

24, 26



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

**AISLAMIENTO DE LAS DIFERENTES FASES
EXTRACELULARES DEL CICLO VITAL DE T. CRUZI.**

T E S I S

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ESAU MARTINEZ ROMAN

México, D. F.

Octubre de 1988

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCION.....	1
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	11
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
IV. OBJETIVOS.....	14
V. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	15
VI. MATERIAL Y METODOS.....	16
VII. RESULTADOS.....	26
VIII. DISCUSION.....	30
IX. CONCLUSIONES.....	34
X. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES.....	35
XI. BIBLIOGRAFIA.....	36
XII. APENDICE.....	40

I. INTRODUCCION.

I.1) Antecedentes del T. cruzi.

La enfermedad de Chagas se considera exclusivamente del continente americano, afectando a la mayoría de los países a excepción de Canadá, Surinam y Guyana. En sí, su distribución comprende desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el norte de Argentina y recae principalmente sobre poblaciones rurales que habitan en viviendas de construcción deficiente. (21)

La trascendencia de esta enfermedad radica en que su agente etiológico, T. cruzi, transmitido por triatomíneos, invade el corazón y otras vísceras de los huéspedes causando cuadros clínicos graves que con frecuencia conducen a la muerte. El padecimiento es de alta prevalencia en América, existiendo al menos 20 millones de personas infectadas. (18) En México se puede considerar a la enfermedad de Chagas como una endemia existiendo zonas geográficas en que la parasitosis es un problema de Salud Pública. (23,25)

La enfermedad como tal se conoce en México desde 1940 cuando Mezzotiti reportó por vez primera dos casos humanos procedentes de Teojomulco, Oaxaca. (23) A partir de entonces varios investigadores han trabajado sobre éste padecimiento realizando diversos estudios encaminados a conocer la distribución e importancia de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. (24)

Varios investigadores han tratado de sislar las diferentes fases extracelulares del ciclo vital de T. cruzi, Lanham fué uno de los primeros en tratar de separar tripomastigotes sanguíneos a partir de

sangre de mamíferos infectada, utilizando intercambiadores celulosi-
cos de iones, obteniendo buenos resultados. (10,11,15,16,21)

Otros investigadores han tratado de aislar las fases del parásito a
partir de triatominos y medios de cultivo infectados, encontrándose
resultados satisfactorios. (1,2) Sin embargo, dichos estudios han si-
do escasos y llevados a cabo de manera aislada lo cual se refleja
en el hecho de que hasta la fecha no existe un programa estatal de
control de la Enfermedad de Chagas, por lo tanto se desconoce la
verdadera magnitud de esta enfermedad en el país. (24)

1.2) Definición de la Enfermedad de Chagas.

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una afe-
cción parasitaria hística y hemática, causada por un flagelado, Try-
panosoma cruzi, este protozoario es transmitido al hombre y otros
mamíferos por hemípteros hematófagos de la familia Reduviidae subfa-
milias Triatominae. (4)

1.3) La situación taxonómica (según Levine y col., 1980) es la si-
guiente.

Reino:	Protozoa
Phylum:	Sarcomastigophora
Subphylum:	Mastigophora
Clase:	Zoomastigophora
Orden:	Kinetoplastida
Suborden:	Trypanosomatina
Familia:	Trypanosomatidae

Subfamilia: Trypanosomatinae
 Género: Trypanosoma
 Especie: cruzi

I.4) Características morfológicas del T. cruzi.

T. cruzi presenta en preparaciones teñidas, a partir de frotis sanguíneos, una morfología característica, ya que adopta forma de "c" o de "u". Tiene una longitud aproximada de 20 micras, un cinetoplasto muy grande, de posición subterminal, el cual se sabe que es una mitocondria modificada. Posee además, un flagelo libre y membrana ondulante estrecha. Esta forma corresponde a la de tripomastigote, ya que el parásito presenta diferentes fases de desarrollo, dependiendo del huésped en el que se encuentre. (12)

El agente etiológico T. cruzi se halla en tres formas morfológicamente distintas, definidas por la posición del cinetoplasto (organelo que caracteriza el orden) con respecto al núcleo.

a) Los amastigotes: son organismos de forma esférica u ovalada de aproximadamente 2 micras de diámetro, presentan cinetoplasto, gránulo basal, flagelo reducido a una corta porción del axonema que tiene un recorrido intraprotoplásmico, sin atravesar la membrana. Representa una forma de multiplicación que se encuentra intracelularmente en los mamíferos huéspedes.

b) Epimastigotes: tienen el cinetoplasto situado en posición anterior, cercana al núcleo, un flagelo y una membrana ondulante corta; son organismos fusiformes de aproximadamente 20 micras de longitud y representan una forma de multiplicación que se encuen-

tra en el tubo digestivo del transmisor y medios de cultivo. (3)

c) Tripomastigotes: existen dos tipos dependiendo del huésped en que se localicen;

c.1) Tripomastigotes metacíclicos: tienen el cinetoplasto situado detrás del núcleo y un flagelo, así como una membrana ondulante a lo largo del organismo, su longitud es de aproximadamente 16 a 20 micras, representan la forma infectiva. Aparecen en la luz del recto de los triatominos.

c.2) Tripomastigotes sanguíneos: morfológicamente presenta cinetoplasto grande, oviforme, generalmente subterminal, núcleo central, su longitud es de aproximadamente 16 a 20 micras. Se encuentran en el mamífero huésped donde transmiten la infección de una célula a otra o infectan al triatomino cuando éstos ingieren la sangre de individuos o animales infectados. (6,14)

1.5) Ciclo vital del T. cruzi.

Bajo condiciones naturales, la infección por T. cruzi es iniciada por los tripomastigotes metacíclicos, que se encuentran en el tubo intestinal del triatomino. El insecto al picar y succionar sangre del hombre o mamíferos, defeca saliendo así los tripomastigotes metacíclicos, los cuales penetran a través de mucosas o de la conjuntiva ocular.

El parásito, una vez dentro de las células, se transforma en amastigote el cual inicia su reproducción, dividiéndose repetidamente por fisión binaria y destruyendo finalmente la célula huésped, este ciclo reproductivo se repite varias veces y puede llevarse a cabo en

cualquier tejido aunque se ha reportado que los sitios más frecuentes afectados son: miocardio, sistema nervioso central, sistema retículo endotelial y músculo liso del tracto intestinal, en estas localizaciones, los amastigotes suelen agruparse formando "nidos", después de haber destruido varias células huésped.

Después de algún tiempo, los amastigotes se transforman dentro de los nidos o pseudoquistes, en tripomastigotes sanguíneos, los cuales son liberados alrededor del tejido. Estas fases pueden invadir células en el área inmediata, o ser acarreados a otros tejidos por medio de la circulación sanguínea.

Al estar circulando en sangre, pueden ser ingeridos por el transmisor, el cual al succionar sangre los lleva a su intestino en donde se transforman en epimastigotes, estos se multiplican por fisión binaria transformándose después a tripomastigotes metacíclicos, cerrándose así el ciclo de vida. (7)

2.0) Cromatografía por intercambio iónico.

La cromatografía por intercambio iónico distingue en una mezcla un componente de otro, basándose en el número de cargas del signo no apropiado que se encuentran disponibles en cada molécula para tener interacción con el intercambiador de iones bajo las condiciones impuestas. El tamaño molecular es por lo tanto un factor importante y la distribución de cargas tiene también su función. (20)

Los aspectos físicos de un sistema cromatográfico líquido son familiares; una muestra se aplica a un extremo de un tubo empacado con partículas capaces de tener interacción de algún modo con las sustancias de la muestra a diferentes velocidades, dependiendo del grado de interacción con las partículas. Esto es esencialmente un sistema de contracorriente sólido-líquido, en el cual la velocidad de migración de un componente dado depende del número relativo de sus moléculas que permanecen en la fase líquida, en comparación con el número que ocupan la fase sólida en cualquier punto de equilibrio. Para cada molécula esto puede expresarse como la fracción de tiempo, que se encuentra en solución libre en el líquido en comparación con el tiempo en que se encuentre asociada con las partículas. El coeficiente de partición es la expresión numérica de esta distribución. La separación de los componentes depende de las diferencias adecuadas en sus coeficientes de partición, tomando en cuenta la eficacia de una columna dada en proporcionar repetidamente, a una cantidad dada de cada componente, el equilibrio entre las dos fases. Mientras más alta es la capacidad del empaque de la columna, mayor es el número de equilibraciones que puedan ocurrir dentro del volumen de la co

luna y menor en la diferencia mínima en el coeficiente de partición necesario para la resolución.

La asociación con las partículas puede tener muchas causas, operando solas o en conjunto. Usualmente están involucradas fuerzas secundarias (iónicas, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, etc.) que causan adsorción a superficies en el exterior (o en el interior) de la partícula. (20)

Los polielectrólitos se unen a los intercambiadores de iones celulósicos a través de la formación de uniones electrostáticas entre cargas de signo opuesto sobre la macromolécula adsorbida y el intercambiador de iones. Mientras mayor sea el número de uniones, mayor será la afinidad. Estas uniones electrostáticas individuales se están disociando constantemente y reformando a medida que los iones de sal compiten por los sitios de unión, pero si el polielectrólito y el adsorbente ofrecen el suficiente número de cargas del signo apropiado, el número de uniones formadas hacen que una disociación simultánea sea muy rara. La molécula adsorbida entonces permanecerá inmóvilizada sobre el adsorbente tanto tiempo como su medio permanezca constante. A esta situación se le llama "enlace hermético o adsorción hermética". (20)

Un aumento en la concentración de la sal aumenta la efectividad de los iones de sal al competir por los compañeros de enlace y puede subir a un valor finito la probabilidad que una disociación simultánea de todas las uniones adsorbiendo una molécula ocurra en un tiempo dado. De la molécula adsorbida se dice entonces que está en un equilibrio de adsorción finita con el adsorbente y que se moverá ha-

cia abajo, en la columna, a una velocidad finita. Cuando esta probabilidad es menor que la unidad, la velocidad de migración será más lenta que la del líquido transportador. Mientras más lenta es la concentración de la sal, la banda adsorbida migrará más rápidamente y esta condición de equilibrio de adsorción finita se aplica a la región completa, desde el movimiento apenas perceptible hasta la velocidad perceptiblemente más lenta que la velocidad de flujo del líquido eluyente. Solamente dentro de estos límites se puede obtener el gran poder de resolución de la cromatografía, por que es bajo estas condiciones que los pasos múltiples de adsorción y desadsorción pueden ocurrir con la consecuente migración diferencial de sustancias que tienen afinidades entre sí, pero diferentes para el adsorbente. (20)

Se puede suponer que la superficie de un intercambiador de iones presenta más o menos una distribución aleatoria de cargas a la molécula que está adsorbiendo y que la última ofrece al intercambiador de iones un número limitado de cargas de signo opuesto. La efectividad de estas cargas estará determinada por factores configuracionales en ambas superficies, cargas de signo no apropiado que interfieren con la molécula adsorbida y, lo más importante, la competencia de los iones de la solución amortiguadora por los lugares de unión tanto del intercambiador de iones como de la macromolécula. (20)

Puesto que la afinidad de un polielectrólito por un intercambiador de iones depende del número de uniones electrostáticas que pueden formarse entre ellos, es evidente que el número de sitios cargados disponibles sobre el polielectrólito para la formación de enlaces es la base primaria para la separación cromatográfica por un ad-

sorbente dado. Por lo tanto, se deduce que los polielectrólitos con la misma densidad de carga superficial neta (y en consecuencia, movilidades electroforéticas similares), pero que difieren en tamaño molecular, tienen correspondientemente, diferentes afinidades por el adsorbente. Los más grandes están unidos más herméticamente y aparecen después en un perfil de elución. Por razones parecidas, los polielectrólitos con movilidades electroforéticas considerablemente diferentes pueden emerger de la columna en la misma posición debido a las diferencias compensadoras en tamaño; (20)

El pH del medio es otro factor importante en la adsorción; su efecto se ejerce a través de cambios en el número de cargas disponibles para enlace. Así, un aumento en el pH puede esperarse que aumente la carga absoluta neta negativa en las proteínas (siempre y cuando tengan grupos ionizables que sean afectados por cambios en el pH, como sucede muy frecuentemente), de tal modo que sus afinidades aumentan por un adsorbente cargado positivamente (intercambiador aniónico. El mismo aumento en el pH disminuye las afinidades de las proteínas hacia un adsorbente cargado negativamente (intercambiador catiónico) y suponiendo que hay cambio nulo o mínimo en las cargas del adsorbente, un inventario sistemático de tales cambios de los medios para eluir la proteína de la columna. La misma transición de una condición de unión fuerte a una condición de equilibrio de adsorción finita se logra cuando la elución se produce por un aumento en la concentración de la sal. Sin embargo, el cambio en pH produce este resultado reduciendo la carga efectiva de la proteína de tal modo que puede formarse un número menor de uniones electrostáticas y de ahí

aumentando la posibilidad de una disociación simultánea de las uniones adsorbente a un valor finito. En forma similar, la disminución en pH aumenta el número neto de cargas absolutas e positivas en las proteínas, aumentando sus afinidades hacia un adsorbente cargado negativamente y reduciendo sus afinidades hacia uno cargado positivamente. (20)

11. FUNDAMENTACION DEL TEMA

T. cruzi presenta diversas fases en la naturaleza entre las extra celulares tenemas:

a) Tripomastigote sanguíneo; forma alargada de 20 micras de largo y 5 micras de ancho, es la fase infectante para los transmisores.

b) Epimastigote; fusiformes de 35 micras de largo, se divide activamente en el transmisor y en medios de cultivo. Se encuentra en el huésped vertebrado al darse el ciclo tripomastigote-epimastigote-amasigote-epimastigote-tripomastigote.

c) Tripomastigote metacíclico; morfológicamente parecido al tripomastigote sanguíneo, pero de características fisiológicas distintas fase infectante para el huésped vertebrado. (13)

Como se puede observar las fases extracelulares se pueden dar en forma morfológicamente semejante. Por ejemplo los tripomastigotes se encuentran en sangre, transmisores y medios de cultivo. En cuanto los tripomastigotes metacíclicos se sabe que son diferentes fisiológicamente hablando, de los sanguíneos. (8) Pero ¿qué tanto son diferentes los tripomastigotes metacíclicos obtenidos en medios de cultivo de los de transmisores?. Al mismo tiempo surge otra interrogante entre la similitud de los epimastigotes que se obtienen en medios de cultivo y de los obtenidos en transmisores. Esto podría ser resuelto si se someten a pruebas bioquímicas y biológicas a cada una de las fases por separado.

Por lo tanto es necesario tener separadas las distintas fases para someterlas a diversas pruebas para poner en evidencia las similitu

des o diferencias que existan. En el laboratorio se realizará la separación utilizando, triatominos (transmisores naturales), medios de cultivo acelulares y ratones infectados con el parásito.

Dada las diferencias en las cargas netas de cada una de las fases se aprovechará esta característica para separarlas a través de una columna de intercambio iónico (DEAE-celulosa) utilizando las experiencias de otros investigadores que se citan en la literatura. Otro método será el separar los epimastigotes por centrifugación a bajas temperaturas, aprovechando que esta fase es la que primero aparece en los medios de cultivo.

El material biológico obtenido será aprovechado para diversas pruebas bioquímicas que sirvan a demostrar si existen o no las diferencias antes mencionadas.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es un padecimiento crónico resultante a partir de la infección con un flagelado protozoario denominado Trypanosoma cruzi. Esta zoonosis esta limitada a el continente Americano, en particular a los países de América Latina. Con base en los estudios publicados se estima que al menos 20 millones de personas están infectadas con éste parásito y corren el riesgo de desarrollar las manifestaciones clínicas características de la etapa crónica. (6)

Diferentes medicamentos se han diseñado y probado contra T. cruzi pero ninguno de ellos ha sido completamente efectivo para el tratamiento en humanos. Además no se cuenta aún con vacunas y los programas de control de transmisores están evocados más a cuestiones políticas que técnicas. (8)

Lo anteriormente expuesto puede explicar el porque T. cruzi es uno de los organismos más estudiados en los laboratorios de investigación en el mundo. En nuestro país se localizan diversas zonas endémicas constituyendo un serio problema de salud pública. (22,25)

En la naturaleza T. cruzi presenta diferentes fases dependiendo del huésped en que se localice y si está dentro o fuera de las células (localización intra y extracelular, respectivamente). Cada una de las fases presenta características biológicas distintas por lo que se tienen que realizar estudios por separado en cada una de ella. Por tal motivo en el presente trabajo se intenta obtener por separado a las distintas fases extracelulares de T. cruzi.

IV. OBJETIVOS

IV.1) Objetivo general:

Obtener por separado a cada una de las fases extracelulares del ciclo de vida de T. cruzi.

IV.2) Objetivos específicos:

a) Aislar tripomastigotes sanguíneos a partir de sangre de ratón infectada con T. cruzi, utilizando la técnica de separación por intercambio iónico en columnas de DEAE-celulosa.

b) Aislar tripomastigotes metacíclicos a partir de tritominos (Hemiptera; Reduviidae), infectados con T. cruzi, utilizando columnas de DEAE-celulosa. Al mismo tiempo obtener la fase de epimastigote.

c) Aislar tripomastigotes metacíclicos a partir de medios de cultivo acelulares, utilizando columnas de DEAE-celulosa.

d) Aislar epimastigotes a partir de cultivos acelulares, utilizando técnicas de centrifugación a bajas temperaturas.

V. HIPOTESIS DE TRABAJO

Si existen valores de carga negativa neta diferentes entre las distintas fases del ciclo biológico de T. cruzi. Entonces, se pueden separar entre ellas utilizando intercambiadores aniónicos (como la DEAE-celulosa) bajo valores de pH y fuerza iónica adecuadas.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

VI.1) Material:

- Jeringas desechables de 1 y 3 ml.
- Cámara de Neubauer.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Pipetas Pasteur.
- Guantes para cirujano.
- Matrazes aforados de 100, 500 y 1000 ml.
- Matrazas Erlenmeyer de 100, 500 y 1000 ml.
- Pipetas graduadas de 1 y 2 ml.
- Tubos para centrifuga 13X100.
- Mecheros Bunsen y fisher.
- Vasitos de vidrio.
- Cristalizadores de vidrio.
- Instrumental para disección.

VI.2) Material biológico:

-Ratones cepa WHI de 20-25 g en peso, colocados en cajas de aluminio y alimentados con alimento comercial para ratón. Estos fueron proporcionados por el bioterio de la E.N.C.B. del I.P.N.

.-Cepa Miguz de T. cruzi, la cual fué aislada de una caso humano, por xenodiagnostico directo, y que se ha mantenido en el laboratorio por pases continuos ratón-ratón desde 1984.

-Ninfas de III estadio de Triatoma pallidipennis, criados en el

laboratorio. Mantenedos en el insectario a 28 °C y una humedad relativa de 50% aproximadamente.

- Medios de cultivo acelulares Gelosa Sangre y BHI.
- Muestras de orina de triatomos infectadas con T. cruzi.
- Sangre total de ratón infectada con T. cruzi.

VI.3) Equipo:

- Centrifuga, Servall, refrigerada.
- Incubadora, Roissa, modelo EC, serie ECME.
- Microscopio, Zeiss, I, 25X.
- Potenciómetro portable digital, Corning 103, 120 VAC.

VI.4) Reactivos:

- DEAE-celulosa, Sigma, malla media, No de catalogo J.8382.
- Alcohol-yodo
- fosfato monobasico de sodio.
- fosfato dibasico de sodio.
- NaCl al 0.85%.
- NaOH 0.5 N.
- HCl 0.5 N.
- EDTA 0.01 M.
- Glucosa

VI.5) Soluciones:

- Amortiguador de fosfatos salino glucosado a pH 8 y fuerzas iónicas (f.i.), de 0.145, 0.181, 0.217, 0.235 y 0.362.
- Fenol al 5%.
- Acido picrico diluido.

Métodos:

VI.6) Preparación de la DEAE-celulosa:

La DEAE-celulosa seca (aprox. 0.3 g por columna), se vertió sobre la superficie de 15 ml de NaOH 0.5 N en un vaso de precipitados, se dejó que el polvo se hundiera en el líquido. Se dejó reposar el material y con ayuda de una pipeta Pasteur se eliminó el líquido sobrenadante. La torta obtenida se resuspendió en seguida en una solución de 15 ml de HCl 0.5 N. Se dejó reposar 15 min. y se repitió inmediatamente el lavado con NaOH 0.5 N. Posteriormente la suspensión se lavó varias veces con agua destilada. Por último se hizo un lavado con 15 ml de solución de EDTA 0.01 M por 15 min.

VI.7) Ajuste de la DEAE-celulosa a pH deseado:

El equilibrio de la DEAE-celulosa (tratada previamente con ácido y base), con la solución amortiguadora inicial se efectuó simplemente lavándola repetidas veces y pasando suficiente solución amortiguadora a través de la columna ya empaçada.

VI.8) Eliminación de los finos:

Para eliminar los finos la DEAE-celulosa se suspendió en un volumen grande de agua y se dejó sedimentar por 15 min. Por decantación se eliminaron los finos junto con el líquido sobrenadante. Se repitió el proceso hasta que el sobrenadante estaba claro.

VI.9) Empacado de la columna por flujo inducido por gravedad:

A una jeringa desechable de 3 ml se le colocó un filtro de fibra de vidrio o un algodón de un espesor aproximado de 2 mm, se lavó varias veces con amortiguador y se probó fluidez.

La DEAE-celulosa se suspendió en aproximadamente 30 ml del amortiguador inicial, con ayuda de un agitador de vidrio fue adicionada gradualmente a la columna, tratando de lograr un empaquetamiento uniforme, una vez llena se lavó varias veces con el amortiguador hasta que el líquido eluido tenía el pH del amortiguador inicial.

VI.10) Procedimiento para el sangrado del ratón infectado con I. cru-

zi:

Se descerebra el ratón y se colocó boca arriba sobre una charola de parafina, se sujetó rápidamente de las manos y patas con alfileres. Con ayuda de tijeras y pinzas de disección se cortó la piel hasta descubrir el corazón. Con una jeringa de 1 ml y aguja 22X32 previamente llena con 0.2 ml de amortiguador de fosfatos salino glucosado (PSG), fuerza iónica (f.i.) 0.181 a pH 6, se succionó 0.1 ml de sangre, se homogenizó y filtró a través de una gasa (para eliminar posibles coágulos). Se contaron los tripomastigotes en cámara de Neubauer.

usr.

VI.11) Obtención de muestras de orina a partir de triatomíneos infectados con T. cruzi:

Se alimentaron 18 triatomíneos infectados sobre un ratón libre de infección, una vez que se alimentaron se colocaron uno por uno en pequeños vasitos de vidrio y se esperaron algunas horas a que orinaran. Con ayuda de una pipeta Pasteur se reunieron las muestras de orina y si era necesario se filtraban a través de una gasa. Se contaron los tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes en cámara de Neubauer.

VI.12) Obtención de las formas provenientes de medios de cultivo acelulares infectados con T. cruzi:

Para obtener estas formas del parásito se inoculó medios de cultivo Agar Sangre y BHI con tripomastigotes sanguíneos de un ratón infectado con T. cruzi, vertiendo 5 gotas de esta sangre por cada tubo con el medio. Se dejó incubar por aproximadamente 40 días, a una temperatura de 28 °C y una humedad relativa del 60%, (en estas condiciones ya están contenidas la fase de tripomastigote y epimastigote). Con una pipeta Pasteur se obtuvo aproximadamente 2 ml de la parte líquida de un medio, se centrifugó a 2500 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue desechado y el botón obtenido se resuspendió en 1 ml de amortiguador inicial.

VI.13) Aplicación de la muestra y elución:

La muestra se aplicó mediante pipeta Pasteur directamente en la

cima de la columna, con la punta de la pipeta que contiene la muestra (preparada como se menciona anteriormente) se tocó la pared interior de la columna, sólo unos milímetros arriba de la superficie, se soltó el dedo que controlaba la perilla y se movió rápidamente la pipeta alrededor de la pared para repartir la muestra. Para que la aplicación de la muestra fuera más uniforme se cerró el fondo de la columna parando el flujo antes de la aplicación de la muestra.

La muestra aplicada se dejó hundir lentamente en el adsorbente y cuando la última parte de ella hubo entrado, la superficie de la capa del adsorbente arriba de ella se lavó con pequeñas proporciones de amortiguador inicial dejando que cada lavado se metiera en el adsorbente antes que el siguiente se agregara. Posteriormente se fué adicionando gradualmente el amortiguador a través de la columna, manteniendo el flujo requerido (17 a 20 gotas por min.), hasta sacar de la columna a los componentes que no se adsorben y a los que se adsorben muy lentamente.

VI.14) Examen de las fracciones eluidas:

Se obtuvieron fracciones de aproximadamente 2 ml, se centrifugaron a 2500 rpm por 15 min a 4°C, el botón obtenido se resuspendió en el amortiguador inicial. Se procedió a realizar observaciones al microscopio y preparación de frotis para la comprobación de la separación.

VI.15) Obtención de epimastigotes a partir de medios de cultivo por centrifugación:

A partir de un medio de cultivo acelular, de aproximadamente 15 días de incubación (que no contenía la fase de tripomastigote metacíclico) se obtuvo aproximadamente 2 ml de la parte líquida, se centrifugo a 2500 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante fué desechado y el botón se resuspendió en solución salina 0.85%, el procedimiento se repitió una vez más y finalmente el botón se resuspendió en 0.5 ml de solución salina fisiológica y se conservó bajo refrigeración.

VI.16) Cálculo del rendimiento de la separación:

Se contó el número de fases del flagelado por mm^3 , con la cámara de Neubauer, antes y después de haber pasado a través de la columna. Los resultados se expresan en porcentaje con relación al número inicial de tripanosomas.

VI.17) Cálculo de la pureza de la separación:

Se realizó un frotis de las muestras de tripanosomas antes y después de haber pasado a través de la columna. Se tiñeron por la técnica de Giemsa. Se contaron 100 flagelados con el objetivo de inmersión y se reportó el porcentaje de cada fase en las muestras.

VI.18) Desarrollo experimental:

Para llevar a cabo la separación de las diferentes fases extracelulares de T. cruzi, se inocularon ratones por vía intraperitoneal, medios de cultivo acelulares Gelosa Sangre y BHI, y se infectaron triatominos por picadura sobre ratón con éste parásito. Se dejó que apareciera la parasitemia y cuando ésta se encontraba en su máxima concentración se procedió a la toma de muestras de la siguiente manera:

Los ratones infectados con T. cruzi fueron descerebrados y sangrados por punción cardiaca. La sangre obtenida (0.1 ml) se diluyó con 0.2 ml de amortiguador PSG f.i. 0.181 pH 8. Se filtró a través de una gasa para eliminar posibles coágulos.

De los medios de cultivo acelulares infectados con T. cruzi, se tomó aproximadamente 1 ml de la fase líquida. Se centrifugó a 2500 rpm por 15 min, el botón obtenido se resuspendió en 1 ml de amortiguador PSG f.i. 0.145 pH 8.

De 10 triatominos infectados con T. cruzi, se obtuvo aproximadamente 1 ml de orina lo más clara posible. Para esto fue necesario alimentarlos previamente a los triatominos sobre un ratón libre de infección.

Las muestras obtenidas previamente fueron colocadas en columnas de JEA-E-celulosa y fueron eluidas con el amortiguador apropiado, de la siguiente manera:

Las muestras de sangre fueron eluidas con 15 ml de amortiguador PSG f.i. 0.181 pH 8. Las fracciones obtenidas fueron desechadas. Se cambió la f.i. del amortiguador a 0.217 y se eluyó con 25 ml.

Las muestras tanto de orina de tritonino como de medios de cultivo se eluyeron con 15 ml de amortiguador PSG f.i. 0.145 pH 8.

Las muestras eluidas fueron recolectadas en fracciones de aproximadamente 2 ml y centrifugadas a 2500 rpm por 15 min a 4 °C.

Los epimastigotes fueron obtenidos a partir de medios de cultivo nuevos. La fase líquida fué centrifugada 2 veces con solución salina 0.85% a 2500 rpm por 15 min a 4 °C.

Se procedió a la realización de frotis de las muestras aisladas. Estas fueron teñidas por la técnica de Giemsa.

VI.19) Diagrama del desarrollo experimental:

ratones infectados

con I. cruzi.

(mantenimiento de la cepa).

Obtener 0.1 ml de sangre.

Aplicar la muestra en la columna.

Adicionar 15 ml de amortiguador PSG f.i G.191 pH 8.

Adicionar 20 ml de PSG f.i D.217 pH 8.

Recolectar fracciones de 2 ml.

Frotis

Infección de triatominos.

Inoculación de media de cultivo.

Incubar por 40 días.

Obtener 1 ml de la fase líquida.

Aplicar la muestra en la columna.

Centrifugar a 2500 rpm 15 min a 4°C.

Mantener por 40 días.

Obtener 1 ml de orina.

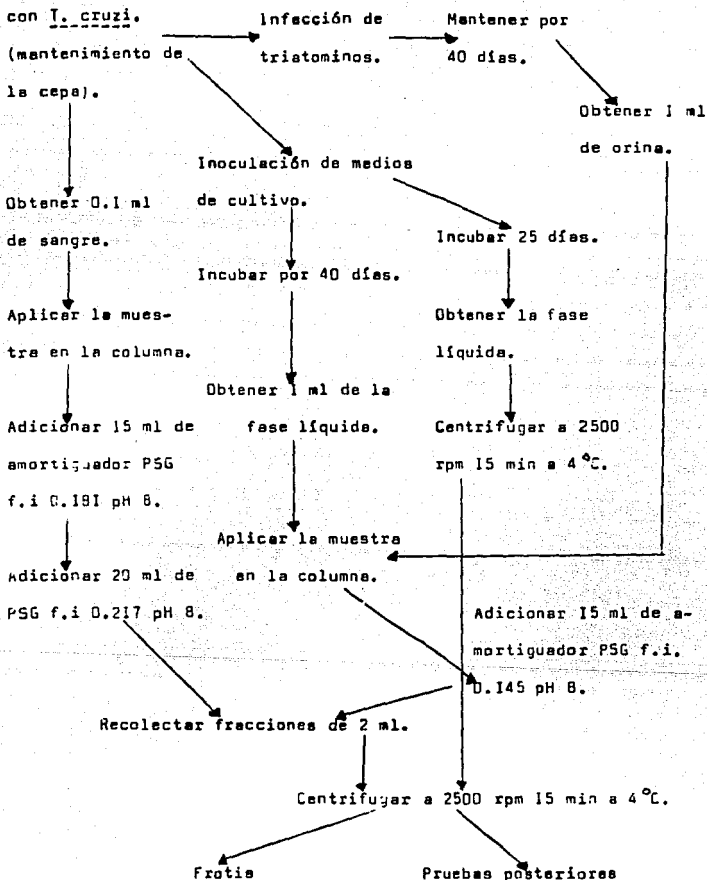
Incubar 25 días.

Obtener la fase líquida.

Centrifugar a 2500 rpm 15 min a 4°C.

Adicionar 15 ml de amortiguador PSG f.i. D.145 pH 8.

Pruebas posteriores



VII. RESULTADOS

La parasitemia en los medios de cultivo tanto de Gelosa Sangre como de BHI, aparece entre 5-8 días después de la inoculación con sangre de ratón infectada con T. cruzi. Entre los 8-20 días sólo está contenida la fase de epimastigote. De los 20 días en adelante está contenida además de la fase de epimastigote, la fase de tripomastigote metacíclico.

La parasitemia en los triatominos, aparece entre los 15-20 días después de ser infectados con sangre de ratón que contenía el T. cruzi. En este tiempo ya están contenidas las fases de epimastigotes y tripomastigote metacíclico.

La parasitemia en ratones inoculados por vía intraperitoneal con sangre de ratón infectada con T. cruzi, aparece entre los 15-20 días. Esta parasitemia llega a su máximo alrededor de los 25 días. Después de los 35 días es muy difícil detectar a los parásitos en sangre.

Las siguientes tablas nos muestran la cantidad de parásitos que contenían las muestras en estudio, antes y después de ser pasadas a través de las columnas de DEAE-celulosa:

Con base en estos datos se determinó el rendimiento y pureza.

1) Separación de tripomastigotes sanguíneos de sangre de ratón:

		<u>flagelados/mm³</u>		<u>Rendimiento(%)</u>	<u>Pureza(%)</u> .
		<u>Antes</u>	<u>Después</u>		
<u>Tripomastigotes</u>	1)	112	72	64.28	87
<u>sanguíneos.</u>	2)	102	69	67.64	90

2) Separación de tripomastigotes metacíclicos de epimastigotes a partir de triotominos:

		<u>flagelados/mm³</u>		<u>Rendimiento(%)</u>	<u>Pureza(%)</u> .
		<u>Antes</u>	<u>Después</u>		
<u>Tripomastigotes</u>	1)	12	10	83.33	100
<u>metacíclicos.</u>	2)	14	12	85.71	100
<u>Epimastigotes.</u>	1)	2	0	-	-
	2)	2	0	-	-

Nota: cada determinación es una media de 4 ensayos individuales.

3) Separación de tripomastigotes metacíclicos de epimastigotes a partir de medios de cultivo:

		<u>flagelados/mm³</u>		<u>Rendimiento(%)</u>	<u>Pureza(%)</u>
		<u>Antes</u>	<u>Después</u>		
<u>Tripomastigotes</u>	1)	5	3	60	100
<u>metacíclicos.</u>	2)	3	2	66.66	100
<u>Epimastigotes.</u>	1)	37	0	-	-
	2)	30	0	-	-

4) Los epimastigotes fueron obtenidos a partir de medios de cultivo nuevos, por centrifugación obteniéndose lo siguiente:

		<u>flagelados/mm³</u>		<u>Rendimiento(%)</u>	<u>Pureza(%)</u>
		<u>Antes</u>	<u>Después</u>		
<u>Epimastigotes.</u>	1)	45	45	100	100
	2)	33	33	100	100

Una vez separados los tripomastigotes metacíclicos tanto de cultivo como de trietomino, se trató de separar los epimastigotes de la columna de DEAE-celulosa. Para esto se aumentó la f.i. del amortiguador hasta 0.362, con variaciones en el pH hasta llegar a 6. En estas condiciones y a pesar de varios intentos, no pudo llevarse a cabo la separación, por lo que para recuperar los epimastigotes, se extrajo los 2 primeros centímetros de la columna y fueron resuspendidos en

amortiguador PSG f.i 0.145 y centrifugados a 1500 rpm por 10 min a 4°C.

Las fases puras de T. cruzi (después de ser pasadas a través de una columna de DEAE-celulosa), fueron inoculadas por vía intraperitoneal a lotes de 3 ratones, se obtuvo lo siguiente:

Tripomastigote metacíclico de triatoma: los 3 ratones se infectaron.

Tripomastigote metacíclico de cultivos: los 3 ratones se infectaron.

Epimastigote de triatoma: ningún ratón se infectó.

Epimastigote de cultivos: ningún ratón se infectó.

Tripomastigote sanguíneo: sólo se infectaron 2 ratones.

VIII. DISCUSION

Para la realización de éste trabajo se utilizó la cepa Miguz de I. cruzi, por ser una de las más virulentas con que se cuenta en el laboratorio. La parasitemia aparece más pronto y las concentraciones del parásito son mayores, comparadas con las demás cepas. Esto se hizo con el fin de poder detectar con mayor facilidad a los parásitos, además de que el rendimiento obtenido era mayor. Se probó también con la cepa Cid, obteniéndose los mismos resultados, esto en cuanto a la separación de las fases del parásito (condiciones del amortiguador), sólo que para detectar los parásitos era más complicado y el rendimiento obtenido era inferior.

Para la obtención de las muestras de orina se contaba con 5 especies de triatomíneos, las cuales son mantenidas en el laboratorio, de la cual se escogió a Triatoma pallidipennis, por ser la especie más susceptible a la infección por I. cruzi. Es decir presenta buenos índices de sobrevivencia y elevada proporción de positividad.⁽¹⁹⁾ De ésta especie se emplearon ninfas de III estadio, por presentar una mayor agresividad para la alimentación, es decir se alimenta cada vez que se le ofrece alimento, su mortalidad es menor que la de otros estadios y es relativamente fácil obtener las muestras de orina en cantidades suficientes.

Los medios de cultivo acelulares Gelosa Sangre y BHI, presentan características muy semejantes en cuanto a la aparición de la parasitemia y condiciones del amortiguador para separar la fase de tripomastigote metacíclico del epimastigote por su paso a través de la

columna. Pero en cuanto a concentración de parásitos, Gelosa Sangre presentaba una mayor cantidad y por consiguiente la fase de tripomastigote metacíclico aparecía más prontamente. Por esta razón se utilizó Gelosa Sangre para poder obtener mejores rendimientos.

Para la obtención de muestras de sangre se emplearon ratones albinos NHI por ser considerados como animales modelo de la Enfermedad de Chagas, ya que resisten a la virulencia de I. cruzi y sobreviven a la infección aguda, en la cual es muy fácil detectar a los parásitos en sangre. Se evitó el uso de otro tipo de sangre, como la de conejo, debido a que es muy difícil encontrar a los parásitos en sangre aunque éste presente la infección.

Los resultados en la separación de tripomastigotes metacíclicos de epimastigotes, tanto del transmisor como de medios de cultivo, indican que los tripomastigotes metacíclicos presentan una menor fuerza de adhesión (menos cargas negativas netas) que los epimastigotes. Esto puede deberse al menor tamaño molecular que presenta el tripomastigote metacíclico, por lo que son eluidos más rápidamente que los epimastigotes por su paso a través de la columna, en las condiciones del amortiguador de f.i. 0.141 y pH 8.

Además de la fuerza de adhesión se trató de observar que tanto influyen otros factores, como son la movilidad que presenta cada una de las fases del parásito y el pH en la separación.

Para determinar de que manera influye la movilidad, se mató previamente a los parásitos en un baño de agua caliente a 40°C por 5 min (no se observaron alteraciones en la morfología) antes de ser pasados a través de la columna. Para poder separar a los tripomastigotes meta

cíclicos de los epimastigotes, tanto de cultivos como del transmisor, se necesitó aumentar la f.i. del amortiguador hasta 0.362. Esto indica que además de la fuerza de adhesión la movilidad del parásito es un factor importante para que la separación se lleve a cabo en condiciones menos drásticas.

Para determinar de que manera influye la movilidad en la separación de tripomastigotes sanguíneos de componentes de sangre de ratón, se llevó a cabo el mismo procedimiento para inactivar a los parásitos. A la f.i. del amortiguador de 0.217 la separación no pudo llevarse a cabo, debido a que no pasaron a través de la columna de tripomastigotes sanguíneos, ni componentes de sangre, (con muestras de sangre que contienen al parásito viable, los tripomastigotes sanguíneos son eluidos más prontamente, en estas condiciones). Se aumentó la f.i. a 0.262 y en estas condiciones pasaron a través de la columna tanto tripomastigotes sanguíneos como componentes de sangre, por lo que la separación no pudo llevarse a cabo. Esto es indicativo que la movilidad es un factor importante para llevarse a cabo la separación.

Para determinar de que manera influye el pH en la separación se mantuvo constante la f.i. del amortiguador, para medios de cultivo y transmisor 0.145 y para muestras de sangre 0.217 y se hicieron pequeñas variaciones en el pH desde 8 hasta 7. No se observaron diferencias en cuanto a la separación. Esto nos indica que el pH en el rango de 8 a 7 no es un factor importante en la separación.

Para determinar de que manera afectaban las condiciones del amortiguador (f.i. y pH), la infectividad de la fase de tripomastigote ya separadas, se llevó a cabo la inoculación de ratones por vía intrape-

ritonal.

La fase de tripomastigote metacíclico separada del epimastigote tanto de medios de cultivo como del transmisor, fueron inoculados a 2 lotes de 3 ratones. Se encontró que los 6 ratones inoculados presentaban la parasitemia en alto grado. Lo que indica que en estas condiciones la infectividad de la fase de tripomastigote metacíclico en ratón no se ve afectada.

Los tripomastigotes sanguíneos separados de los componentes de la sangre, también fueron inoculados a un lote de 3 ratones. Sólo 2 ratones presentaron la parasitemia (muy ligera). Lo que indica que en estas condiciones, un poco más drásticas que para el tripomastigote metacíclico, la infectividad del tripomastigote sanguíneo en ratón se ve afectada.

También los epimastigotes obtenidos de medios de cultivo nuevos por centrifugación a bajas temperaturas, fueron inoculados a un lote de 3 ratones. Ningún ratón presentó la parasitemia. La falta de infectividad no se debe a las condiciones de centrifugación para obtenerlos (2500 rpm por 15 min.), si no que esta fase no es infectiva.

La morfología de las fases separadas del parásito, no se ve afectada por las condiciones impuestas para dicha separación, (f.i y pH). Para esto se hicieron comparaciones de frotis, antes y después de ser pesados a través de la columna, observándose que las características de los parásitos eran muy semejantes entre sí.

IX. CONCLUSIONES.

Las condiciones del amortiguador (f.i. y pH), para separar los tripomastigotes metacíclicos de epimastigotes tanto de medios de cultivo como del transmisor, fueron semejantes. Por lo tanto no deben existir diferencias en cuanto a fuerza de adhesión a las fibras de celulosa (cargas netas negativas) y movilidad, por parte de los tripomastigotes metacíclicos.

Los epimastigotes tanto de medios de cultivo como del transmisor, no pudieron ser eluidos a través de la columna, por lo tanto deben existir semejanzas en cuanto a fuerza de adhesión y movilidad entre éstos.

Para poder separar a los tripomastigotes sanguíneos, se necesitaron condiciones más drásticas que para los tripomastigotes metacíclicos, por lo tanto existen diferencias en cuanto a fuerza de adhesión y movilidad entre éstos.

Al ir aumentando las condiciones del amortiguador (f.i.), la infectividad de las fases del parásito va disminuyendo. Esto se debe a que algunos parásitos mueren durante el procedimiento de separación.

XI. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Al-Abbassy, S. N., Seed.: "Isolation of trypomastigote form of T. cruzi from a mixture of the trypomastigote and epimastigote forms of the parasite by use of a DEAE-cellulose column". The Journal of Parasitology. 58(3):631-632, (1972).
- 2.- Alvarenga N.J. and Brener Z.: "Isolation of pure metacyclic tripomastigotes of T. cruzi from triatomine bugs use of a DEAE-cellulose column". J. Parasitol., 65(5):814-815, (1979).
- 3.- Biagi, R.; "Enfermedades parasitarias". Segunda edicion. La Prensa Médica Mexicana. México, (1976).
- 4.- Bloch, M., Fernández, J.J.: "Chronic phase of Trypanosomiasis Americana". Rev. Inst. Inv. Médicas. 11(2):163-179, (1982).
- 5.- Bolletín of the world H. Organization.: "Enfermedad de Chagas". Informe de un grupo de estudio. Serie Inf. Téc. No 202 pp, 22, (1960).
- 6.- Bolletín of the World H. Organization.: "Immunology of Chagas". 20(8):448-492, (1974).
- 7.- Bull. Org. Mond. Santé. Bull. Wld. Hlth. Org. 50:459-472, (1974).

- 8.- Brener, Z.: "Biology of T. cruzi". Ann. Rev. Microbiol. 87:347-382, (1973).
- 9.- Bud, B. and Kierszenbaum, F.: "Isolation of Trypanosoma cruzi from blood". The Journal of Parasitology. 60(6); (1974).
- 10.- Byfield, J.E. and Scherbaum O.H.: "Separation of trypanosomes from blood of infected rats and mice by anion-exchangers". Nature. 219:1273-1274, (1968).
- 11.- Chao, D. Dusanic, D.: "Comparative studies the isolation of metacyclic tripomastigotes of T. cruzi by DEAE-ion-exchangers". Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Tsa Chih. 17(3):146-152, (1984).
- 12.- Cheng, T.C.: "Parasitología general". Editorial AC, libros científicos y técnicos. Madrid España. pp. 54-165 y 862-863, (1978).
- 13.- De-Sousa, W.: "Cell biology of T. cruzi". Int. Rev. Cytol. 86:197-883, (1984).
- 14.- Hoare, A.C., Wallace, G.F.: "Developmental stages of Trypanosomatid flagellates". A new terminology. Nature. 218:1385-1386, (1966).

- 15.- Lanham, S.M.; "Separation of trypanosomes from the blood of infected rats and mice by anion-exchangers". *Nature*. 218: 1273-1274, (1968).
- 16.- Lanham, S.M.: "Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose". *Exp. Parasitology*, 28:521-534, (1970).
- 17.- Levine, N.D., Corliss, J.O., Wallace, F.G.: "A newly revised classification of the Protozoa the committee on systematics and evolution of the Society of Protozoologists". *J. Protozoology*, 27(1):37-58, (1980).
- 18.- Moncayo, A.: "Actividades de pesquisa do scientific working group (SMG) on Chagas disease, 1982-1985". *Trans. Inst. Oswaldo Cruz*. Suppl. 81(B):179-283, (1986).
- 19.- Noguera, T.B.; "Susceptibilidad de cinco especies de triatomí- nos (Hemiptera:Reduviidae) a la infección con T. cruzi". *Tesis profesional*. E.N.C.B.-I.P.N. México, (1985).
- 20.- Peterson, A.: "Intercambiadores celulésicos de iones". *Téc- nicas de laboratorio en biología molecular y bioquímica*. Editorial el manual moderno. México, D.F., (1975).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 21.- Schenone, H., Gonzalez H.: "Perspectivas sobre la Enfermedad de Chagas. Bol. Chileno de Parasitología. 37:1, (1982).
- 22.- Simmon, V., Knight, R.H.: "Separation of trypanosomes from rat blood components". 10th Meeting, International Scientific Committee for Trypanosomiasis Research, Kampala, pp. 81-82, C.C.T.A., London, (1964).
- 23.- Tay, J.: "La Enfermedad de Chagas en la República Mexicana". Salud Pública de México. 22(6):409-450, (1980).
- 24.- Velasco, C.O.: "La Enfermedad de Chagas en México". VI Congreso Nacional de Parasitología (CONAPAR). Minatitlán, Veracruz, (1983).
- 25.- Velasco, C.O., Guzman, B.C.: "Importancia de la Enfermedad de Chagas en México". Rev. Lat-Am. Microb. 28:275-283, (1986).
- 26.- Williamson, J.: "Separation of blood-cell-free trypanosomes and malaria parasites on a sucrose gradient". Transaction of the Royal of Tropical Medicine and Hygiene. 60:425-427, (1966).

XII. APENDICE.

Preparación del amortiguador fosfato salino glucosado (PSG).

se pesó: Na_2HPO_4 (anhidro) 13.48 g
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.78 g
 NaCl 4.25 g

se aforó a 1000 ml con agua destilada.

Para obtener la fuerza ionica requerida, se llevaron a cabo las siguientes diluciones:

Amortiguador	Vol. PSG	Vol. H ₂ O	Conc. Glucosa(%)	Fuerza Ionica.
PSG 6:4	6	4	1.0	0.217
PSG 5:5	5	5	1.0	0.181
PSG 4:6	4	6	1.0	0.145

Se llevaron a pH 8 con ácido fosforico al 5%.

Preparación de los medios de cultivo acelulares *Selosa Sangre* y

BHI:

Agar Sangre, la fase sólida contiene: Sangre de borrego desfibrinada al 15%, agar base sangre (40 g por 1000 ml de agua).

BHI, la fase sólida contiene: Agar al 2%, Dextrosa al 1%, BHI al 3.7%.

La fase líquida para ambos medios es una solución al 0.85% de NaCl .

Fenol al 5%: Se pesaron 5 g de fenol y se disolvieron en 95 ml de agua destilada.

NaOH 0.5 N: Se pesaron 20 g de NaOH y se aforaron con 1000 ml de agua destilada.

NaCl al 0.85%: Se pesaron 0.85 g de NaCl y se llevaron a 100 ml con agua destilada.

HCl 0.5 N: 40 ml de HCl al 35% y una densidad de 1.3 se aforaron a 1000 ml con agua destilada.