Experimento | Nº de preparado | $\bar{X}_i$ | $\bar{X}$<br>DS<br>ES |
|------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------------|
| Miranda/76 | 1           | 1.1             | 0,87        | 0,87                  |
|            |             | 1.2             | 0,92        | 0,045                 |
|            |             | 1.3             | 0,83        | 0,026                 |
|            | 2           | 2.1             | 1,23        | 1,31                  |
|            |             | 2.2             | 1,37        | 0,06                  |
|            |             | 2.3             | 1,31        | 0,03                  |
|            |             | 2.4             | 1,34        |                       |
|            | 3           | 3.1             | 1,03        | 1,04                  |
|            |             | 3.2             | 1,06        | 0,013                 |
|            |             | 3.3             | 1,04        | 0,006                 |
|            |             | 3.4             | 1,05        |                       |
|            | 4           | 4.1             | 1,04        | 1,03                  |
|            |             | 4.2             | 0,88        | 0,15                  |
|            |             | 4.3             | 1,18        | 0,086                 |
|            | 5           | 5.1             | 0,80        | 1,01                  |
|            |             | 5.2             | 1,11        | 0,20                  |
|            |             | 5.3             | 0,94        | 0,09                  |
|            |             | 5.4             | 1,32        |                       |
|            |             | 5.5             | 0,89        |                       |

Legendas:

$\bar{X}_i$  : Media del número de parásitos intracelulares/célula determinado en 100 células para cada preparado.

$\bar{X}$  : Media de  $\bar{X}_i$  obtenidos en cada experimento independiente.

DS : Desviación estándar.

ES : Error estándar.

TABLA 8. MEDIAS ARITMETICAS DEL NUMERO DE PARASITOS INTRACELULARES DEL CLON MIRANDA/80 OBTENIDAS EN 5 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

| Clon       | Experimento | N° de preparado | $\bar{X}_i$ | $\bar{X}$<br>DS<br>ES |
|------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------------|
| Miranda/80 | 1           | 1.1             | 0,08        | 0,076                 |
|            |             | 1.2             | 0,08        | 0,006                 |
|            |             | 1.3             | 0,07        | 0,004                 |
|            | 2           | 2.1             | 0,096       | 0,11                  |
|            |             | 2.2             | 0,107       | 0,012                 |
|            |             | 2.3             | 0,12        | 0,007                 |
|            | 3           | 3.1             | 0,06        | 0,0425                |
|            |             | 3.2             | 0,03        | 0,015                 |
|            |             | 3.3             | 0,05        | 0,007                 |
|            |             | 3.4             | 0,03        |                       |
|            | 4           | 4.1             | 0,05        | 0,05                  |
|            |             | 4.2             | 0,06        | 0,01                  |
|            |             | 4.3             | 0,04        | 0,006                 |
|            | 5           | 5.1             | 0,06        | 0,05                  |
|            |             | 5.2             | 0,05        | 0,006                 |
| 5.3        |             | 0,05            | 0,003       |                       |

Leyendas: Ver Tabla 7.

TABLA 9. MEDIAS ARITMETICAS DEL NUMERO DE PARASITOS INTRACELULARES DEL  
CLON CA-I/71 OBTENIDAS EN 4 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

| Clon    | Experimento | N°de preparado | $\bar{X}_i$ | $\bar{X}$<br>DS<br>ES |
|---------|-------------|----------------|-------------|-----------------------|
| CA-I/71 | 1           | 1.1            | 2,15        | 2,48                  |
|         |             | 1.2            | 2,84        | 0,35                  |
|         |             | 1.3            | 2,45        | 0,20                  |
|         | 2           | 2.1            | 7,05        | 6,81                  |
|         |             | 2.2            | 6,29        | 0,45                  |
|         |             | 2.3            | 7,09        | 0,26                  |
|         | 3           | 3.1            | 4,50        | 4,20                  |
|         |             | 3.2            | 4,34        | 0,32                  |
|         |             | 3.3            | 3,93        | 0,16                  |
|         | 4           | 4.1            | 3,33        | 3,6                   |
|         |             | 4.2            | 3,71        | 0,24                  |
|         |             | 4.3            | 3,79        | 0,14                  |

Leyendas: ver tabla 7.

TABLA 10. MEDIAS ARITMETICAS DEL NUMERO DE PARASITOS INTRACELULARES DEL  
CLON CA-I/72 OBTENIDAS EN 4 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

| Clon    | Experimento | N° de preparado | $\bar{X}_i$ | $\bar{X}$<br>DS<br>ES |
|---------|-------------|-----------------|-------------|-----------------------|
| CA-I/72 | 1           | 1.1             | 0,67        | 0,83                  |
|         |             | 1.2             | 1,08        | 0,18                  |
|         |             | 1.3             | 0,72        | 0,09                  |
|         |             | 1.4             | 0,84        |                       |
|         | 2           | 2.1             | 0,32        | 0,42                  |
|         |             | 2.2             | 0,55        | 0,12                  |
|         |             | 2.3             | 0,38        | 0,07                  |
|         | 3           | 3.1             | 0,45        | 0,38                  |
|         |             | 3.2             | 0,37        | 0,076                 |
|         |             | 3.3             | 0,32        | 0,04                  |
|         | 5           | 5.1             | 0,35        | 0,37                  |
|         |             | 5.2             | 0,39        | 0,02                  |
|         |             | 5.3             | 0,36        | 0,009                 |
|         |             | 5.4             | 0,38        |                       |

Leyendas: ver tabla 7.

El rango de variación de las  $\bar{X}_i$  correspondientes al clon Miranda/80 fue de 0,03 a 0,12 parásitos intracelulares por célula y el de las  $\bar{X}$  fue de 0,04 a 0,11 parásitos intracelulares por célula (tabla 8).

El rango de variación de las  $\bar{X}_i$  osciló entre 2,15 y 7,09 parásitos intracelulares por célula para el clon CA-I/71 y el rango de variación interexperimental fue de 2,48 a 6,81 parásitos intracelulares por célula (tabla 9).

Para el clon CA-I/72, los valores de  $\bar{X}_i$  obtenidos se encontraron comprendidos entre 0,32 y 1,08 y los valores interexperimentales de  $\bar{X}$  entre 0,37 y 0,83 parásitos intracelulares por célula (tabla 10).

En la tabla 11 se detallan las medias del número de parásitos intracelulares por célula obtenidas para cada uno de los clones de T. cruzi estudiados, con sus correspondientes errores standard, así como también los índices de penetración (IP) respectivos obtenidos para cada experimento independiente y el índice de penetración relativo total ( $\overline{IP}$ ) obtenido para cada uno de los clones de T. cruzi con respecto al clon Miranda/76, a cuyo índice de penetración se asignó arbitrariamente el valor de 1 (ver 2.6.3.).

Los datos obtenidos permiten demostrar la existencia de diferencias notables, estables y reproducibles en la capacidad infectante de los clones de Trypanosoma cruzi estudiados. Estas diferencias de infectividad se observaron tanto entre clones provenientes de distintos aislamientos como provenientes de un mismo aislamiento. Por ejemplo, a igual concentración de formas infectantes presentes en el inóculo, se pudo determinar que cada 100 parásitos del clon Miranda/76 interibridados en la célula huésped se encontraron intracelularmente sólo 6 parásitos del clon Miranda/80. Un hecho similar se observa para los clones CA-I/71 y CA-I/72 (tabla 11).

TABLA 11. ANALISIS COMPARATIVO DE LAS CAPACIDADES INFECTANTES DE CUATRO CLONES DE T. CRUZI EN CELULAS DE MAMIFERO.

| Clon       | Experimento | $\bar{X} \pm ES$ | $\bar{\bar{X}} \pm ES$ | IP   | IP x 100 | $\overline{IP}$ |
|------------|-------------|------------------|------------------------|------|----------|-----------------|
| CA-I/71    | 1           | 2,5 $\pm$ 0,20   |                        | 2,8  | 280      | 3,9             |
|            | 2           | 6,8 $\pm$ 0,26   | 4,39                   | 5,2  | 520      |                 |
|            | 3           | 4,2 $\pm$ 0,16   | 0,91                   | 4,0  | 400      |                 |
|            | 4           | 3,6 $\pm$ 0,14   |                        | 3,5  | 350      |                 |
| CA-I/72    | 1           | 0,8 $\pm$ 0,09   |                        | 0,9  | 90       | 0,5             |
|            | 2           | 0,42 $\pm$ 0,07  | 0,5 $\pm$              | 0,3  | 30       |                 |
|            | 3           | 0,38 $\pm$ 0,04  | 0,11                   | 0,4  | 40       |                 |
|            | 5           | 0,37 $\pm$ 0,02  |                        | 0,4  | 40       |                 |
| MIRANDA/76 | 1           | 0,87 $\pm$ 0,03  |                        | 1    | 100      | 1               |
|            | 2           | 1,31 $\pm$ 0,03  |                        | 1    | 100      |                 |
|            | 3           | 1,04 $\pm$ 0,006 | 1,05 $\pm$             | 1    | 100      |                 |
|            | 4           | 1,03 $\pm$ 0,09  | 0,071                  | 1    | 100      |                 |
|            | 5           | 1,01 $\pm$ 0,09  |                        | 1    | 100      |                 |
| MIRANDA/80 | 1           | 0,08 $\pm$ 0,004 |                        | 0,09 | 9        | 0,06            |
|            | 2           | 0,11 $\pm$ 0,007 |                        | 0,08 | 8        |                 |
|            | 3           | 0,04 $\pm$ 0,007 | 0,066 $\pm$            | 0,04 | 4        |                 |
|            | 4           | 0,05 $\pm$ 0,006 | 0,01                   | 0,05 | 5        |                 |
|            | 5           | 0,05 $\pm$ 0,003 |                        | 0,05 | 5        |                 |

Leyendas:

$\bar{X}$ : Media de los  $\bar{X}_i$  obtenidos en cada experimento

$\bar{\bar{X}}$ : Media de los  $\bar{X}$

ES: Error estandard

IP: Indice de penetraci3n

$\overline{IP}$ : Media de los indices de penetraci3n (IP) obtenidos en cada uno de los experimentos independientes

Asimismo, considerando los índices de penetración de los cuatro clones pudo demostrarse la existencia de marcadas diferencias en la infectividad de clones provenientes de distintos aislamientos. Los tripomastigotes del clon CA-I/71 fueron aproximadamente 70 veces más infectantes que los del clon Miranda/80. Los clones Miranda/76 y CA-I/72 presentaron capacidades infectantes intermedias entre ambos valores extremos (Figura 5).

La media del número de parásitos intracelulares/célula ( $\bar{X} + ES$ ) varió entre  $4,39 \pm 0,91$  para los tripomastigotes del clon CA-I/71 y  $0,066 \pm 0,01$  para los parásitos del clon Miranda/80 (tabla 11).

Durante el curso de este estudio, se observó también que aproximadamente el 95-98% de los tripomastigotes provenientes de cultivos de células BESM de los cuatro clones de T. cruzi presentaron la morfología característica del tripomastigote ancho (broad).

En los experimentos realizados con el clon CA-I/71, se observaron gran cantidad de parásitos adheridos externamente a las membranas de las células BESM, cuya morfología al microscopio de contraste de fase correspondió al estado amastigote del parásito. El número de parásitos adheridos externamente a la célula huésped osciló entre los 16-32 parásitos extracelulares/célula. Para el clon CA-I/72, el número de parásitos presentando la morfología de amastigotes adheridos externamente a la membrana de la célula huésped varió entre 1-3 parásitos extracelulares/célula, mientras que en los clones Miranda/76 y /80, los escasos parásitos adheridos presentaron la morfología característica del tripomastigote.

### 3.1.2 Discusión

El desarrollo de métodos cuantitativos para investigar la infección in vitro de las células de mamífero por Trypanosoma cruzi ha permitido

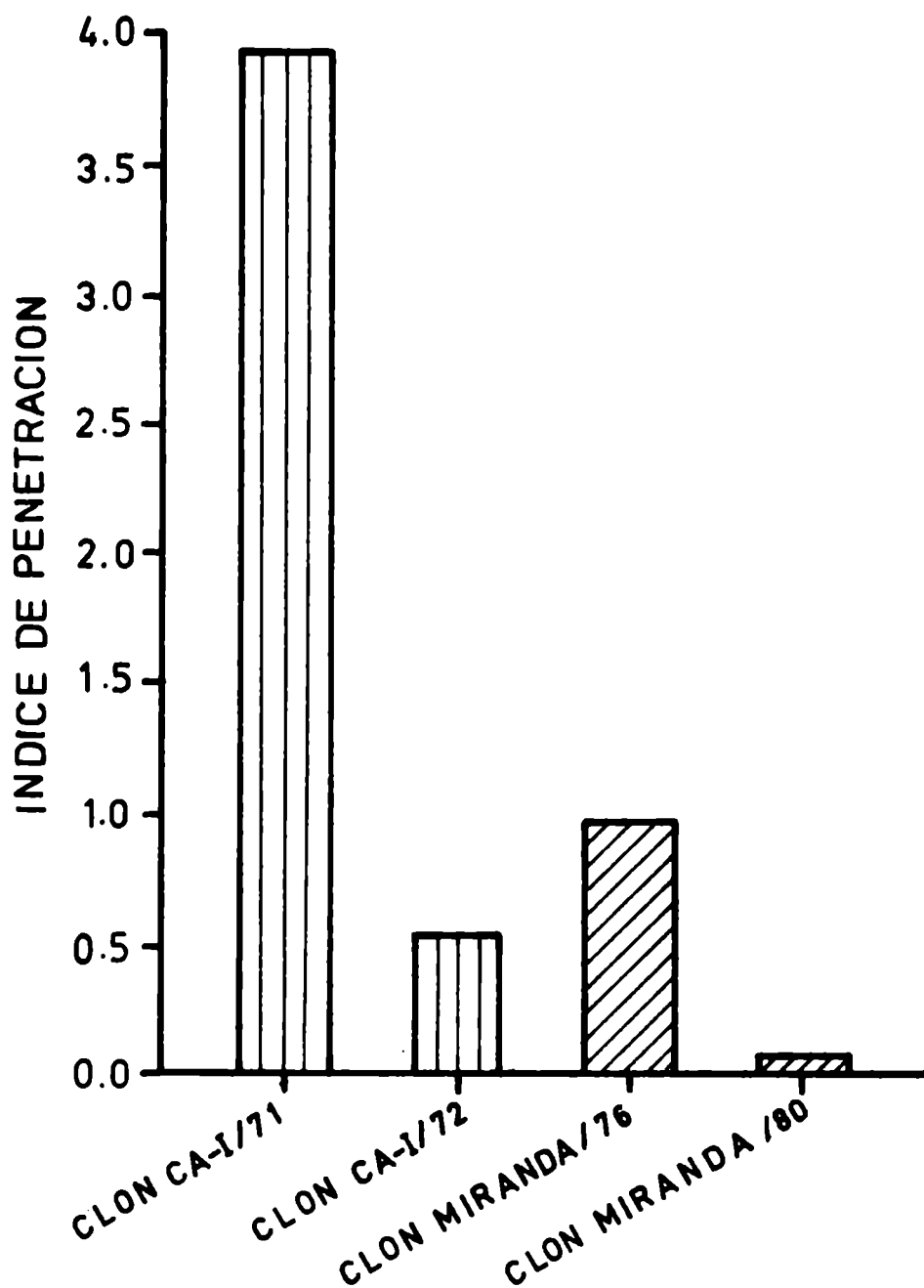


Figura 5. Histograma que muestra las capacidades infectantes de tripomastigotes de los clones CA-I/71, /72 y Miranda/76, /80 de *T. cruzi* en células BESM, las que se expresan como Índices de Penetración (ver 2.1.3) para los clones CA-I (rayas verticales) y los clones Miranda (rayas oblicuas). (ES = 0,01 - 0,12; siendo ES el error estándar del Índice de Penetración Medio).



el estudio de esta interacción fundamental para la supervivencia del parásito (39 , 42). La observación de que todos los parásitos intracelulares encontrados pocas horas después de la exposición de las células de vertebrado a la población parasitaria son únicamente el resultado de la penetración, implica que el número de parásitos intracelulares puede ser utilizado como una medida cuantitativa de la habilidad de una población de parásitos para penetrar en una población de células huésped (42). En consecuencia, aunque el proceso de penetración "per se" no pueda ser observado, es posible determinar la cinética de la penetración de los tripomastigotes en las células de vertebrado mediante la determinación del número de parásitos intracelulares. Todos los parásitos capaces de penetrar en una célula no fagocítica de vertebrado, presentan la capacidad de reproducirse intracelularmente (46), completando su ciclo reproductivo cuando se produce la muerte y ruptura de la célula huésped y contribuyen así a la población parasitaria extracelular. Por lo tanto, la capacidad de penetración de una población de parásitos resulta ser una medida de la capacidad infectante de dicha población de T. cruzi.

Un número significativo de células de vertebrado es infectado por más de un parásito (tabla 6), hecho que no se ve reflejado cuando los datos se expresan como porcentaje de células infectadas. La media del número de parásitos intracelulares por célula debe ser utilizada como una medida cuantitativa de la penetración, y por ende de la infectividad, ya que tiene en cuenta la infección múltiple de las células huésped.

La microscopía de contraste de fase utilizada en el curso de este estudio, permite la visualización nítida de los parásitos intracelulares oscuros y su diferenciación de los parásitos extracelulares adheridos a la membrana de la célula huésped, los cuales son muy refringentes (foto 1 ,2)

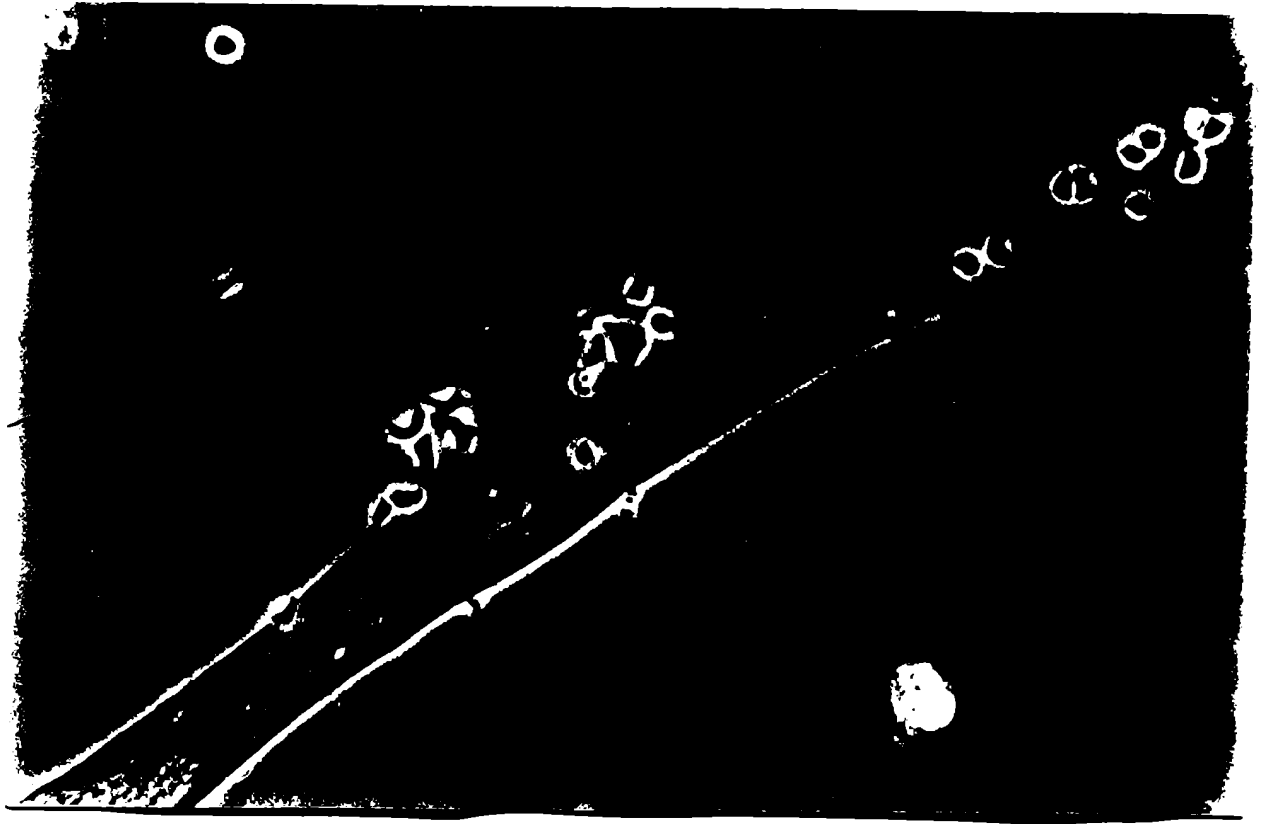


Foto 1

Foto 1. Esta microfotografía muestra parte de una célula BESM fijada después de su exposición a tripomastigotes del clon CA-I/71 (Aumento 300 X).

- A. Se pueden identificar parásitos que presentan la morfología típica del amastigote, tanto intracelulares (ai) como extracelulares (ae).
- B. Detalle de la microfotografía A en la cual los amastigotes intracelulares se encuentran en el mismo plano que la célula huésped.
- C. Detalle de la microfotografía A en la cual se ha enfocado a los amastigotes extracelulares. Se puede observar que tanto la célula huésped como los amastigotes intracelulares se encuentran fuera de foco.



Foto 2. Esta microfotografía muestra una célula BESM fijada después de su exposición a tripomastigotes del clon Miranda/76. Se pueden indentificar tripomastigotes adheridos a la célula huésped (te) y parásitos intracelulares (pi) en fase de reorganización a amastigotes (Aumento 250 X).

Las células BESM son células planas, extendidas, que se adhieren perfectamente al vidrio del cubreobjetos y presentan un citoplasma hialino. La preservación morfológica de las células de vertebrado es excelente con la metodología empleada (foto 3).

El hecho de utilizar poblaciones genéticamente homogéneas de parásitos, cada una de ellas con un ciclo intracelular característico en cuanto a su duración en cultivo de células, permitió obtener suspensiones de tripomastigotes prácticamente puras y libres de contaminación con otros estadios del parásito ( $\geq$  95% de tripomastigotes) en el sobrenadante de los cultivos celulares (ver 2.4).

Se han observado diferencias en la infectividad de tripomastigotes de distintas cepas de T. cruzi en células de vertebrado (150) y en la virulencia in vivo en animales inoculados experimentalmente con distintas cepas del parásito (68, 77). Sin embargo, la capacidad infectante de las cepas de T. cruzi puede variar cuando los parásitos son mantenidos bajo distintas condiciones en el laboratorio durante lapsos prolongados (77,81,155,69) o al variarse las condiciones de mantenimiento de los parásitos (76).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran, por primera vez, que existen diferencias estables y reproducibles en la capacidad de penetración en la célula huésped, y por ende en la capacidad infectante, de subpoblaciones de T. cruzi provenientes de una misma cepa o de distintas cepas, indicando que este parámetro biológico es clon dependiente.

Las capacidades infectantes de los clones CA-I/71 y Miranda/80 se controlaron periódicamente durante un lapso de cuatro años sin que se evidenciaron cambios en esta característica biológica. Por lo tanto, los cambios observados en la virulencia de los aislamientos de Trypanosoma cruzi mantenidos en condiciones de laboratorio de acuerdo a distintas

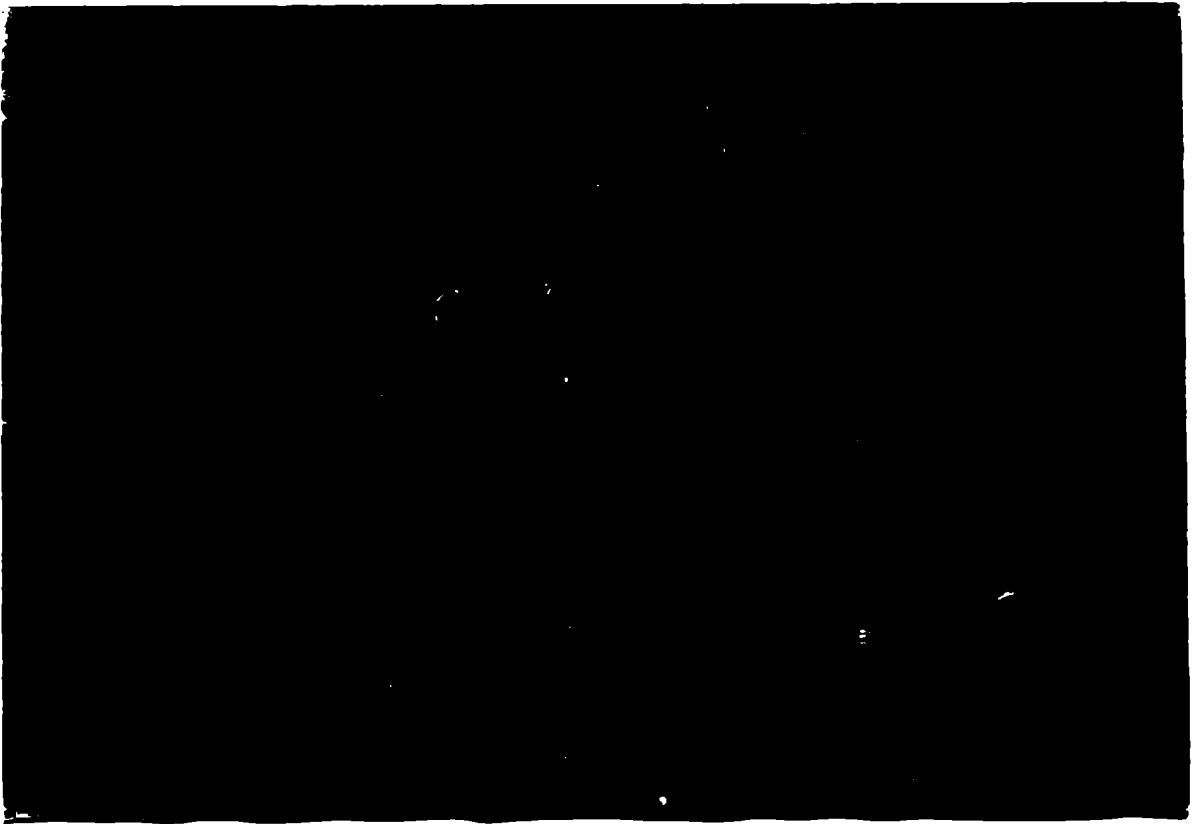


Foto 3. Microfotografía por contraste de fase de una célula BESM, cultivada en medio RPMI-1640 con el agregado de 5% de suero fetal bovino inactivado y posteriormente fijada con glutaraldehído y montada con glicerina; en la cual se puede observar el citoplasma hialino característico de estas células planas y extendidas (Aumento 450 X).

metodologías pueden ser resultado de la selección que induciría cambios en la composición relativa de la población parasitaria. Dependiendo del protocolo de mantenimiento, se podrían entonces seleccionar subpoblaciones de alta o baja capacidad infectante a partir de una cepa que contiene ambas subpoblaciones. Las diferencias o semejanzas entre aislamientos de T. cruzi se evidenciarían solamente una vez que dichas poblaciones hayan sido seleccionadas y estabilizadas (218).

Meirelles y col., (189) indican que la infectividad es una característica biológica de las cepas de T. cruzi, la que se mantendría cuando los parásitos son transferidos de sus huéspedes naturales a sistemas in vitro. Las cepas caracterizadas por estos autores estarían o bien seleccionadas y estabilizadas con respecto al porcentaje relativo de las distintas subpoblaciones de parásitos presentes, o serían homogéneas con respecto a esta característica biológica. Hay que considerar asimismo que estos autores utilizaron macrófagos como células huésped, lo que introduce una variable más en el sistema: la capacidad fagocítica de los macrófagos. Este mecanismo no se puede correlacionar con el mecanismo de interiorización de T. cruzi en células no profesionalmente fagocíticas, en las cuales sólo el tripomastigote es capaz de penetrar, mientras que tanto el epimastigote como el tripomastigote son interiorizados por los macrófagos (224).

Otra evidencia de que la virulencia es aparentemente una característica intrínseca del parásito fue obtenida por Schlemper (219), quien no encontró correlación entre el número de tripomastigotes metacíclicos de algunas cepas de T. cruzi inoculados en ratones y el curso de la infección, la que estaba influenciada por la virulencia del parásito. Inóculos bajos, del orden de los  $5 \times 10^3$  tripomastigotes metacíclicos, de cepas de distinta virulencia produjeron reiteradamente infecciones de baja, intermedia y alta virulencia en ratones, dependiendo de la cepa de T. cruzi. Cuando

se utilizaron tripomastigotes sanguíneos para infectar a los animales en experimentación, se observó una correlación entre el número de parásitos inoculados y los niveles de parasitemia, excepto en cepas de baja virulencia en las cuales la inoculación de un alto número de parásitos no aumentó la parasitemia.

Se había postulado que el cambio y/o la imposibilidad de reproducir el curso de algunas infecciones experimentales por T. cruzi podía atribuirse a la heterogeneidad genética de la cepa estudiada (220,156). Sin embargo, la importancia de la heterogeneidad de las cepas del parásito en el curso de la infección en animales en experimentación, sólo se evidenció cuando se comparó la patogenicidad de dos clones provenientes del mismo aislamiento en ratones altamente endocriados. Aunque ambos clones indujeron una infección aguda, esta sólo fue fatal para los ratones infectados con uno de los clones, mientras que los ratones infectados con el otro clon sobrevivieron y desarrollaron características histopatológicas, serológicas y parasitológicas típicas de la infección crónica (84).

Estos datos implican que no sólo el contenido genético del hospedador sino también el contenido genético del parásito modulan el curso de la infección chagásica (221), lo que avala nuestros resultados.

Bartelli y Brener estudiaron la infección de células de riñón de mono (Vero) por tripomastigotes de las cepas Y y CL de T. cruzi (150). Los resultados obtenidos por estos autores demuestran que los tripomastigotes de la cepa CL presentan una menor infectividad debido a su menor habilidad para penetrar en las células de vertebrado. Estos resultados sugirieron que la capacidad infectante de los parásitos podría estar relacionada con la morfología del tripomastigote. De este modo, los tri-



tripomastigotes de la cepa Y serían más infectantes debido a la predominancia de formas delgadas (*slender*) en esta cepa, mientras que en la cepa CL, menos infectante, predominan los tripomastigotes anchos (*broad*). Deane y col. (222) inocularon células Vero y Hela con formas sanguíneas de cuatro cepas de T. cruzi y después de tres días de incubación a 35°C, el sobrenadante contenía sólo formas tripomastigote anchas, lo que se interpretó como debido a que la mayoría de las formas delgadas penetran en las células de vertebrado, mientras que las formas anchas son menos competentes para interactuar con la célula huésped.

En el curso de este trabajo, se observó que la mayoría de los tripomastigotes presentaban la morfología característica de los tripomastigotes anchos. Sin embargo, el clon CA-I/71 resultó ser sumamente infectante para células de vertebrado, mientras que en contraposición el clon Miranda/80 presentó una muy baja capacidad infectante. Esta observación implica que no habría una correlación entre la morfología del tripomastigote y su capacidad para infectar células de vertebrado, e indicaría que estos dos parámetros no estarían necesariamente relacionados. Esta observación se ve confirmada por el hecho de que los tripomastigotes delgados (*slender*) de la cepa CL son igualmente menos infectantes que los de la cepa Y y de T. cruzi, porque al igualarse la concentración de tripomastigotes delgados presentes en los inóculos de ambas cepas de T. cruzi, la infección de células de vertebrado es asimismo inferior para la cepa CL (150).

En consecuencia, la capacidad infectante es una característica biológica que depende del fondo genético de los parásitos, a pesar de estar igualmente modulada por el tipo de célula huésped (39,28), y no estaría relacionada con la morfología del parásito.

Para el clon CA-I/71 de T. cruzi se evidenció que, una vez transcurrido el lapso de incubación, todos los parásitos adheridos externamente a las células huésped e interiorizados en las mismas presentaban una morfología similar a la del amastigote, mientras que los parásitos no adheridos a las células conservaban la morfología característica del tripomastigote. En los clones Miranda/76 y /80 se encontraron, en cambio, tanto formas amastigotes como tripomastigotes y formas en proceso de diferenciación en el citoplasma de la célula huésped, mientras que la mayoría de los parásitos extracelulares adheridos presentó la morfología típica de los tripomastigotes. Los parásitos del clon CA-I/71 de T. cruzi presentaron, asimismo, una mayor capacidad para adherirse a la membrana de la célula huésped que los tripomastigotes de los clones CA-I/72, Miranda/76 y Miranda/80. Desconocemos hasta el presente el significado biológico de esta rápida transformación morfológica de los altamente infectantes tripomastigotes del clon CA-I/71 al contactar la membrana plasmática de la célula huésped, aunque es evidente que este fenómeno es también clon dependiente.

Los resultados obtenidos permiten concluir que pueden convivir subpoblaciones de parásitos con distintas capacidades infectantes en pacientes chagásicos crónicos y que la infectividad es un parámetro biológico característico de cada subpoblación de parásitos. El origen de una población heterogénea de parásitos en un paciente chagásico crónico puede deberse a una infección única con una población heterogénea o a múltiples infecciones. Pero de hecho, la coexistencia de parásitos con características biológicas distintas tiene profundas implicancias en la relación huésped-parásito, ya que esta relación será el producto de la sumatoria de las interacciones entre cada una de las subpoblaciones de parásitos

presentes y el huésped. Por lo tanto, la relación huésped-parásito dependerá del número y de las características biológicas de las subpoblaciones de T. cruzi que parasitan a dicho huésped. Es importante destacar que la utilización de clones de T. cruzi no sólo ha permitido demostrar la heterogeneidad presente en esta especie, sino que tiene implicancias más profundas, porque los clones no representan un producto artificial obtenido en el laboratorio, sino que cada clon de T. cruzi representa una subpoblación natural del parásito, ya que no se ha detectado intercambio genético en este organismo. O sea, que un clon representa a un organismo y su progenie y se encuentra genéticamente aislado de otros clones del parásito.

Si se confirma la correlación existente entre una alta tasa de crecimiento y una alta virulencia y viceversa, encontrada recientemente (223), no cabe duda de que la coexistencia de subpoblaciones de T. cruzi con alta infectividad y con baja infectividad en un mismo paciente chagásico crónico podría influenciar el curso y la evolución de la enfermedad de Chagas.

### 3.2 Penetración de tripomastigotes del clon CA-I/71 de T. cruzi en células de mamífero: estudio del efecto de monosacáridos.

Basándose en la hipótesis de que las glicoproteínas de superficie podrían actuar como receptores durante el proceso infeccioso, siendo las responsables de la interacción entre el Trypanosoma cruzi y la célula huésped, se estudió el efecto de los monosacáridos predominantes presentes en las glicoproteínas de la superficie celular de las células de vertebrado, sobre la capacidad infectante del estadio tripomastigote del parásito.

A continuación se presentan los resultados del estudio del efecto de nueve monosacáridos comúnmente presentes en las glicoproteínas de superficie, sobre la infectividad del clon CA-I/71 y de la cepa Ernestina de T. cruzi.

### 3.2.1 Resultados del estudio del efecto de monosacáridos

Se expusieron células BESM a tripomastigotes derivados de cultivo de tejidos del clon CA-I/71 de T. cruzi en presencia o no de  $\alpha$ -D(+) glucosa, D(+) galactosa,  $\alpha$ -D(+) fucosa, D(+) manosa, D(-) arabinosa, D(+) xilosa, D(-) ribosa, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina. Como controles se utilizaron cultivos de células expuestos simultáneamente a tripomastigotes de la cepa Ernestina de T. cruzi en presencia o no de N-acetil-D-glucosamina (ver 2.7.2).

La habilidad de los tripomastigotes de la cepa Ernestina para infectar células BESM se vio inhibida más de un 90% en presencia de 20 mM de N-acetil-D-glucosamina. Sin embargo, no se evidenció una inhibición de la infección de las células BESM por tripomastigotes del clon CA-I/71 en las mismas condiciones experimentales. Los resultados obtenidos se encuentran expresados como índices de penetración (Figura 6) (ver 2.7.3).

Asimismo, no se evidenció una inhibición de la capacidad infectante de los tripomastigotes del clon CA-I/71 de T. cruzi cuando se incubó a los parásitos con las células de vertebrado en presencia de otros ocho monosacáridos (Figura 7). Los datos obtenidos se encuentran expresados también como índices de penetración, habiéndose omitido en este caso la representación gráfica de los controles realizados simultáneamente con la cepa Ernestina, a fin de facilitar la visualización de los resultados obtenidos.

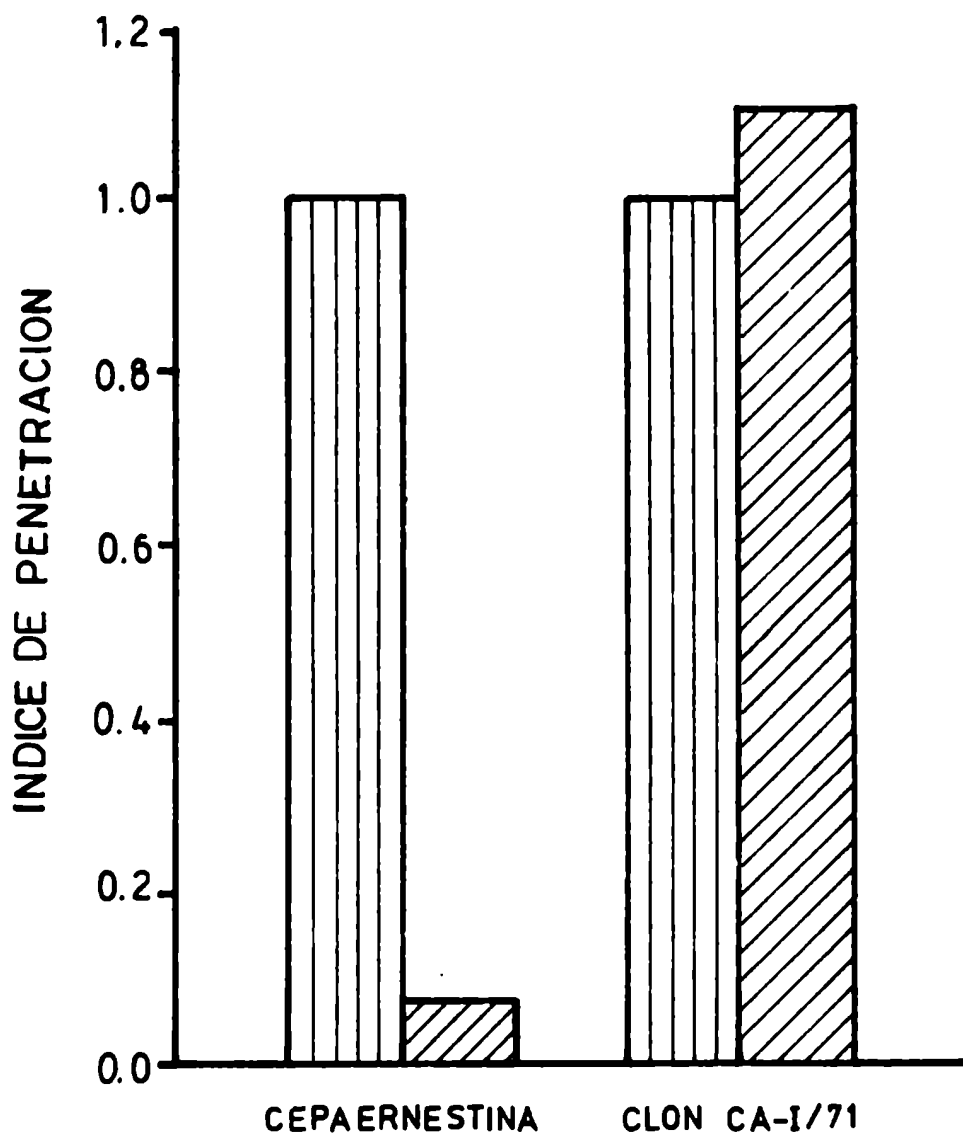


Figura 6. Histograma que muestra el efecto de 20 mM de N-acetil-D-glucosamina (rayas oblicuas) sobre la infección de células BESM por tripomastigotes de la cepa Ernestina y el clon CA-I/71 de *T. cruzi* con respecto a los correspondientes controles (rayas verticales). (ES = 0,03-0,12;  $\bar{n}$  = 3; siendo ES el error estandar del Índice de Penetración Medio y  $\bar{n}$  el número de experimentos independientes realizados).

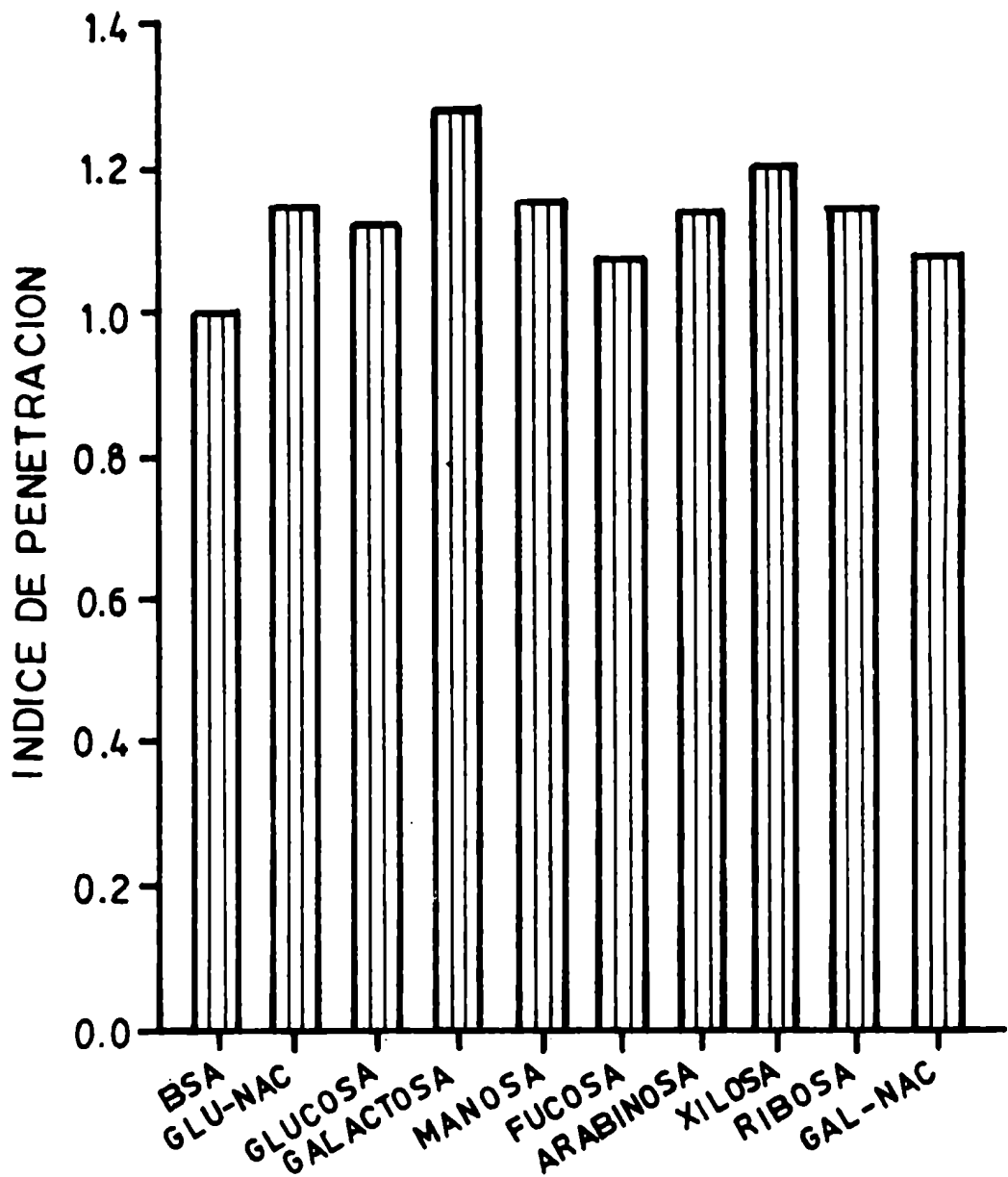


Figura 7. Histograma que muestra el efecto de nueve monosacáridos (20 mM) sobre la capacidad infectante de los tripomastigotes del clon CA-I/71 con respecto al control con seroalbúmina bovina (BSA). (ES = 0,01-012;  $\bar{n}$  = 3; siendo ES el error estandar del Índice de Penetración Medio y  $\bar{n}$  el número de experimentos independientes realizados).

### 3.2.2 Discusión

Previamente a la infección de las células huésped en el mamífero, los protozoos parásitos intracelulares obligados deben ser capaces de reconocer y adherirse a las células susceptibles a la infección. Aunque las fases de adhesión e interiorización del Trypanosoma cruzi pueden ser separadas para su análisis, el mecanismo de adhesión e infección no ha sido dilucidado hasta el presente (181, 182, 116). Se ha demostrado que la infección por T. cruzi y Toxoplasma gondii está modulada por el ciclo celular de la célula de vertebrado y que está relacionada con la síntesis de glicoproteínas de membrana (186), siendo máxima durante el período S (184). Se considera que muchas interacciones célula-célula son mediadas por glicoproteínas de superficie (179, 200, 178, 177). Varios estudios han demostrado que la adherencia entre distintos tipos de células puede ser inhibida por lectinas (177, 181, 183) o por aquellos monosacáridos que constituyen los hidratos de carbono de la superficie celular (177).

La infección de células de vertebrado por tripomastigotes de T. cruzi puede ser inhibida por lectinas con distintas especificidades, indicando que los hidratos de carbono de la superficie celular están involucrados en el proceso de infección (183). Sin embargo, el tratamiento con lectinas no es lo suficientemente selectivo como para identificar a los receptores involucrados en la interacción entre el parásito y la célula huésped. Más aún, los estudios con lectinas se ven limitados ya que algunas son tóxicas para las células de vertebrado (195). En consecuencia, se estudió el efecto de los monosacáridos comúnmente presentes en la superficie celular (177) sobre la interacción entre T. cruzi y la célula de vertebrado (195, 196, 225), encontrándose que la N-acetil-glucosamina

inhibe específicamente la infección de varios tipos celulares por T. cruzi. La preincubación de los parásitos con este monosacárido trajo como consecuencia la inhibición de la adhesión y penetración de los parásitos de la cepa Ernestina de T. cruzi en la célula de vertebrado no fagocítica. Por el contrario, la preincubación de las células de vertebrado en presencia de este monosacárido no inhibió la infección por el parásito (195). Estos resultados implican que los tripomastigotes de Trypanosoma cruzi se adhieren a receptores que contienen N-acetil-D-glucosamina, presentes en la superficie celular de la célula huésped de vertebrado. O sea, que los tripomastigotes tendrían una lectina del tipo de la aglutinina de germen de trigo (WGA) en su superficie, que interactuaría con el receptor conteniendo N-acetil-glucosamina presente en la superficie celular de la célula de mamífero (195).

En base a estos resultados, se había postulado que el conocido fenómeno de tropismo tisular (67,68) presente en las infecciones por T. cruzi, podría deberse a diferencias cuantitativas en los residuos de N-acetil-glucosamina presentes en los distintos tejidos del huésped, lo que resultaría en una distinta susceptibilidad de los tejidos a la infección, influenciando de este modo la distribución de los parásitos en el huésped vertebrado (195).

El hallazgo de diferencias tan notables en la infectividad de los clones de T. cruzi estudiados (ver 3.1.3) nos llevó a estudiar el efecto de este monosacárido sobre la infectividad del parásito, para determinar si estas diferencias podrían atribuirse a diferencias cuantitativas o cualitativas en los receptores de membrana involucrados en el proceso infeccioso, escogiéndose inicialmente el clon CA-I/71, por ser este clon el más infectante para células de vertebrado de todos los clones de T. cruzi disponibles. Sin embargo, la N-acetil-D-glucosamina no inhibió la



infección de las células huésped por tripomastigotes del clon CA-I/71, en condiciones idénticas a las que inhiben la interiorización de los tripomastigotes de la cepa Ernestina de T. cruzi. Estos resultados implican que existen diferencias intra-específicas en los receptores de superficie del Trypanosoma cruzi involucrados en la interacción con la célula huésped.

Como se mencionara anteriormente, no se encontró inhibición de la interiorización de los tripomastigotes del clon CA-I/71 en la célula de vertebrado en presencia de otros monosacáridos comúnmente presentes en la superficie celular. Un fenómeno similar ha sido descrito para los taquizoitos de T. gondii (195). La falta de inhibición de la capacidad de penetración de los tripomastigotes del clon CA-I/71 por otros monosacáridos, implicaría que los cambios en el/los receptor/es no serían debidos al reemplazo de un monosacárido por otro en la estructura glucosídica del mismo, como se ha descrito en bacterias (177). En consecuencia la infección de células de vertebrado por tripomastigotes del clon CA-I/71 de T. cruzi estaría mediada por componentes de superficie distintos de los de las cepas Ernestina e Y de T. cruzi. Es factible que la falta de inhibición total de la infección celular por tripomastigotes de estas cepas de T. cruzi pudiera deberse a heterogeneidad poblacional con respecto a los receptores de membrana involucrados en el proceso infeccioso.

La diversidad intra-específica encontrada a este nivel tan fundamental de la interacción entre el parásito y la célula huésped tiene importantes implicancias y aumenta la complejidad del aislamiento de la/s glicoproteína/s de la superficie del parásito involucradas en la interiorización de T. cruzi en la célula huésped, tendiente a lograr la identificación y caracterización del/los receptor/es, con el objeto de

eventualmente interferir con el proceso de infección a este nivel de la interacción parásito-célula huésped (176,226).

### 3.3 Capacidad de penetración de tripomastigotes de los clones CA-I/59, /69,/70 y Miranda/80, /83 y /88 en células de mamífero: estudio del efecto de la N-acetil-glucosamina.

Los resultados obtenidos en este trabajo con respecto a la falta de inhibición de la interiorización de los tripomastigotes del clon CA-I/71 de T. cruzi en presencia de N-acetil-glucosamina, a concentraciones que inhiben la interiorización de los parásitos de las cepas Ernestina e Y de T. cruzi, nos llevaron a estudiar el efecto de este monosacárido sobre la infectividad de varios clones del parásito, para determinar si la falta de inhibición de la N-acetil-glucosamina en la interiorización del clon CA-I/71 constituye un caso aislado o excepcional dentro de las subpoblaciones de T. cruzi. A continuación se presentan los resultados del estudio del efecto de la N-acetil-glucosamina sobre la capacidad de penetración de los tripomastigotes de los clones CA-I/59,/69,/70 y Miranda/80, /83 y /88 de T. cruzi.

#### 3.3.1 Resultados del estudio del efecto de la N-acetil-glucosamina

Se expusieron células BESM a tripomastigotes derivados de cultivo de tejidos de los clones CA-I/59, /69, /70 y Miranda/80, /83 y /88 en presencia o no de 20 mM del monosacárido. Como controles se utilizaron cultivos de células BESM expuestos a tripomastigotes de la cepa Y de T. cruzi en las mismas condiciones experimentales (ver 2.8.2).

La habilidad de los tripomastigotes de la cepa Y para interiorizarse en la célula huésped se vio inhibida entre un 70-75% en presencia de

TABLA 12. EFECTO DE LA N-ACETIL-GLUCOSAMINA (20 mM) SOBRE LA CAPACIDAD  
INFECTANTE DE CLONES Y DE LA CEPA Y DE T. CRUZI EN CELULAS DE  
MAMIFERO .

| Clon/cepa  | Indice de penetración (IP) | Porcentaje de inhibición |
|------------|----------------------------|--------------------------|
| CA-I/70    | 0,92                       | 8%                       |
| CA-I/69    | 0,89                       | 11%                      |
| CA-I/59    | 0,96                       | 4%                       |
| Miranda/80 | 0,34                       | 66%                      |
| Miranda/83 | 0,63                       | 37%                      |
| Miranda/88 | 0,12                       | 88%                      |
| Cepa Y     | 0,25-0,3                   | 70-75%                   |

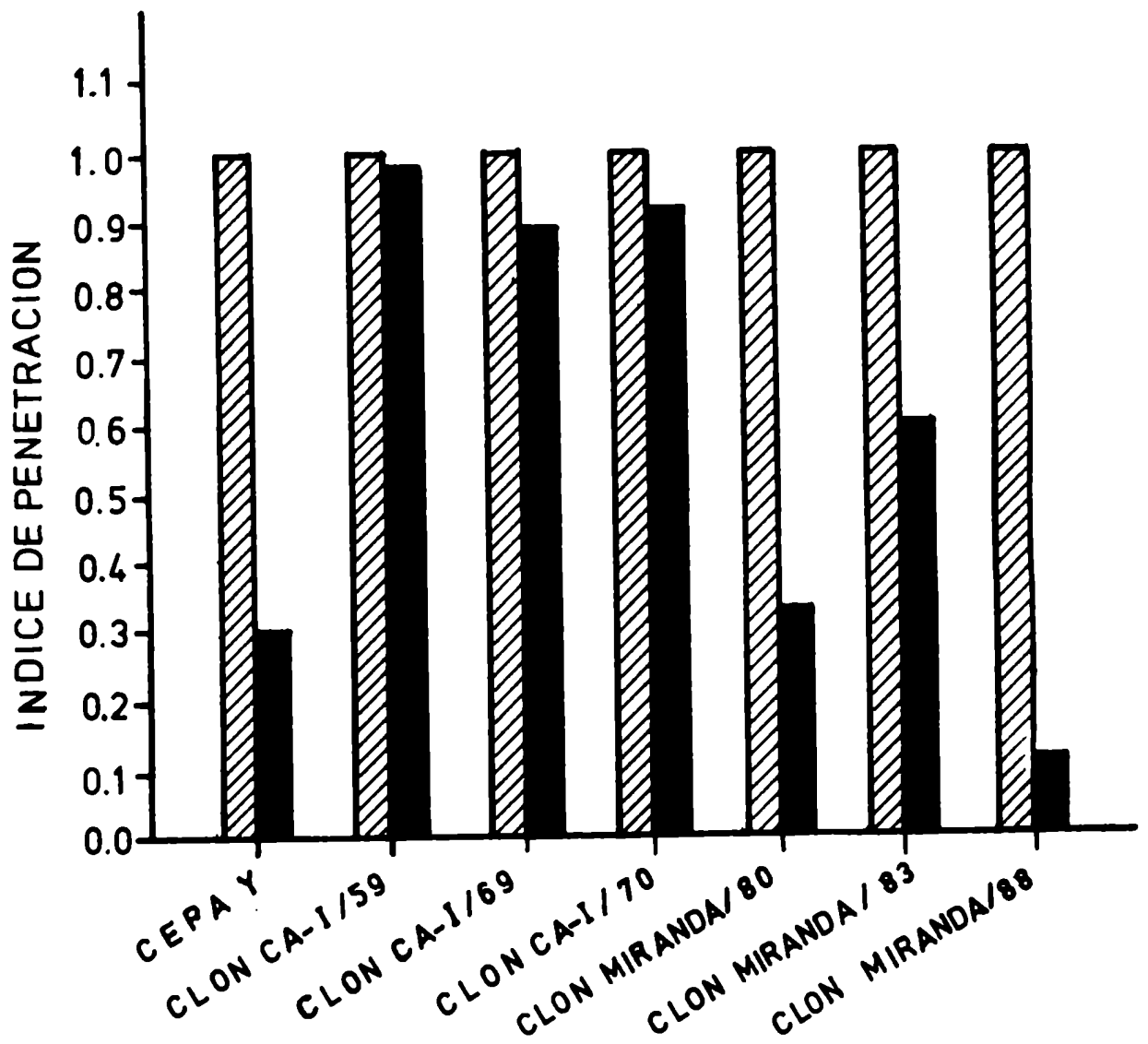


Figura 8. Histograma que muestra el efecto de 20 mM de N-acetil-D-glucosamina sobre la capacidad infectante de tripomastigotes de la cepa Y y de los clones CA-I/59, /69, /70 y Miranda/80, /83, /88 (barras sólidas) con respecto a los correspondientes controles (barras rayadas). (ES = 0,01-011;  $\underline{n}$  = 3; siendo ES el error estandar de los Indices de Penetración Medios y  $\underline{n}$  el número de experimentos independientes realizados).

N-acetil-glucosamina. Los tripomastigotes de los clones CA-I/59, /69, y /70 no evidenciaron inhibición de la capacidad de penetración en presencia de este azúcar (Figura 8, tabla 12).

Con respecto a los clones Miranda, se observó una inhibición de aproximadamente un 37% para el clon Miranda/83, mientras que los clones Miranda/80 y /88 evidenciaron una gran susceptibilidad a este monosacárido, obteniéndose inhibiciones de la capacidad infectante de un 66% y un 88% respectivamente (Figura 8, tabla 12), con respecto a los correspondientes controles. El análisis estadístico de los datos reveló que el efecto inhibitorio de la capacidad infectante por el monosacárido es significativo para los clones Miranda estudiados y la cepa Y de T.cruzi.

### 3.3.2 Discusión

Los resultados anteriormente expuestos confirman la existencia de heterogeneidad intra-específica en T. cruzi con respecto a los receptores de membrana involucrados en el proceso de infección de las células huésped no fagocíticas por el estadio tripomastigote del parásito. La capacidad infectante de los tripomastigotes de los clones CA-I/59, /69 y /70, al igual que la del clon CA-I/71, no se vio inhibida en presencia de N-acetil-glucosamina, mientras que si se inhibió significativamente la interiorización de los tripomastigotes de los clones Miranda/80, /83 y /88 en las mismas condiciones experimentales. Para el clon Miranda/83 se evidenció, sin embargo, una inhibición estadísticamente significativa de aproximadamente un 37% en presencia del monosacárido, en contraposición con los altos niveles de inhibición (superiores al 66%) de la capacidad infectante obtenidos para los otros dos clones Miranda estudiados.

Se ha demostrado recientemente que los epimastigotes y los tripomastigotes de T. cruzi parecen tener al menos dos tipos de receptores para la Concanavalina A y la aglutinina de germen de trigo (WGA), respectivamente, uno de baja capacidad pero de alta afinidad y otro de alta capacidad pero de baja afinidad. Uno de estos receptores presente en el epimastigote tiene una constante afinidad por Con A cinco veces mayor que la encontrada en tripomastigotes (106). Cabe la posibilidad de que exista un fenómeno similar en el/los receptor/es glicoproteico/s de superficie involucrado/s en el proceso de interiorización de T. cruzi en la célula huésped.

En bacterias, ha podido determinarse que la glucosa y la galactosa inhiben la unión in vitro a macrófagos peritoneales de ratón. Entre las bacterias estudiadas se encuentran Streptococcus viridans, S. pyogenes, Escherichia coli, Staphylococcus albus, Pseudomonas aeruginosa, etc., (177).

Se han encontrado mutantes bacterianas con deficiencias en sus glicoproteínas de superficie, como por ejemplo, la mutante SL 1102 de Salmonella typhimurium y la mutante MIOB (deficiente en galactosa) de Klebsiella aerogenes, cuya unión a macrófagos no se inhibe con ninguno de los monosacáridos que inhiben la unión del tipo salvaje (177) (Figura 9). En experimentos similares, se ha determinado que los macrófagos de ratón se unen in vitro a células tumorales de ratón o a fibroblastos embrionarios de ratón, y se ha observado que la glucosa y la galactosa tienen importancia en esta unión, ya que se logró inhibirla en presencia de estos monosacáridos, aunque la unión de fibroblastos embrionarios de ratones C3H y células peritoneales de ratones C3H es inhibida solamente cuando los fibroblastos se encuentran en fase de crecimiento logarítmico y

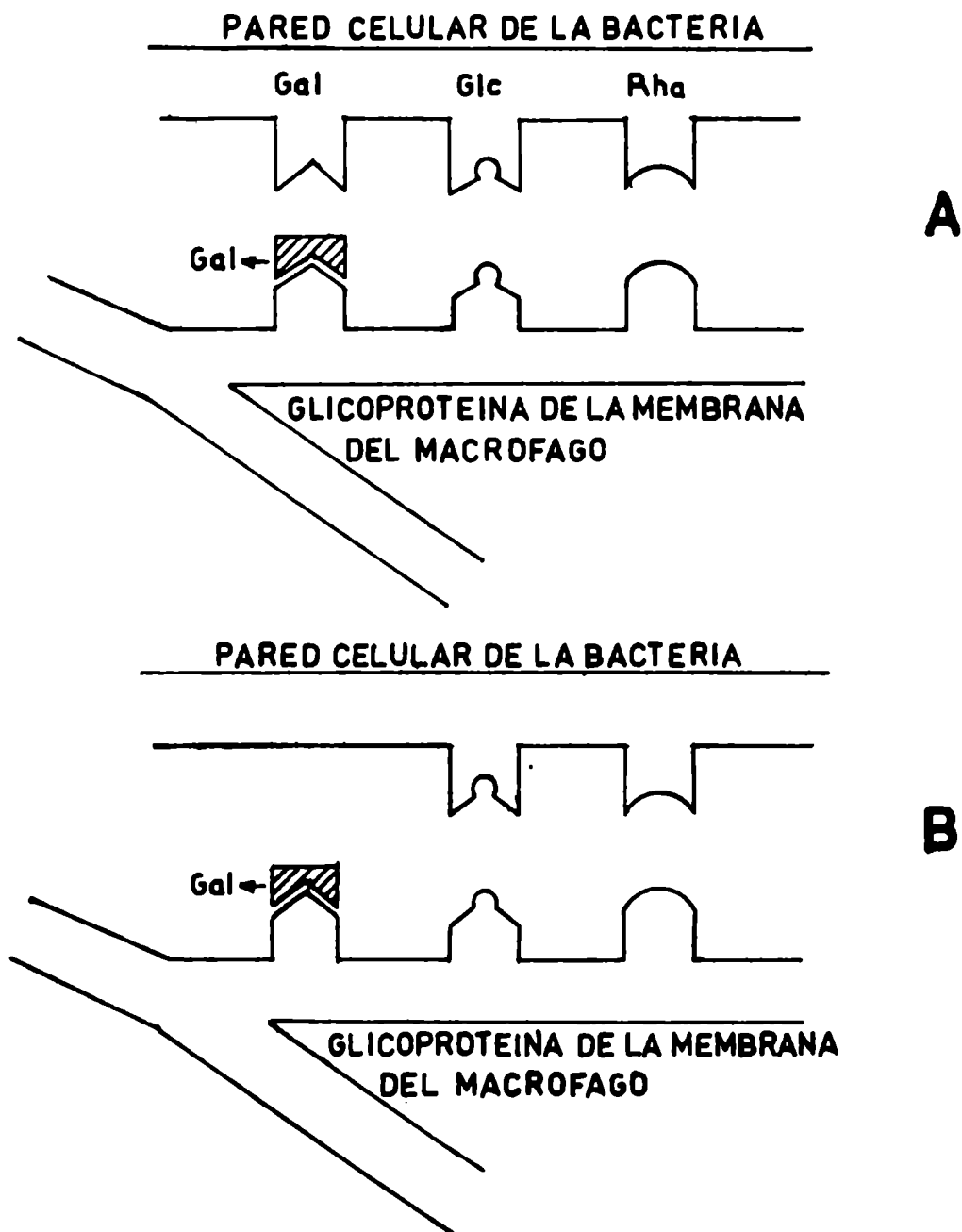


Figura 9. Posible forma de interacción entre el receptor de tipo lectina presente en la membrana del macrófago y los monosacáridos de la pared celular de la bacteria Klebsiella aerogenes (según Weir, 177).

- A. Mecanismo por el cual la galactosa interferiría en la unión.
- B. La galactosa no inhibiría la unión con una mutante bacteriana deficiente en galactosa.

dentro de los primeros pasajes de cultivo. mientras que la unión a fibroblastos confluentes no se inhibe con ninguno de los dos azúcares. Según Weir, la naturaleza de los receptores de membrana involucrados en las interacciones entre células parece ser similar en bacterias y en células eucariontes (177).

Cabe entonces la posibilidad de que la falta de inhibición de la infección de las células BESM por los tripomastigotes de los clones CA-I de T. cruzi estudiados, en presencia de N-acetil-glucosamina, pueda atribuirse a la aparición de mutaciones que traigan aparejadas diferencias entre las glicoproteínas de membrana involucradas en la interacción con la célula huésped de distintas subpoblaciones de T. cruzi, similares a las descritas en bacterias.

Se ha determinado que una concentración 20 mM de N-acetil-glucosamina inhibe específicamente la infección de células BESM por tripomastigotes de las cepas Ernestina e Y de T. cruzi y que ninguno de los otros monosacáridos comúnmente presentes en la superficie celular es inhibitorio a esta concentración. A concentraciones de 50 mM o superiores, todos los monosacáridos inhiben inespecíficamente la infección de células BESM por tripomastigotes derivados de cultivo de tejidos (195). Andrews y Colli (196) encontraron que la infección de dos líneas celulares, Hela y LLC-MK<sub>2</sub>, por tripomastigotes de la cepa Y de T. cruzi, se inhibe hasta un 90% en presencia de concentraciones comprendidas entre 100-200 mM de N-acetil-glucosamina y que otros monosacáridos no fueron inhibidores a estas altas concentraciones. Posteriormente, Colli y col. (226) probaron el efecto de distintas concentraciones de N-acetil-glucosamina en los mismos sistemas celulares mencionados, encontrando que una concentración 50 mM produce un efecto inhibitorio de la interiorización del parásito



de alrededor de un 70-80% con respecto al control en células LLC-MK<sub>2</sub>, mientras que el sistema parásitos-células Hela resultó ser aún más susceptible a la inhibición por este monosacárido, obteniéndose una inhibición de aproximadamente un 90% a esta concentración.

En nuestro sistema, la interiorización de los tripomastigotes de la cepa Y de T. cruzi en las células BESM se vio inhibida en un 70-75% en presencia de 20 mM de N-acetil-glucosamina, lo que concuerda con los resultados anteriormente expuestos obtenidos por otros autores (195,226). Las diferencias en las concentraciones del monosacárido necesarias para inhibir la interiorización del parásito, podrían deberse a los distintos sistemas celulares experimentales y/o a las distintas concentraciones de parásitos utilizadas, ya que las concentraciones de tripomastigotes derivados de cultivo de tejidos de la cepa Y utilizadas por Collí y col. (226) son aproximadamente 20 veces superiores a las utilizadas en los controles de nuestro diseño experimental.

Además, cabe señalar que las células BESM constituyen un cultivo primario de células musculares y de piel de feto bovino, el cual es más susceptible a la infección por T. cruzi que las líneas celulares Hela, Vero, CK (de riñón de perro) (39). Las células BESM no sobreviven más de 12 subcultivos, transcurridos los cuales cesan de dividirse y mueren. Las líneas celulares obtenidas a partir de células neoplásicas o transformadas mantienen por el contrario, su capacidad de dividirse y pierden la inhibición por contacto. Se ha demostrado que las glicoproteínas de la superficie celular están involucradas, entre otras funciones, en el control del crecimiento celular y de la división celular, y que su conformación y disposición cambia con los distintos estados fisiológicos y patológicos de la célula (227). Por ejemplo, algunas lectinas aglutinan

a las células neoplásicas y transformadas pero no a las células normales. Asimismo, se ha demostrado que los hidratos de carbono presentes en la superficie celular de muchas líneas celulares son distintos a los de las células padres normales, como por ejemplo, se demostró que la transformación maligna de las células trae como consecuencia la desaparición de la fibronectina de la superficie celular y un notable cambio en sus carbohidratos de superficie. Por las razones anteriormente expuestas, se decidió utilizar cultivos primarios de células musculares y de piel de feto bovino como células huésped (BESM). Todos los experimentos realizados en el transcurso de este trabajo de tesis, se llevaron a cabo con células BESM dentro de los primeros 6 pasajes en cultivo.

Se han encontrado varias evidencias que indican la existencia de heterogeneidad en la superficie celular de T. cruzi, las cuales avalan los resultados expuestos en este trabajo (133,228). Vale la pena recalcar que Bongertz y Dvorak encontraron heterogeneidad en los antígenos del estadio epimastigote de T. cruzi (83), mientras que Plata y col. (217) describen una marcada heterogeneidad en los antígenos de superficie del estadio tripomastigote, no sólo entre cepas de T. cruzi sino también entre clones del parásito provenientes de una misma cepa, lo que indica una alta heterogeneidad a nivel genético en T. cruzi.

Los resultados obtenidos por Colli y col. (226) sugieren que al menos una glicoproteína antigénica expresada en la superficie del tripomastigote estaría involucrada en el proceso de interiorización en las células de vertebrado. Se desconoce sin embargo, si hay otra/s glicoproteína/s involucrada/s en esta interacción básica y si ésta/s serían antigénica/s.

La falta de inhibición de la infectividad en presencia de N-acetilglucosamina encontrada para algunos clones de T. cruzi, sumada al hecho de

que la inhibición de la interiorización por N-acetil-glucosamina de las cepas (195,196,226) y de algunos clones de los clones de T. cruzi estudiados nunca es total, confirman a nuestro entender la existencia de diferencias cualitativas en los receptores de membrana involucrados en el proceso infeccioso. La existencia de esta heterogeneidad deberá ser considerada en el futuro en los estudios tendientes a la obtención de vacunas efectivas contra el T. cruzi y en los tendientes a lograr la interferencia del proceso infeccioso a nivel de la interacción entre el parásito y la célula huésped.

Hay todavía numerosos interrogantes no dilucidados, entre otros contra cuál estadio del parásito debería dirigirse una vacuna, cuáles son los antígenos relevantes, si los determinantes antigénicos son comunes o no en las distintas cepas de T. cruzi y cuándo comienzan a expresarse los genes que los codifican. Indudablemente, sólo un mejor conocimiento de la biología del Trypanosoma cruzi permitirá el desarrollo de una vacuna efectiva contra la enfermedad de Chagas.

Goldenberg y col. (229) investigaron los productos finales de la expresión genética de tripomastigotes de distintos orígenes, analizando el perfil electroforético de los polipéptidos por electroforesis bidimensional. A tal efecto, compararon los perfiles polipeptídicos de tripomastigotes metacíclicos obtenidos de cultivo axénico, según el método de inducción de la metaciclogénesis en medio conteniendo orina artificial de triatomino y suero bovino, de tripomastigotes metacíclicos provenientes de R. prolixus infectados y de tripomastigotes obtenidos en medio químicamente definido, del clon Em 28c de Trypanosoma cruzi, concluyendo que los tripomastigotes provenientes de distintos orígenes presentan productos finales de la translación in vivo diferentes y característicos según su origen.

El Trypanosoma cruzi es, en consecuencia, un eucarionte unicelular muy complejo y posee mecanismos muy eficientes para la modulación de la expresión genética cuando se los somete a distintas condiciones ambientales. Sin embargo, a pesar de las diferencias encontradas, todos los tripomastigotes diferentes son capaces de penetrar en la célula de mamífero para reproducirse. Pero cabe preguntar si los tripomastigotes de distintos orígenes y cepas infectan a las células por mecanismos idénticos y utilizando los mismos componentes de membrana, o existen por el contrario distintos procesos. Los resultados expuestos indican que existirían diferencias en las glicoproteínas específicas que modulan el proceso infeccioso en distintos clones de T. cruzi.

En vista de la complejidad, la heterogeneidad y el repertorio potencial de los productos de la expresión genética en tripomastigotes de T. cruzi, los estudios dirigidos hacia el desarrollo de una vacuna contra la enfermedad de Chagas deberán incluir el estudio de los factores comunes entre los distintos tipos de tripomastigotes y entre las distintas cepas de T. cruzi.

Los clones CA-I y Miranda utilizados en el curso de este trabajo han sido caracterizados según varios parámetros bioquímicos y biológicos hasta el presente. Es interesante destacar que el clon Miranda/83, al igual que los clones Miranda/76 y /78, presentan esquizodemas casi idénticos a los de los clones CA-I y diferentes de los restantes clones Miranda (63). Asimismo, los clones CA-I y Miranda fueron caracterizados con respecto a la reactividad con el anticuerpo monoclonal WIC 29,26 obtenido por Snary y col., (174), el cual se une a la región conteniendo carbohidratos de una glicoproteína de 72 kDa presente en la superficie del epimastigote y del tripomastigote metacíclico. Los clones Miranda/83, /78 y /76 no presentaron reactividad con este anticuerpo monoclonal, al igual que la

totalidad de los clones CA-I, mientras que los restantes clones Miranda presentaron una reactividad positiva (85), lo que indica que el epitope reconocido por este anticuerpo monoclonal o bien no se encuentra accesible en algunas poblaciones de T. cruzi o no se encuentra universalmente expresado en el epimastigote de T. cruzi, confirmando nuevamente la existencia de heterogeneidad intra-específica e intra-poblacional en la constitución antigénica del T. cruzi. Asimismo, los clones Miranda/76, /78 y /83 presentan las tasas de crecimiento más altas del grupo de clones Miranda (82) y los menores valores de DNA/total por organismo (48), y resultan ser los más infectantes para cultivos de células BESM y Vero del grupo de clones Miranda, característica compartida por los clones CA-I. Esta observación se realizó durante un lapso de cuatro años durante el cual se ha mantenido a la totalidad de los clones en cultivo de células, aunque sólo se estudió en forma comparativa y cuantitativa la capacidad infectante in vitro de dos clones del grupo Miranda que se consideraron representativos, los clones Miranda/76 y Miranda/80.

Recientemente, ha podido determinarse la existencia de correlaciones entre algunos de los parámetros bioquímicos y biológicos estudiados hasta el presente en los grupos de clones CA-I y Miranda (223). Por ejemplo, se ha demostrado la existencia de una correlación entre la reactividad al anticuerpo monoclonal WIC 29.26 y el tipo isoenzimático (223,230). Los clones Miranda/76, /78 y /83 no presentan reactividad con este anticuerpo y pertenecen al grupo 1A de zimodema, mientras que los restantes 7 clones del grupo Miranda presentan zimodemas tipo 2A.

El análisis estadístico computarizado de algunas de las variables biológicas y bioquímicas estudiadas hasta el presente en un total de 66 clones, ha permitido establecer que las poblaciones de T. cruzi que presentan un bajo contenido de DNA/organismo, presentan una baja sensibilidad

a alopurinol, una alta tasa de crecimiento en medio axénico y una alta virulencia en ratones experimentalmente infectados (223). Aunque en este análisis no fue incluido el efecto de la N-acetil-glucosamina sobre la penetración, es interesante destacar la coincidencia que existe en el hecho de que el clon Miranda/83 se asemeja más al grupo de clones CA-I que al Miranda, ya que de todos los clones Miranda estudiados es el menos inhibido en su capacidad infectante por este monosacárido, a semejanza con los clones CA-I.

El Trypanosoma cruzi está compuesto en la naturaleza por poblaciones heterogéneas de parásitos. El estudio sistemático de distintos parámetros biológicos utilizando clones de T. cruzi permite no sólo obtener un espectro de esta heterogeneidad, sino que abre también la posibilidad de correlacionar distintas características biológicas que se encuentran bajo control genético del parásito, y permitirá probablemente reunir a las subpoblaciones de T. cruzi en un número discreto de grupos, e intentar correlacionar estos factores con las distintas patologías observadas en la enfermedad de Chagas.

### 3.4 Efecto de los anticuerpos monoclonales B3, D4 y MB5 sobre la capacidad de penetración de tripomastigotes de T. cruzi en células de mamífero

Se estudió el efecto de tres anticuerpos monoclonales obtenidos contra la fracción flagelar del estadio epimastigote de T. cruzi (ver 2.9.1) sobre la capacidad de penetración del tripomastigote en células de mamífero.

#### 3.4.1 Resultados del estudio del efecto de los anticuerpos monoclonales

Se expusieron células BESM a tripomastigotes del clon CA-I/71 y de la

cepa Y de T. cruzi en presencia de tres anticuerpos monoclonales en el medio de cultivo, los anticuerpos B3, D4 y MB5. Como controles se utilizaron el mismo sistema parásitos-células huésped en presencia de sobrenadante de mieloma y del anticuerpo monoclonal C4 en el medio de cultivo. El anticuerpo monoclonal C4 se obtuvo también por la tecnología de hibridomas contra la fracción flagelar del estadio epimastigote, pero posteriormente no reconoció ningún estadio de T. cruzi, motivo por el cual fue utilizado como un segundo control.

Sólo uno de los anticuerpos monoclonales, el MB5, presentó un efecto inhibitorio de la interiorización del tripomastigote en la célula huésped, que osciló entre un 34-50% para el clon CA-I/71 y un 46-52% para la cepa Y de T. cruzi. En las tablas 13 y 14 se detallan las medias del número de parásitos intracelulares por célula ( $\bar{X}_1$ ) en presencia del anticuerpo monoclonal MB5, con los correspondientes errores standard (ES), así como también los índices de penetración respectivos y los porcentajes de inhibición de la penetración para cada uno de los experimentos independientes realizados con el clon CA-I/71 y la cepa Y, respectivamente. Los porcentajes de inhibición con el anticuerpo monoclonal MB5 fueron estadísticamente significativos en todos los experimentos realizados con ambas poblaciones de T. cruzi.

En las tablas 15, 16 y 17 se detallan las medias del número de parásitos intracelulares por célula ( $\bar{X}$ ), los errores standard (ES) y los índices de penetración relativos obtenidos en presencia de los anticuerpos monoclonales B3, D4 y C4, respectivamente. Las diferencias observadas con respecto a los controles con sobrenadante de mieloma, a cuyos índices de penetración se asignó arbitrariamente el valor de 1 (ver 2.9.4), no fueron estadísticamente significativas para ninguno de los experimentos independientes realizados.

TABLA 13. EFECTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL MB5 SOBRE LA CAPACIDAD  
INFECTANTE DEL CLÓN CA-I/71 DE T. CRUZI

| Experimento | Tratamiento                            | $\bar{X}_i$          | $\bar{X} \pm ES$ | IP    | Porcentaje de inhibición |
|-------------|--|----------------------|------------------|-------|--------------------------|
| 1           | Sobrenadante<br>mieloma (con-<br>trol) | 0,41<br>0,36<br>0,32 | 0,36 $\pm$ 0,03  | 1     | -                        |
| 1           | MB5                                    | 0,16<br>0,19<br>0,20 | 0,18 $\pm$ 0,01  | 0,5   | 50%                      |
| 2           | sobr.mieloma<br>(control)              | 0,31<br>0,32<br>0,25 | 0,29 $\pm$ 0,02  | 1     | -                        |
| 2           | MB5                                    | 0,19<br>0,19<br>0,20 | 0,19 $\pm$ 0,005 | 0,655 | 34.5%                    |
| 3           | sobr.mieloma<br>(control)              | 0,21<br>0,24<br>0,28 | 0,24 $\pm$ 0,02  | 1     | -                        |
| 3           | MB5                                    | 0,10<br>0,10<br>0,16 | 0,12 $\pm$ 0,02  | 0,5   | 50%                      |

Leyendas:  $\bar{X}_i$ : Media del número de parásitos intracelulares/célula determinado en 100 células para cada preparado.

$\bar{X} \pm ES$ : Media de los  $\bar{X}_i \pm$  error standard para cada experimento independiente.

IP: Índice de penetración= E/C; siendo E:  $\bar{X}$  experimental en presencia del anticuerpo monoclonal y C:  $\bar{X}$  control en presencia de sobrenadante de mieloma.



TABLA 14. EFECTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL MB5 SOBRE LA CAPACIDAD INFECCIONANTE DE LA CEPA Y DE T. CRUZI

| Experimento | Tratamiento               | $\bar{X}_i$          | $\bar{X} \pm ES$ | IP   | Porcentaje de inhibición |
|-------------|---------------------------|----------------------|------------------|------|--------------------------|
| 1           | Sobr.mieloma<br>(control) | 0,10<br>0,16<br>0,14 | 0,13 $\pm$ 0,02  | 1    | -                        |
| 1           | MB5                       | 0,06<br>0,07<br>0,09 | 0,07 $\pm$ 0,01  | 0,54 | 46%                      |
| 2           | Sobr.mieloma<br>(control) | 0,20<br>0,20<br>0,22 | 0,21 $\pm$ 0,005 | 1    | -                        |
| 2           | MB5                       | 0,09<br>0,12<br>0,10 | 0,10 $\pm$ 0,01  | 0,48 | 52%                      |

Leyendas: Ver tabla 13

TABLA 15. EFECTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL B3 SOBRE LA CAPACIDAD INFECCIONANTE DEL CLON CA-I/71 Y DE LA CEPA Y DE T. CRUZI.

| Clon/cepa | Experimento | $\bar{X} \pm ES$ | IP   |
|-----------|-------------|------------------|------|
| CA-I/71   | 1           | 0,28 $\pm$ 0,03  | 1,16 |
| CA-I/71   | 2           | 0,3 $\pm$ 0,02   | 1,01 |
| CA-I/71   | 3           | 0,3 $\pm$ 0,01   | 0,9  |
| Y         | 1           | 0,15 $\pm$ 0,005 | 1,15 |
| Y         | 2           | 0,17 $\pm$ 0,01  | 1    |

Leyendas: ver tabla 13.

TABLA 16. EFECTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL D4 SOBRE LA CAPACIDAD INFECCIONANTE DEL CLON CA-I/71 Y DE LA CEPA Y DE T. CRUZI

| Clon/cepa | Experimento | $\bar{X} \pm ES$ | IP   |
|-----------|-------------|------------------|------|
| CA-I/71   | 1           | 0,33 $\pm$ 0,03  | 1,2  |
| CA-I/71   | 2           | 0,35 $\pm$ 0,02  | 1,2  |
| CA-I/71   | 3           | 0,30 $\pm$ 0,06  | 0,83 |
| Y         | 1           | 1,14 $\pm$ 0,02  | 1,07 |
| Y         | 2           | 0,21 $\pm$ 0,01  | 0,95 |

Leyendas: ver tabla 13.

TABLA 17. EFECTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL C4 SOBRE LA CAPACIDAD INFECCIOSA DEL CLON CA-I/71 Y DE LA CEPA Y DE T. CRUZI

| Clon/cepa | Experimento | $\bar{X} \pm ES$ | IP   |
|-----------|-------------|------------------|------|
| CA-I/71   | 1           | 0,29 $\pm$ 0,02  | 1,2  |
| CA-I/71   | 2           | 0,30 $\pm$ 0,005 | 0,93 |
| CA-I/71   | 3           | 0,30 $\pm$ 0,02  | 0,9  |
| Y         | 1           | 0,11 $\pm$ 0,01  | 0,85 |
| Y         | 2           | 0,22 $\pm$ 0,02  | 1,09 |

Leyendas: ver tabla 13.

### 3.4.3 Discusión

Los anticuerpos monoclonales han sido utilizados para la identificación y caracterización de células, estructuras, macromoléculas, etc., debido a la alta especificidad que presentan. En T. cruzi, los anticuerpos monoclonales han sido utilizados como marcadores de especie, de los distintos estadios del parásito y para el aislamiento de componentes específicos de la membrana plasmática. En este estudio, se evaluó la posibilidad de que tres anticuerpos monoclonales presentaran afinidad por glicoproteínas involucradas en el proceso de interiorización en la célula huésped, seleccionándose a tal efecto los anticuerpos B3, D4 y MB5, los cuales presentan actividad biológica con el estadio tripomastigote, según se mencionó anteriormente (ver 2.9.1). Sólo uno de estos anticuerpos monoclonales, el MB5, que reconoce tanto al

estadio amastigote como al tripomastigote, presenta actividad lítica mediada por complemento y evidencia actividad protectora en ratones posteriormente desafiados con la cepa Tulahuen de T. cruzi, presentó un efecto inhibitorio significativo sobre la infección in vitro de células de mamífero, tanto por tripomastigotes del clon CA-I/71 como de la cepa Y de T. cruzi. En esta serie de experimentos se utilizaron menores concentraciones de tripomastigotes, con el objeto de adecuar la relación parásito-anticuerpo monoclonal, sin aumentar desmedidamente la concentración de líquido ascítico en el sistema experimental para evitar posibles efectos tóxicos. La especificidad de la acción del anticuerpo monoclonal MB5 sobre la interiorización del tripomastigote fue confirmada al no observarse inhibición de la penetración con los anticuerpos monoclonales B3, D4 y C4, ni observarse efectos tóxicos de los fluidos ascíticos. Tampoco se observaron alteraciones de las células huésped por el agregado de los fluidos

ascíticos al medio de cultivo, a las concentraciones utilizadas. El agregado de sobrenadante de cultivo de mieloma y de fluidos ascíticos al medio de cultivo no produjo disminución de la motilidad, lisis, ni cambios morfológicos observables por contraste de fase en los tripomastigotes. Estas observaciones indican que la acción del anticuerpo monoclonal MB5 no se debe a efectos inespecíficos tanto del anticuerpo como del fluido ascítico, sino a un efecto directo del anticuerpo monoclonal sobre la interiorización del parásito en la célula huésped.

Por inmunoprecipitación de antígenos del parásito, marcados con iodo radioactivo, se ha determinado que el anticuerpo monoclonal MB5 reconoce una proteína de PM relativo de 85 kDa (J.Bua y E.L.Segura, comunicación personal).

Resultados similares han sido obtenidos por Colli y col. (226), quienes han desarrollado hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales que inhiben parcialmente la interiorización del parásito en la célula de mamífero y algunos de los cuales reconocen antígenos únicos presentes en la superficie celular del tripomastigote de T. cruzi.

Es interesante destacar que no existe hasta el presente una explicación que justifique la aparente contradicción de los datos aquí expuestos y los obtenidos por otros autores, con respecto al hecho de que la N-acetil-glucosamina presente una mayor capacidad de inhibición de la penetración del parásito en la célula huésped que los anticuerpos monoclonales desarrollados hasta el presente. Si los anticuerpos monoclonales son moléculas de mayor tamaño y su unión con el epítipo involucra varios carbohidratos o aminoácidos, debería alterar o bloquear la estructura del receptor en igual o mayor grado que un monosacárido, y por lo tanto su acción inhibitoria debería ser igual o mayor que la de la N-acetil-gluco-

samina. Se pueden aventurar varias hipótesis que justifiquen este fenómeno, entre ellas, que hay una baja afinidad del anticuerpo monoclonal por el epítopo debido a diferencias en la conformación cuaternaria del mismo entre los parásitos, que los anticuerpos monoclonales obtenidos reconozcan a estructuras glicolípídicas o glicoproteicas próximas a las "glicoproteínas" responsables de la interacción célula-parásito, y que el anticuerpo monoclonal tenga afinidad por la región proteica y no por la región glicosídica de la molécula, ya que la región proteica es preferencialmente inmunogénica y los anticuerpos raramente reconocen a las estructuras glicosídicas de las glicoproteínas. Esta última hipótesis es factible, ya que el anticuerpo monoclonal MB5 presenta una capacidad inhibitoria de la penetración similar en parásitos de la cepa Y y del clon CA-I/71, aunque este último no es inhibido por N-acetil-glucosamina. Es posible, entonces, que el anticuerpo monoclonal MB5 al unirse a la porción proteica de la glicoproteína altere la estructura espacial del receptor produciendo de esta manera un efecto inhibitorio.

El análisis sistemático de la superficie celular del estadio tripomastigote de distintas subpoblaciones de T. cruzi con anticuerpos monoclonales que presenten la capacidad de inhibir la interiorización del parásito y/o conferir protección, contribuirá probablemente a la comprensión del rol de los antígenos de superficie presentes en este estadio del parásito y de su importancia en el proceso infeccioso, como un paso previo para el desarrollo de una vacuna efectiva contra el Trypanosoma cruzi.

CAPITULO 4  
CONCLUSIONES



1. Las cepas de T. cruzi provienen de aislamientos no cuantificados de parásitos y pueden estar constituidas por poblaciones heterogéneas de organismos. Las características de estas cepas se evidenciarán una vez que se hayan seleccionado y estabilizado con respecto a la composición relativa de la población parasitaria, lo que dependerá de las condiciones de mantenimiento impuestas en el laboratorio. Por el contrario, los clones, al ser poblaciones genéticamente homogéneas de parásitos, están exentos de las presiones selectivas y sus características biológicas son representativas de las de subpoblaciones de parásitos presentes en el huésped.

La capacidad infectante o infectividad de una población de Trypanosoma cruzi estará mediada por la capacidad de penetración de las formas tripomastigotes en las células huésped del mamífero. La capacidad infectante es un parámetro biológico que puede determinarse cuantitativamente bajo condiciones estandarizadas in vitro. La utilización de poblaciones de T. cruzi genéticamente homogéneas (clones) ha permitido determinar que la capacidad infectante es una propiedad biológica estable y reproducible, que caracteriza a dicha población de parásitos.

2. El análisis cuantitativo de la capacidad infectante ha permitido demostrar la existencia de grandes diferencias de infectividad entre clones de T. cruzi. Se encontraron diferencias de hasta 70 veces en la capacidad infectante de los clones estudiados. Por lo tanto, T. cruzi está constituido por organismos que presentan un amplio rango de infectividad, existiendo subpoblaciones con alta, intermedia y baja capacidad infectante.

3. El hallazgo de diferencias significativas en las capacidades infectantes de clones provenientes de un mismo aislamiento, ha permitido demostrar la existencia de heterogeneidad intra-poblacional en T. cruzi con respecto a este parámetro biológico, implicando que pueden coexistir subpoblaciones de T. cruzi con distintas capacidades infectantes en un mismo huésped. Debido a que la capacidad infectante es una medida de la habilidad de una determinada población de T. cruzi para penetrar en las células huésped y desarrollar su ciclo evolutivo en el mamífero, la coexistencia de subpoblaciones de T. cruzi con distintas capacidades infectantes y el grado de heterogeneidad presente en un paciente podrían tener importantes implicancias en la presentación, el curso de la infección y la evolución de la enfermedad de Chagas.

4. En trabajos realizados por otros autores utilizando las cepas Y y CL, consideradas poblaciones polares de T. cruzi en cuanto a ciertas características biológicas, se observó que la cepa Y presenta principalmente tripomastigotes de tipo delgado, los cuales resultan ser más infectantes que los de la cepa CL, que presenta principalmente tripomastigotes anchos, postulándose que la capacidad infectante estaría relacionada con la morfología del tripomastigote.

En el curso de este trabajo se observó que los tripomastigotes de los distintos clones de T. cruzi estudiados, presentaron la morfología característica del tripomastigote ancho y, sin embargo, se evidenciaron grandes diferencias en sus capacidades infectantes, lo que implica que la capacidad infectante no estaría sólo relacionada con la morfología del tripomastigote.

5. El efecto inhibitorio del monosacárido N-acetil-D-glucosamina sobre la capacidad infectante del estadio tripomastigote, encontrado para algunas cepas de T. cruzi, no puede ser generalizado. Varios de los clones de T. cruzi estudiados no son susceptibles a la inhibición por este monosacárido, en contraposición con la alta susceptibilidad encontrada para algunos clones y cepas del parásito, lo que implica que existen diferencias intra-específicas con respecto a las glicoproteínas de membrana involucradas en la interacción con la célula huésped. Una diversidad intra-específica a este nivel fundamental tiene profundas implicancias sobre la posibilidad de interferir el proceso infeccioso, a través del bloqueo de los receptores de superficie involucrados en la penetración del parásito, como un medio para controlar la enfermedad de Chagas.

6. La interiorización de los tripomastigotes del clon CA-I/71 de T. cruzi en células de mamífero no se vio inhibida por ninguno de los monosacáridos comúnmente presentes en la superficie celular, sugiriendo que las diferencias intra-específicas observadas en los receptores involucrados en la penetración del tripomastigote del clon CA-I/71 en la célula de mamífero, no serían debidas al reemplazo de un monosacárido por otro en la región glicosídica de la glicoproteína.

7. Se estudió el efecto de tres anticuerpos monoclonales desarrollados contra la fracción flagelar del parásito sobre el proceso infeccioso. Uno de estos anticuerpos monoclonales, denominado MB5, inhibió significativa y específicamente la infección de células de vertebrado no fagocíticas, tanto por tripomastigotes de la cepa Y como del clon CA-I/71 de T. cruzi, aunque ambas poblaciones de parásitos difieren en cuanto a su

susceptibilidad al monoacárido N-acetil-D-glucosamina. La utilización sistemática de anticuerpos monoclonales que bloqueen o alteren la habilidad de los tripomastigotes para penetrar en la célula huésped, contribuirá a la indentificación y caracterización de las glicoproteínas involucradas en la interacción entre el Trypanosoma cruzi y la célula huésped.

Asimismo, la identificación de anticuerpos monoclonales que interfieran con la penetración de T. cruzi en la célula de mamífero, aporta elementos para el desarrollo de una vacuna efectiva contra la enfermedad de Chagas.

DML

Segura

## ABREVIATURAS

|       |  |
|-------|--|
| BESM  | Células de músculo esquelético y piel de feto bovino |
| BSA   | Sero albúmina bovina                                 |
| Con A | Concanavalina A                                      |
| EDTA  | Acido etilen-diamino tetracético                     |
| HBSS  | Solución salina balanceada de Hanks                  |
| IP    | Indice de penetración                                |
| PBS   | Solución salina balanceada de Dulbecco               |
| WGA   | Aglutinina de germen de trigo                        |

NOTA: Los anticuerpos monoclonales MB<sub>5</sub>, D<sub>4</sub> y B<sub>3</sub> utilizados en el curso de este trabajo de Tesis han recibido recientemente las nomenclaturas de registro internacional FCH-F8-1, FCH-F8-2 y FCH-F8-3, respectivamente.

B I B L I O G R A F I A

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 morbida do homem.  
Mem.Inst.Oswaldo Cruz, 1:159,1909
  
2. Acha, P.N. y Szyfres, B.  
Parasitic zoonoses and communicable diseases common to man and animals.  
Pan.Health Org.Publ. 354, 1980
  
3. Fifth Annual Report  
July 1980-June 1981  
Special Programme for Res.and Training in Tropical Diseases  
UNDP/World Bank/W.H.O.
  
4. Zeledón, R. y Rabinovich, J.E.  
Chagas'disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors.  
Ann.Rev.Entomol., 26:101, 1981
  
5. Segura, E.L., Pérez, A.C., Andrade, J., Yanovsky, J.F. y Martini, G.J.W.de  
Decrease in the prevalence of infection by Trypanosoma cruzi (Chagas' disease) in young men from Argentina.  
J.Protozool., 30:164, 1983
  
6. Hoare, C.A.  
The classification of mammalian trypanosomes  
Erg.Mikrobiol., 39:43, 1966

7. Wood, S.F.  
Importance of feeding and defecation times of insect vectors in transmission of Chagas'disease.  
J.Econ.Entomol., 44:52, 1951
  
8. Romãna, C.  
Acerca de un sntoma inicial de valor para el diagnstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanosica unilateral (Hipotesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad).  
Mepra, 22:16, 1935
  
9. Lugones, H.S., Ledesma, O.S., Peralta, F.A., Marteleu, A.E.A., Voza, P., Falendy, .S.Z. y Barbieri, G.  
Enfermedad de Chagas  
Anales Nestlé 132:124, 1979
  
10. Amorin, P.S., Manço, J.C., Gallo, L. y Marin-Neto, J.A.  
Clínica: Forma cronica cardíaca. pp. 265  
En: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.  
Brener, Z., Andrade, Z., eds.  
Guanabara Koogan S.A., Brasil, 1979
  
11. Chagas, C.  
Tripanosomiase Americana: forma aguda da molestia  
Mem.Inst.Oswaldo Cruz, 8(2):37, 1916



12. Andrade, Z.A. y Andrade, S.G.  
Patologia, pp. 214  
En: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.  
Brenner, Z., Andrade, Z., eds.  
Guanabara Koogan S.A., Brasil, 1979
  
13. Rezende, J.M.  
Clinica: Manifestações digestivas, pp. 312  
En: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas  
Brenner, Z., Andrade, Z., eds.  
Guanabara Koogan S.A., Brasil, 1979
  
14. Mazza, S.  
La enfermedad de Chagas en la República Argentina  
Mem.Inst.Oswaldo Cruz, 47:273, 1949
  
15. Moya, P.R. y Barousse, A.P.  
Enfermedad de Chagas Congénita, pp.51  
En: Enfermedad de Chagas  
Aportes al Programa Nac. de Inv.en Enf.Endémicas  
SECYT, 1979-1983
  
16. Cerisola, J.A., Rohwedder, R.W. y del Prado, C.E.  
Rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica humana  
utilizando ninfas de diferentes especies de Triatomíneos.  
Bol.Chil.Parasitol., 26:57, 1971

17. Vattuone, N., 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, 1973
  
18. Cerisola, J.A., Alvarez, M. y Di Rissio, A.M.  
Imunodiagnóstico da doença de Chagas. Evolução serológica de pacientes com Doença de Chagas.  
Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo, 12:403, 1970
  
19. Pinto Dias, J.C.  
Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil  
Estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982.  
Tesis, Univ.Fed. Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 1982
  
20. Brener, Z.  
General Review on Trypanosoma cruzi classification and taxonomy.  
W.H.O. Meeting on Standardization of Methods for T. cruzi Classification.  
Panamá City, January 28-31, 1985
  
21. Rosenbaum, M.B. y Cerisola, J.A.  
Epidemiología de la enfermedad de Chagas en la República Argentina.  
Hospital, 60:75, 1961
  
22. Lazzari, J.O., Elizari, M.V. y Kuschnir, E.  
Miocarditis chagásica crónica, pp. 41  
En: Enfermedad de Chagas  
Aportes al Programa Nac.de Inv.en Enf.Endémicas  
SECYT, 1979-1983

23. Alvarenga, N.J.

Evolução do Trypanosoma cruzi no trato digestivo de Triatoma infestans.

Tesis 55 p.

Univ.Fed.Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 1977

24. Brack, C.

Elektronmikroskopische untersuchungen zum lebenszyklus von Trypanosoma cruzi. Unter besonderes berucksichtigung der entwicklungsformen im ubertrager Rhodnius prolixus.

Acta Tropica, 25:289, 1968

25. Zeledón, R.

Los vectores de la Enfermedad de Chagas en América

Simp.Intern.Sobra Enf.de Chagas

Buenos Aires, Diciembre, pp. 327, 1972

26. Mazza, S.

Comprobaciones de Triatoma platensis, Eutriatoma oswaldoi, Pastronylus seaí y Psemmolestes coreodes en la provincia de Santiago del Estero, todas ellas sin infestación por T. cruzi. Otros datos sobre infestación esquizo-tripánósica natural silvestre de Triatoma infestans.

Prensa Médica Argentina, 30:1583, 1943

27. Jorg, M.E.

Límite sud de la dispersión geográfica de Triatoma infestans y su infestación por Trypanosoma cruzi en Argentina.

Primeras Jornadas Entomoepid.Argentinas, 1:157, 1959

28. Brener, Z.  
Biology of Trypanosoma cruzi  
Annual Rev.Microbiol., 27:347, 1973
29. Zeledón, R., Alvarenga, N.J., Schosinsky, K.  
Ecology of Trypanosoma cruzi  
En: The insect vector  
P.A.H.O. Scient.Publications, 347, 1977
30. Brener, Z.  
A new aspect of Trypanosoma cruzi life cycle in the invertebrate host.  
J. Protozool., 19:23, 1972
31. Zeledón, R.  
Host-parasite relationship in the vector  
Symp.on New Approaches in Am. Trypanosomiasis Res.  
P.A.H.O., 9, 1976
32. Vianna, G.  
Contribuição para o estudo da anatomia patologica da molestia de Chagas.  
Mem.Inst.Oswaldo Cruz, 3:276, 1911
33. 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.Argentina de Patol., 1:412, 1935

34. 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, 1935
35. Barreto, M.P.  
Reservorios do Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi,  
Chagas, 1909.  
Simp.Int.sobre Enf.de Chagas  
Buenos Aires, Diciembre, 357, 1972
36. Kofoid, C.A., Mc Nail, E. y Wood, F.D.  
The cycle of T. cruzi in tissue culture of embryonic heart muscle.  
Univ.Calif.Publ.Zool., 41: 23, 1935
37. Meyer, H. y De Oliveira, M.  
Cultivation of Trypanosoma cruzi in tissue cultures. A four year study.  
Parasitology, 39:91, 1948
38. Romaña, C. y Meyer, H.  
Estudo do ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi em cultura de tecidos de embrião de galinha.  
Mem.Inst.Oswaldo Cruz, 37:19, 1942
39. Dvorak, J.A.  
New in vitro approach to quantitation of Trypanosoma cruzi-vertebrate cell interaction.  
Am.Trypanosomiasis Res.Sci.Publ., 318:109, P.A.H.O., 1976

40. Dvorak, J.A. y Hyde, T.P.

Trypanosoma cruzi: Interaction with vertebrate cells in vitro. I.  
Individual interactions at the cellular and subcellular levels.  
Exp.Parasitol., 34:268, 1973

41. Dvorak, J.A. y Poore, C.M.

Trypanosoma cruzi: Interaction with vertebrate cells in vitro, IV.  
Environmental temperature effects.  
Exp.Parasitol., 36:150, 1974

42. Hyde, T.P. y Dvorak, J.A.

Trypanosoma cruzi: Interaction with vertebrate cells in vitro. II.  
Quantitative analysis of the penetration phase.  
Exp.Parasitol., 34:284, 1973

43. Engel, J.C.

Caracterización de clones de Trypanosoma cruzi: un nuevo enfoque en  
la investigación básica de la enfermedad de Chagas.  
Tesis , Universidad de Buenos Aires, 1983

44. Engel, J.C., Doyle, P.S. y Dvorak, J.A.

Trypanosoma cruzi: Biological characterization of clones derived from  
chronic chagasic patients. II. Quantitative analysis of the intracellular  
cycle.  
J.Protozool., 32(1):80, 1985

45. De Souza, W.

Cell Biology of Trypanosoma cruzi  
Intern.Rev.of Cytology, 86:197, 1984

46. Crane, M.St.J. y Dvorak, J.A.

Trypanosoma cruzi: Interaction with vertebrate cells. DNA synthesis and growth of intracellular amastigotes and their relationship to host cell DNA synthesis and growth.

J. Protozool., 26:599, 1979

47. Crane, M.St.J. y Dvorak, J.A.

Trypanosoma cruzi: Pattern of RNA synthesis following infection of vertebrate cells.

J. Protozool., 27:336, 1980

48. Dvorak, J.A., Hall, T.E., Crane, M.St.J., Engel, J.C., Mac Daniel, J.P. y Uriegas, R.

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

J. Protozool., 29:430, 1982

49. Hoare, C.A. y Wallace, F.G.

Developmental stages of trypanosomatid flagellates, a new terminology.

Nature, 212:1385, 1966

50. Foundations of Parasitology

G.D. Schmidt and L. Roberts

The C.V. Mosby Co., St. Louis, Toronto, London, 1981

51. Lanar, D.E.

Growth and differentiation of Trypanosoma cruzi cultivated with a Triatoma infestans embryo cell line.

J. Protozool., 26:457, 1979

52. Vickerman, K. y Preston, T.M.  
Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates, pp.35  
En: Biology of the Kinetoplastida.  
W.H.R. Lumsden and D.E. Evans, eds.  
Academic Press, London, Vol. 1, 1976
53. Gutteridge, W.E. y Rogerson, G.W.  
Biochemical aspects of the Biology of T. cruzi, pp. 619  
En: Biology of the Kinetoplastida  
W.H.R. Lumsden and D.A. Evans, eds.  
Academic Press, London, Vol. 2, 1979
54. Englund, P.T., Hadjuk, S.L. y Marini, J.C.  
The molecular biology of trypanosomes  
Ann.Rev.Biochem., 51: 695, 1982
55. Borst, P., Fase-Fowler, F., Hoeijmakers, J.H.J. y Frasch, A.C.C.  
Variation in maxicircle and minicircle sequences in Kinetoplast DNA  
from different Trypanosoma brucei strains.  
Bioch.Biophys.Acta, 610:197, 1980
56. Cazzulo, J.J., Blanco, A. y Stoppani, A.O.M.  
Adelantos recientes sobre bioquímica del Trypanosoma cruzi y quimiote-  
rapia de la enfermedad de Chagas.  
Enfermedad de Chagas, pp. 67  
Aportes del Prog.Nac.de Inv.en Enf.Endémicas  
SECYT, 1979-1983



57. Meirelles, M.N.L. y De Souza, W.  
Proc. Ann. Meet. Basic Res. Chagas' Disease  
Caxambú, Brasil, BI, 1980
58. Meyer, H.  
The fine structure of the flagellum and the kinetoplast-chondriome of  
Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in tissue culture.  
J. Protozool., 15: 614, 1968
59. De Souza, W. y Chiari, E.  
Fine structure of the trypomastigote form of Trypanosoma cruzi isolated  
from acellular culture by passage in column.  
Rev. Bras. Biol., 37:671, 1977
60. Milder, R.V.  
Contribuição ao conhecimento da ultraestrutura de tripanossomos.  
Tesis, Universidad de São Paulo, Brasil, 1971
61. Meeting on characterization, nomenclature and maintenance of salivarian  
Trypanosomes, London, 1976  
En: Biology of the Kinetoplastida  
W.H.R. Lumsden and D.A. Evans, eds. Ac. Press, London, Vol.2, pp.120, 1979
62. Sánchez, D.O., Frasch, A.C.C., Carrasco, A.E., González-Cappa, S.M., De  
Isola, E.D. y Stoppani, A.O.M.  
Rapid evolution of kinetoplast DNA minicircle subpopulations in Trypa-  
nosoma cruzi  
Mol. Bioch. Parasitol., 11:169, 1984

63. Macina, R.A., Sánchez, D.O., Affranchino, J.L., Engel, J.C. y Frasc, A.C.C.  
Polymorphism within minicircle sequence classes in the kinetoplast DNA of T. cruzi clones.  
Mol.Bioch.Parasitol., (en prensa)
64. Morel, C., Chiari, E., Camargo, E.P., Mattei, D.M., Romanha, A.J. y 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, 1980
65. Miles, M.A., Souza, A., Pova, M., Shaw, J.J., Lainson, R. y Toye, P.J.  
Isozymic heterogeneity of Trypanosoma cruzi in the first autochthonous patients with Chagas'disease in Amazonian Brazil.  
Nature, 272: 819, 1978
66. Montamat, E.E., Arauzo, S.S., Cazzulo, J.J., Engel, J.C., Subías, E. y Dvorak, J.A.  
Caracterización por zimogramas electroforéticos de clones de Trypanosoma cruzi de dos pacientes chagásicos.  
En: Enfermedad de Chagas  
Aportes al Prog.Nac.de Inv.en Enf.Endémicas  
SECYT, Q20, 1979-1983

67. Melo, R.C. y Brener, Z.

Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains

J.Parasitol., 64:475, 1980

68. Bice, D.E. y Zeledón, R.

Comparison of infectivity of Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909)

J. Parasitol., 56:663, 1970

69. Taliaferro, W.H. y Pizzi, T.

Connective tissue reaction in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi

J.Infect.Dis., 96:199, 1954

70. Brener, Z.

Comparative studies of different strains of Trypanosoma cruzi

Ann.Trop.Med.Parasitol., 59:19, 1965

71. Watkins, R.

Comparison of infection produced by two strains of Trypanosoma cruzi in mice.

J.Parasitol., 52:958, 1966

72. Brener, Z.

The behaviour of slender and stout forms of Trypanosoma cruzi in the blood stream of normal and immune mice.

Ann.Trop.Med.Parasitol., 63:215, 1969

73. Isola, E.L.D., Sánchez, D.O., Lammel, E.M., Katzin, A.M. y González-Cappa, S.M.  
Trypanosoma cruzi: Immunobiological studies on epimastigotes of several strains  
Rev.Arg.Microbiol., 14:147, 1982
74. González-Cappa, S.M., Katzin, A.M., Añasco, N. y Lajmanovich, S.  
Comparative studies on infectivity and surface carbohydrates of several strains of Trypanosoma cruzi  
Medicina (Bs.As.) 41:549, 1981
75. Chiari, E.  
Growth and differentiation of Trypanosoma cruzi culture forms kept in laboratory for different periods of time  
Rev.Inv.Med.Trop.Sao Paulo, 16:81, 1974
76. Segura, E.L., Engel, J.C., Katzin, V.J., Subías, E., de Isola, E.D., Esteva, M., Lammel, E., Di Rissio, A.M. y González-Cappa, S.M.  
Variación de la capacidad infectante de formas de cultivo de Trypanosoma cruzi.  
Medicina (Bs.As.), 40:256, 1980
77. von Brandt, T., Johnson Tobie, E., Kissling, R.E. y Adams, G.  
Physiological and pathological observations on four strains of T. cruzi  
J.Infect.Dis., 82:3, 1949

78. Goeble, F.C.

Studies on experimental Chagas' disease in mice in relation to  
chemotherapeutic testing.

J.of Parasitol., 37:408, 1951

79. Luban, N.A. y Dvorak, J.A.

Trypanosoma cruzi: Interaction with vertebrate cells in vitro. III.

Selection for biological characteristics following intracellular passage.

Exp. Parasitol., 36:143, 1974

80. Romanha, A.J., Da Silva Pereira, A.A., Chiari, E. y Kilgour, V.

Isoenzyme patterns of cultured Trypanosoma cruzi: changes after prolonged  
subculture.

Comp.Biochem.Physiol., 62:139, 1979

81. Lambrecht, F.L.

Biological variations in trypanosomes and their relation to the  
epidemiology of Chagas' disease.

Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo, 7:346, 1965

82. Engel, J.C., Dvorak, J.A., Segura, E.L. y St.J.Crane, M.

Trypanosoma cruzi: Biological characterization of 19 clones derived from  
two chronic chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium.

J.Protozool., 29:555, 1982

83. Bongertz, V. y Dvorak, J.A.

Trypanosoma cruzi: antigenic analysis of cloned stocks.

Am.J.Trop.Med.Hyg., 32:716, 1983

84. Postan, M., Dvorak, J.A. y Mac Daniel, J.P.  
Studies of Trypanosoma cruzi clones in inbred mice; I. A comparison of the course of infection of C3H/Hen<sup>-</sup> mice with two clones isolated from a common source.  
Am.J.Trop.Med.Hyg., 32:497, 1983
85. Kirchhoff, L.V., Engel, J.C., Dvorak, J.A., Sher, A.  
Strains and clones of Trypanosoma cruzi differ in their expression of surface antigen identified by a monoclonal antibody.  
Mol.Bioch.Parasitol., 11:81, 1984
86. Perlowagora-Szumlewics, A.P.  
Laboratory colonies of Triatominae. Biology and population dynamics.  
En: New approaches in American Trypanosomiasis Research  
P.A.H.O., Sc.Publications, 318:63, 1976
87. Pizzi, T.  
Inmunología de la Enfermedad de Chagas.  
Monografía Biológica, 71:39  
Univ.de Santiago, Chile, 1957
88. Trischmann, T.M. y Bloom, B.R.  
Genetics of murine resistance to Trypanosoma cruzi.  
Infect.Immunol., 35:546, 1982
89. Laguens, R.P., Cabeza Meckert, P., Basombrío, M.A., Chambó, G.J., Cossib, P.M., Arana, R.M. y Gelpi, R.  
Infección crónica del ratón con Trypanosoma cruzi. Modelo experimental de la Enfermedad de Chagas  
Medicina , 40 (Supl.1):33, 1980

90. Bijovsky, A.T., Elizari, M.V., Muller, L.A., Katzin, V.J. y González-Cappa, S.M.  
Chronic infection in mice with Trypanosoma cruzi.  
Rev.Inst.Med.Trop. Sao Paulo, 2:207, 1983
91. Subías, E., Riarte, A., Montoro, L., Quintana, C. y Segura, E.L.  
Enfermedad de Chagas experimental: estudio parasitológico y anatómo-patológico en hamster.  
Cong.Arg.de Protozool.y Reunión sobre Enf.de Chagas  
Huerta Grande, Córdoba, M2, 1984
92. Dvorak, J.A. y Stotler, W.A.  
Controlled-environment culture system system for high resolution light microscopy.  
Exp.Cell Res., 68:144, 1971
93. Gutteridge, W.E., Cover, B. y 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, 1978
94. Carvalho, R.M.G., Meirelles, M.N.L., de Souza, W. y León, W.  
Isolation of the intracellular stage of Trypanosoma cruzi and its interaction with mouse macrophages in vitro.  
Inf.Immunol., 33:546, 1981

95. Gutteridge, W.E. y Gaborak, M.  
A re-examination of purine and pyrimidine synthetase in the three main forms of Trypanosoma cruzi  
Int.J.Bioch., 10:415, 1959
96. Araujo, F.G. y Remington, J.S.  
Characterization of stages and strains of Trypanosoma cruzi by analysis of cell membrane components.  
J.of Immunol., 127:855, 1981
97. Brener, Z. y Chiari, E.  
Aspects of early growth of different Trypanosoma cruzi strains in culture medium.  
J.Parasitol., 51:922, 1965
98. Pan, S.C.  
Cultivation of the leishmaniform stage of Trypanosoma cruzi in cell-free media at different temperatures.  
Am.J. of Trop.Med.Hyg., 17:823, 1968
99. Camargo, E.P.  
Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media.  
Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo, 6:93, 1964
100. Crane, M.St.J. y Dvorak, J.A.  
Trypanosoma cruzi: spontaneous transformation by a Y strain variant in liquid medium.  
Exp.Parasitol., 54:87, 1982



101. Chiari, E.  
Diferenciação do Trypanosoma cruzi em cultura.  
Tesis, Univ. de Minas Gerais, Brasil, 1981
102. Neva, F.A., Malone, M.F., Myers, B.R.  
Factors influencing the intracellular growth of T. cruzi in vitro.  
Am.J.Trop.Hyg. 10: 140, 1951
103. Chiari, E., De Souza, W., Romanha, A.J., Chiari, C.A. y Brener, Z.  
Concanavalin A receptors on the cell membrane of Trypanosoma cruzi.  
Acta Tropica 35:113, 1978
104. Szarfman, A., Queiroz, T. y De Souza, W.  
Mobility of Concanavalin A receptors in Trypanosoma cruzi  
J.Parasitol., 66:1055, 1980
105. Araujo, F.G., Handman, E. y Remington, J.S.  
Binding of lectins to the cell surface of Trypanosoma cruzi  
J.Protozool., 27:397, 1980
106. Katzin, A.M. y Colli, W.  
Lectin receptors in Trypanosoma cruzi. An N-acetyl-D-glucosamine  
containing surface glycoprotein specific for the surface of the  
trypomastigote stage.  
Bibch.Biophys.Acta, 727:403, 1983
107. Pereira, M.E.A., Loures, M.A., Villalta, F. y Andrade, A.F.P.  
Lectin receptors as markers for Trypanosoma cruzi.  
J.Exp.Med., 152:1375, 1980

108. González-Cappa, S.M. y Katzin, A.M.  
Trypanosoma cruzi: lectin interaction analysis  
W.H.O. Meeting on Standardization of Methods for T. cruzi classification.  
Panamá City, January 28-31, 1985
109. Martínez Palomo, A., De Souza, W. y González Robles, A.  
Topographical differences in the distribution of surface coat components  
and intramembrane particles. A cytochemical and freeze-fracture study  
in culture forms of Trypanosoma cruzi.  
J.Cell.Biol., 69:507, 1976
110. De Souza, W., Martínez Palomo, A. y González Robles, A.  
The cell surface of Trypanosoma cruzi cytochemistry and freeze fracture.  
J.Cell Sci., 33:285, 1978
111. Jain, M.K.  
Proteins in lipid bilayers  
En: Introduction to biological membranes.  
Jain, M.K. and Wagner, R.C.  
J.Wiley and sons, eds., 1980
112. Nicolson, G.L.  
Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells, I.  
Cytoplasmic influence over cell surface components.  
Bioch.Biophys.Acta, 457:57, 1976
113. Schmuñis, G.A., Szarfman, A., Lagenbach, T. y De Souza, W.  
Induction of capping in blood-stage trypomastigotes of Trypanosoma

cruzi by human anti-Trypanosoma cruzi antibodies.

Inf.Immun., 20:567, 1978

114. Schimúñis, G.A., Szarfman, A., De Souza, W. y Lagenbach, T.

Trypanosoma cruzi: antibody-induced mobility of surface antigens.

Exp.Parasitol., 50:90, 1980

115. De Souza, W. y Meyer, H.

An electron microscopic and cytochemical study of the cell coat of Trypanosoma cruzi in tissue cultures.

Z.Parasitenkd., 46:179, 1975

116. Colli, W., Andrews, N.W. y Zingales, B.

Surface determinants in American trypanosomes.

Int.Cell Biology, 1980-1981, pp. 401

2nd Int.Congr.Cell Biol., Berlin, West, August 31-Sept.5, 1980

H.G. Schweiger, ed.

117. Lederkremer, R.M., Alves, M.J.M., Fonseca, G.C. y Colli, W.

A lipopeptidophosphoglycan from Trypanosoma cruzi (epimastigotes).

Isolation, purification and carbohydrate composition.

Bioch.Bioph.Acta, 444:85, 1976

118. Lederkremer, R.M., Casal, O.L., Alves, M.J. y Colli, W.

Evidence for the presence of D-galactofuranose in the lipopeptido phosphoglycan from Trypanosoma cruzi. Modification and tritium labeling.

FEBS Lett., Jul.11, 116(1):25, 1980

119. Zingales, B., Abuin, G., Romanha, A.J., Chiari, E. y Colli, W.  
Surface antigens of stocks and clones of T. cruzi isolated from humans.  
Acta Tropica 41(1): 5, 1984
120. Gonçalves, J.M. y Yamaha, T.  
Immunochemical polysaccharides from T. cruzi  
Am.J.Trop.Med.Hyg., 72:39, 1969
121. Gotlieb, M.  
A carbohydrate-containing antigen from T. cruzi and its detection in  
the circulation of infected mice.  
J. Immunol. 119:465, 1977
122. Mendoça Previato, L., Corin, P.A.J. y Previato, J.O.  
Proc. Ann. Meet. Basic Res. Chagas' Dis.  
Caxambu, Brasil, pp. 97, 1982
123. Scharfstein, J., Rodrigues, M.M., Alvea, C.A., De Souza, W. y  
Mendoça Previato, L.  
Proc. Ann. Meet. Basic Res. Chagas' Dis.  
Caxambu, Brasil, pp. 161, 1982
124. Camargo, E.P., Barbieri, C.L. y Jankevicius, J.V.  
Possible artifacts in the radioiodinization of surface proteins in  
trypanosomatids.  
J. Immun. Methods, 52:245, 1982

125. Snary, D. y Hudson, L.  
Trypanosoma cruzi cell surface proteins. Identification of one major glycoprotein.  
FEBS Lett. 100:166, 1979
126. Scott, M.T. y Snary, D.  
Proc. Ann. Meet. Basic Res. Chagas' Disease  
Caxambu, Brasil, pp. 161, 1982
127. Zingales, B., Carniel, C., Abrahamson, P.A. y Colli, W.  
Purification of an adenylyl cyclase-containing plasma membrane fraction from Trypanosoma cruzi  
Bioch. Bioph. Acta, 550(2):233, 1979
128. Nogueira, N., Chaplan, S., Tydings, J.D., Unkelless, J. y Cohn, Z.  
Trypanosoma cruzi: surface antigens of blood and culture forms.  
J. Exp. Med., 152:529, 1981
129. Nogueira, N., Chaplan, S. y Cohn, Z.  
Trypanosoma cruzi: factors modifying ingestion and fate of blood form trypomastigotes.  
J. Exp. Med. 132:447, 1980
130. Zingales, B., Andrews, N.H., Kusajima, V.Y. y Colli, W.  
Cell surface antigens of T. cruzi: Possible correlation with the interiorization process in mammalian cells.  
Molec. and Bioch. Parasitol., 6:111, 1982

131. Katzin, A.M., Arruda, M.V. y Colli, W.  
Proc. Ann. Meet. Basic Res. Chagas' Dis.  
Caxambu, Brasil, pp. 94, 1982
132. Andrews, N.W., Katzin, A.M. y Colli, W.  
Mapping of surface glycoproteins of Trypanosoma cruzi by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity.  
European J. Biochem. 140(3):599, 1984
133. Yoshida, N.  
Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi  
Infection and Immunity, May 5:836, 1983
134. Parodi, A.J. y Cazzulo, J.J.  
Protein glycosilation in Trypanosoma cruzi. II. Partial characterization of protein bound oligosaccharides labeled in vivo.  
J. Biol. Chem., 257:7641, 1982
135. Parodi, A.J., Lederkremer, G.Z. y Mendelzon, D.H.  
Protein glycosilation in Trypanosoma cruzi. The mechanism of glycosilation and structure of protein bound oligosaccharides.  
J. Biol. Chem., 258:5589, 1983
136. Engel, J.C. y Parodi, A.J.  
Trypanosoma cruzi cells undergo alteration in protein glycosilation upon differentiation.  
J. Biol. Chem., (en prensa), 1985

137. Herbert, W.J. y Parrat, D.  
Virulence of Trypanosomes in the vertebrate host. pp.481  
En: Biology of the Kinetoplastida  
W.H.R. Lumsden and D.A. Evans, eds.  
Academic Press, Vol.2, 1979
138. Hauschka, T.S.  
Sex of host as factor in Chagas' disease.  
J.of Parasitol., 33:399, 1947
139. Trischman, T.M., Tanowitz, H., Wittner, M. y Bloom, B.  
Trypanosoma cruzi: Role of the immune response in the natural resistance  
of inbred strains of mice.  
Exp.Parasitol., 45:160, 1978
140. Pizzi, T., Agosin, M., Christen, R., Hoecker, G. y Neghme, A.  
Estudios sobre inmuobiología de las enfermedades parasitarias. I.  
Influencia de la constitución genética de las lauchas a la infección  
experimental por T. cruzi.  
Bol.Inf.Parasitol.Chilena, 4:48, 1949
141. Kuhn, R.  
Immunology of Trypanosoma cruzi infections  
En: Parasitic Diseases  
J.M. Mansfield, ed.  
New York, Vol. 1:138, 1981

142. Schmuñis, G.A., González-Cappa, S.M., Yanovsky, J.F., Traversa, O.C.  
Effect of immunodepression due to neonatal thymectomy on infection with T. cruzi in mice.  
Trans.Roy.Soc.Trop.Hyg., 65:89, 1981
143. Segura, E.L., Esteva, M., Quintans, C.J., Montoro, L.S. y Weissenbacher, M.C.  
Infección con Trypanosoma cruzi en ratones congénitamente atímicos.  
Medicina (Bs.As.) 41:328, 1981
144. Kierszenbaum, F. y Pienkowski, M.M.  
Thymus-dependent control of host defence mechanisms against T. cruzi infection.  
Infect.Immun. 24:117, 1979
145. James, S.L., Kipnis, T.L., Sher, A. y Hoff, R.  
Enhanced resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice treated with an interferon inducer.  
Infection and Immunity, 35(2):588, 1982
146. Kierszenbaum, F. y Sonenfeld, G.  
 $\beta$ -Interferon inhibits cell infection by Trypanosoma cruzi.  
J.Immunol., 132(2):905, 1984
147. Laguens, R., Cabeza Meckert, P., Chambó, G. y Gelpi, R.  
Chronic Chagas' disease in the mouse. IV. Effect of trypanocidal drugs.  
Medicina (Bs.As.) 43: 126, 1983



148. Taratuto, A.L., Yanovsky, J.F., Schmuñis, G.S., Traversa, O.C.,  
González-Cappa, S.M. y Parodi, A.S.  
Histopathology in Rockland mice immunized against American Trypanosomiasis  
(Chagas' disease).  
Am.J.Trop.Med.Hyg., 17:716, 1968
149. Bijovsky, A.T., Elizari, M.V., Muller, L.A., Katzin, V.J. y González-  
Cappa, S.M.  
Chronic infection in mice with Trypanosoma cruzi  
Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo, 25:207, 1983
150. Bertelli, M.S.M. y Brenner, Z.  
Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of  
Trypanosoma cruzi.  
J.Parasitol., 66(6):992, 1980
151. González-Cappa, S.M. y Kagan, L.G.  
Agar gel immunoelectrophoretic analysis of several strains of Trypanosoma  
cruzi.  
Exp.Parasitol., 25:50, 1969
152. Teixeira, A.R.L., Teixeira, L. y Santos-Buch, C.A.  
The immunobiology of experimental Chagas' disease. IV. Production of  
lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man.  
Am.J. on Pathology, 80:163, 1975

153. Segura, E.L., Cabeza Meckert, P., Esteva, M., Galpi, R., Campanini, A.R., Subías, E. y Laguens, R.P.  
Acción de las fracciones subcelulares de Trypanosoma cruzi sobre la enfermedad de Chagas crónica en el ratón. I. Inducción de cardiopatía en ausencia de infección.  
Medicina (Bs.As.), 40:807, 1980
154. Silva, L.H.P. y Nussenzweig, V.  
Sobre una cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco.  
Folia Clinica et Biologica, 20:191, 1953
155. Chiari, E.  
Infectivity of T. cruzi metacyclic trypomastigotes from cultures kept in laboratory for different periods of time.  
Rev Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 16(2):61, 1974
156. Corsini, A.C., Costa, M.G., Oliveira, O.L.P., Camargo, J.B. y Stelini, A.J.  
Susceptibility of inbred mice to Trypanosoma cruzi Y strain.  
Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 22:192, 1982
157. Nota, N.R., Nejamkis, M.R. y Giovannello, O.A.  
Bases de Inmunología  
López Libreros, eds., pp.53, 1981
158. De Titto, E., Moreno, M., Lansetti, J.C., Lazzari, J., Segura, E.L. y Braun, M.

Correlación entre respuestas inmunes humorales y celulares contra antígenos de T.cruzi en un grupo de enfermos chagásicos crónicos.

En: Enfermedad de Chagas

Aportes al Prog.Nac.de Inv.en Enf.Endém.

SECYT, 1979-1983, I15.

159. Bracco, M.M.E. de, Braun, M., Cima, E.V.de, Cossio, P.M., González-Cappa, S.M., Laguens, R.M. y Segura, E.L.

Trypanosoma cruzi y respuesta inmune en la enfermedad de Chagas.

En: Enf. de Chagas

Aportes al Prog.Nac. de Inv. en Enf.Endémicas

SECYT, 1979-1983, pp.5

160. González-Cappa, S.M., Pesce, U.J., Cantarella, A.I. y Schmuñis, G.A.

Trypanosoma cruzi: Protection of mice with epimastigote antigens from immunologically different parasite strains.

Exp.Parasitol., 35:179, 1974

161. Segura, E.L., Vázquez, C., Bronzina, A., Campos, J.M., Cerisola, J.A. y González-Cappa, S.M.

Antigens of the subcellular fractions of T. cruzi: Flagellar and membrane fraction.

J.Protozool., 24:540, 1977

162. Segura, E.L., Paulone, I., González-Cappa, S.M.

Experimental Chagas' disease: Protective activity in relation with subcellular fractions of the parasite.

J.Parasitol., 62:131, 1976

163. Ruiz, A.M. y Segura, E.L.

Immunopotenciación y conservación de la fracción flagelar de Trypanosoma cruzi

En: Enfermedad de Chagas. Aportes al Prog.Nac.de Inv.en Enf. Endém.  
SECYT, 1979-1983, 148.

164. Nogueira, N., Bianco, C. y Cohn, Z.

Studies on the selective lysis and purification of Trypanosoma cruzi.  
J.Exp.Med., 142:224, 1975

165. Krettli, A.U.

Efeito de anticorpos e do complemento sobre tripomastigotas sanguíneos  
de camundongos infectados com Trypanosoma cruzi.  
Tesis, Univ.Fed. de Minas Gerais, Brasil, 1978

166. Krettli, A.U. y Brener, Z.

Protective effects of specific antibodies  
in Trypanosoma cruzi infections.  
J.Immunol., 116:755, 1976

167. Budzko, D.B., Pizzimenti, M.C. y Kierszenbaum, F.

Effect of complement depletion in experimental Chagas'disease: immune  
lysis of virulent blood forms of T. cruzi.  
Infect.Immunol., 11:86, 1975

168. Krettli, A.U. y Eisen, H.  
Proc. Ann. Meet. Basic Res. Chagas' Dis.  
Caxambu, Brasil, 158, 1980
169. Krettli, A.U. y Brener, Z.  
Resistance against T. cruzi associated to anti-living trypomastigote antibodies.  
J. Immunol., 128, 2009, 1982
170. Krettli, A.U., Gançado, J.R. y Brener, Z.  
Congreso Argentino de Protozool. y Reunión sobre Enf. de Chagas.  
Huerta Grande, Córdoba, MR 6a, 1984.
171. Kohler, G. y Milstein, C.  
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.  
Nature 256:495, 1975
172. Torruella, M.  
Adenil ciclasas de eucariontes inferiores: anticuerpos monoclonales.  
Tesis, Univ. de Buenos Aires, 1984
173. Littlefield, J.W.  
Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants.  
Science 145:709, 1964

174. Snary, D., Ferguson, M., Scott, M.T. y Allen, A.K.  
Cell surface antigens of Trypanosoma cruzi: use of monoclonal antibodies  
to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein.  
Molec.Biochem.Parasitology, 3:343, 1981
175. Araujo, F.G., Sharma, S.D., Tsai, V., Cox, P. y Remington, J.S.  
Monoclonal antibodies to stages of Trypanosoma cruzi: characterization  
and use for antigen detection.  
Infect.Immun., 37:344, 1982
176. Colli, W.  
Trypanosoma cruzi: parasite-host cell interaction.  
Symposium 91  
IV Congreso Panamericano de Bioquímica  
Buenos Aires, Noviembre, 1984
177. Weir, D.M.  
Surface carbohydrates and lectins in cellular recognition.  
Immunol.Today, 1:45, 1980.
178. Berger, E.G., Buddecke, E., Kamerling, J.P., Kobata, A., Paulson, J.C.,  
Vliegenthart, J.F.G.  
Structure, biosynthesis and functions of glycoprotein glycans.  
Experientia, 38(10):1129, 1982
179. Sharon, N. y Lis, H.  
Lectins. Cell agglutination and sugar specific proteins.  
Science, 177:949, 1972

180. Dvorak, J.A. y Howe, C.L.  
The attraction of Trypanosoma cruzi to vertebrate cells: in vitro.  
J. Protozool., 23(4):534, 1976
181. Piras, R., Piras, M.M. y Henríquez, D.  
Trypanosoma cruzi-fibroblastic cell interaction necessary for cellular  
invasion.  
Ciba Symposium:31, 1983
182. Andrews, N.W. y Colli, W.  
Adhesion and interiorization of Trypanosoma cruzi in mammalian cells.  
J. Protozoology, 29:264, 1982
183. Henríquez, D., Piras, R. y Piras, M.M.  
The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on  
the entry process of Trypanosoma cruzi trypomastigotes.  
Molec. Bioch. Parasitol., 2:359, 1981
184. Dvorak, J.A. y Crane, M.St.J.  
Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites.  
Science, 214:1034, 1981
185. Meirelles, M.N.L., de Araujo Jorge, T.C., y De Souza, W.  
Interaction of Trypanosoma cruzi with macrophages in vitro: Dissociation  
of the attachment and internalization phases by low temperature and  
cytochalasin B.  
Z. Parasitenk., 68:7, 1982

186. Hughes, R.C.

Membrane glycoproteins. A review of structure and function.

En: Membrane glycoproteins

Hughes, R.C., ed.

Butterworths, London-Boston, pp. 269, 1976

187. Ouassi, M.A., Afchain, D., Capron, A. y Grimaud, J.A.

Fibronectin receptors on Trypanosoma cruzi trypomastigotes and their biological function.

Nature, 308(March):380, 1984

188. Piras, M.M., Piras, R. y Henríquez, D.

Changes in morphology and infectivity of cell-culture derived trypomastigotes of Trypanosoma cruzi.

Molec.Bioch.Parasitol., 6:67, 1982

189. Meirelles, M.N.L., Chiari, E. y De Souza, W.

Interaction of bloodstream, tissue culture derived and axenic culture derived trypomastigotes of Trypanosoma cruzi with macrophages.

Acta Tropica 39:195, 1982

190. Katzin, A.M., Lajmanovich, S. y González-Cappa, S.M.

Comparative stability of epimastigotes and trypomastigotes in different wash solutions.

J.Parasitol., 63:925, 1977



191. Piras, M.M., Piras, R. y Henríquez, D.  
Studies on the in vitro interaction Trypanosoma cruzi-fibroblastic cells.  
Symposium 93  
IV Congreso Panamericano de Bioquímica, Buenos Aires, Noviembre, 1984.
192. Zingales, B., Arruda, M.V. y Colli, W.  
Antibodies against isolated Trypanosoma cruzi antigens inhibit parasite  
interiorization in mammalian cells.  
IV Congreso Panamericano de Bioquímica, Buenos Aires, Noviembre, 1984
193. Villalta, F. y Kierszenbaum, F.  
Role of cell surface mannose residues in host cell invasion by T. cruzi.  
Bioch. et Biophys. Acta, 736(1):39, 1983
194. Lima, M.F. y Kierszenbaum, F.  
Biochemical requirements for intracellular invasion by Trypanosoma cruzi:  
Protein synthesis.  
J. Protozool., 29(4): 560, 1982
195. Crane, M.St.J. y Dvorak, J.A.  
Influence of monosaccharides on the infection of vertebrate cells by  
Trypanosoma cruzi and Toxoplasma gondii.  
Mol. Bioch. Parasitology, 5:333, 1982
196. Andrews, N.W. y Colli, W.  
Interiorization of T. cruzi in cultured mammalian cells. Inhibition by  
N-acetyl-D-glucosamine.  
Eighth Annual Meeting on Basis Res. on Chagas' Disease.  
Caxambu, Brasil, Abst. 104, 1981

197. Andrews, N.W., Zingales, B., Katzin, A.M, Kuwajima, V.J. y Colli, W.  
IX Ann.Meet.on Basic Res. on Chagas'Disease.  
Caxambu, Brasil, Abst. 91, 1982
198. Piras, M.M., Henríquez, D. y Piras, R.  
Transformación in vitro de tripomastigotes de Trypanosoma cruzi en  
amastigotes extracelulares: cambios en la infectividad y efecto de la  
inhibición de la síntesis de proteínas.  
Acta Científica Venezolana, 31(1):197, 1981
199. Ofek, I., Mirelman, D. y Sharon, N.  
Adherence of Escherichia coli to human mucosal cells mediated by mannose  
receptors.  
Nature, 265:623, 1977
200. Sharon, N.  
Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants  
in phagocytosis.  
Immunology Today, 5:143, 1984
201. Diaz, E.  
Estudios sobre of Schizotrypanum cruzi  
Mem.Inst.O. Cruz, 28:1, 1935
202. Tanowitz, H., Wittner, M., Kress, Y. y Bloom, B.  
Studies of the in vitro infection by Trypanosoma cruzi. Ultraestructural

studies on the invasion of macrophages and L-cells.

The Am.J.of Trop.Med.& Hyg., 24(1):25, 1975

203. Dvorak, J.A. y Schmuñis, G.A.

Trypanosoma cruzi: Interaction with mouse peritoneal macrophages.

Exp.Parasitol., 32:289, 1972

204. Alcántara, A. y Brener, Z.

The in vitro interaction of Trypanosoma cruzi blood stream forms and mouse peritoneal macrophages.

Acta Tropica, 35:209, 1978

205. Bone, G.J. y Steinert, M.

Isotopes incorporated in the nucleic acids of Trypanosoma cruzi.

Nature, 178:308, 1956

206. González-Cappa, S.M., Chiale, P., del Prado, C.E., Katzin, A.M., de Martini, G.W., de Isola, E.D., Orrego, L.A. y Sagura, E.L.

Aislamiento de una cepa de Trypanosoma cruzi de un paciente con microcardiopatía chagásica crónica y su caracterización biológica.

Medicina, 40:63, 1980

207. van Meirvenne, N., Janssens, P.G. y 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, 1975

208. White, G.F.  
Production of sterile maggots for surgical use (Abat.)  
J.Parasitol., 18:133, 1932
209. Moore, E., Gerner, R. y Franklin, A.  
Culture of normal human leukocytes.  
J.Am.Med.Assoc., 199:519, 1967
210. Statistical Methods for Research Workers,  
Fisher, R.A.  
Oliver and Boyd, eds.  
Edinburg, 1934
211. Morel, C.M.  
Genes and Antigens of Parasites.  
C.M. Morel, ed.  
Fundacao Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, 1983
212. Campanini, A.R., Subías, E., Esteva, M., Ruiz, A.M. y Segura, E.L.  
Anticuerpos monoclonales contra Trypanosoma cruzi.  
Cong.Argentino de Protozoología y Reunión sobre Enf.de Chagas.  
Huerta Grande, Córdoba, MR. 9a, 1984
213. Campanini, A.R., Subías, E., Ruiz, A.M., Esteva, M., Cazzulo, J.J. y  
Segura, E.L.  
Anticuerpos monoclonales contra T. cruzi.  
En: Enfermedad de Chagas  
Ap. al Prog.Nac.de Inv.en Enf.Endémicas  
SECYT, I50, 1979-1983

214. Gerez de Burgos, N.M., Burgos, C., Blanco, A., Paulone, I. y Segura, E.L.  
Actividad  $\alpha$ -hidroxiácido dehidrogenasa en Trypanosoma cruzi.  
Acta Physiol.Latinoam., 26:10, 1976
215. Kennet, R.H., Mc Kearn, T.J. y Betchtol, K.B., eds.  
Monoclonal antibodies  
Plenum Press, New York, pp. 374, 1980
216. Biology Data Book  
P.L. Altman and D.S. Dittmer, eds.  
Federation of Am.Soc.for Exp. Biology, pp.531, 1964
217. Plata, F., García Pons, F., Eisen, H.  
Antigenic polymorphism of Trypanosoma cruzi: clonal analysis of  
trypomastigote surface antigens.  
J.Immunology, 14:392, 1984
218. Schlemper, B.R., Avila, C.M., Coura, J.R. y Brener, Z.  
Course of infection and histopathological lesions in mice infected with  
seventeen Trypanosoma cruzi strains isolated from chronic chagasic patients.  
Rev.Soc.Bras.Med.Trop., 16:23, 1983
219. Schlemper, B.R.  
Tesis; Universidad Federal do Rio de Janeiro, pp.130, 1982
220. Scientific Working Group on Chagas' Disease. 1979.  
UNDP/World Bank/W.H.O. Special Programme for Research and Training in  
Tropical Diseases, TDR/IMMCHA-SWG (2)/79.3.

221. Dvorak, J.A.  
The natural heterogeneity of Trypanosoma cruzi: Biological and medical implications.  
J.of Cellular Biochemistry, 24:357, 1984
222. Dean, M.P., Kloetzel, P.J. y Milder, R.  
Polymorphism of Trypanosoma cruzi  
Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo, 18:145, 1976
223. Dvorak, J.A.  
Single-cell isolates of Trypanosoma cruzi: How and why?  
W.H.O., Meeting on Standarization of Methods for T. cruzi classification,  
Panamá City, January 28-31, 1985
224. Meirelles, M.N.L., de Araujo Jorge, T.C. y De Souza, W.  
Interaction of epimastigote and tripomastigote forms of Trypanosoma cruzi with chicken macrophages in vitro.  
Parasitology, 81:373, 1980
225. de Araujo Jorge, T.C., y De Souza, W.  
Efeito de carboidratos na interação entre Trypanosoma cruzi e macrofagos.  
IX Reunião Ann.Pesq.Basica em Doença de Chagas.  
Caxambu, Brasil, 1982
226. Colli, W., Katzin, A.M., Andrews, M.W., Kuwajima, V.Y., Gonçalves, M.F.,  
Abuin, G., Alves, J.M. y Zingales, B.  
Perspectives of vaccination against Chagas' Disease through biotechnology

I. Definition of relevant antigens possibly involved in parasite-host cell interactions.

En: New Approaches to Vaccine Development.

G.L. Ada and G. Torrigiani, eds.

Proceedings of an International Symposium, W.H.O., 1983

227. Wagner, R.C.

Membrane carbohydrates.

En: Introduction to Biological Membranes

Jain, M.K. and Wagner, R.C.

J. Wiley and sons, eds., pp. 343-359, 1980.

228. Krettli, A.U., Weisz-Carrington, P. y Nussenzweig, R.S.

Membrane bound antibodies to blood stream Trypanosoma cruzi in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis.

Clin.Exp.Immunol., 37:416, 1979

229. Goldenberg, S., Contreras, V.T., Salles, J.M.

Franco, M.P., Bonaldo, M.C., Valle, D., Gonçalves, A.M. y Morel, C.M.

Perspectives for vaccination against Chagas'disease through biotechnology.

En: New Approaches to vaccine development.

R. Bell and G. Torrigiani, eds., 1983

230. Miles, M.

Isoenzyme characterization

W.H.O. Meeting on Standarization of Methods for T. cruzi classification.

Panamá City, January 28-31, 1985

