



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

11281

12

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE EPIMASTIGOTES
DE *TRYPANOSOMA CRUZI* INCUBADOS CON SUEROS
INMUNES DECOMPLEMENTADOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
-PARASITOLOGÍA-

PRESENTA LA ALUMNA
ANA MARÍA FERNÁNDEZ PRESAS.

ASESOR: DRA. KAETHE WILLMS MANNING.

México D.F

Enero de 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

COMITÉ TUTORAL.

Dra. Kaethe Willms Manning.(Directora de tesis).

Dra. Ingeborg Becker Fauser.

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez.

JURADO.

PRESIDENTE: Dr. Horacio Merchant Larios.

SECRETARIO: Dra.Kaethe Willms Manning.

VOCAL: Dr. José Luis Molinari Soriano.

VOCAL: Dr. Roberto Hernández Hernández.

VOCAL: Dra. Patricia M. Tato Zaldivar.

SUPLENTE: Dra. Ingeborg Becker Fauser.

SUPLENTE: Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**Dedico este trabajo al Señor Jesucristo:
"Porque toda buena dádiva y todo don perfecto desciende de lo alto, del
Padre de las luces" (Santiago 1:17)**

A mis amados padres.

A mis queridas hijas Tatiana y Ximena.

Agradezco a José Antonio Ramírez su valioso apoyo técnico.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE

	pag.
RESUMEN	1
1.- HISTORIA	5
2.-EPIDEMIOLOGIA	6
3.-MORFOLOGIA DELPARASITO	9
4.-CICLO DE VIDA	16
5.- MECANISMOS DE INVASION	19
6.- MECANISMOS DE TRANSMISION	20
7.- RESERVORIOS ANIMALES	22
8.- ENFERMEDAD DE CHAGAS Y EL CICLO SELVATICO.	23
9.- VECTORES	24
10.- ENFERMEDAD EN EL HOMBRE	26
11.- PATOGENIA	29
II.- ANTECEDENTES	30
a) OBSERVACION DE EPIMASTIGOTES DE TRYOPANOSOMA CRUZI EN HUES- DES MAMIFEROS	30
b) APOPTOSIS DE EPIMASTIGOTES DE TRYPANOSOMA CRUZI	31
III.-HIPOTESIS	31
IV.- OBJETIVOS	32
V.-MATERIAL Y METODOS	32
a) ANIMALES EXPERIMENTALES	32
b) CULTIVO DE EPIMASTIGOTES	32
c) PREPARACION DE EXTRACTO CRUDO DE ANTIGENOS	33
d) OBTENCION DE SUEROS INMUNES	33
e) OBTENCION DE IMPRONTAS DE	35

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**CORAZÓN DE RATÓN INFECTADOS
CON TRYPANOSOMA CRUZI**

f) DETERMINACIÓN DE LAS ALTERACIONES DE EPIMASTIGOTES INCUBADOS CON SUEROS	35
g) MEDICIÓN DEL HINCHAMIENTO DE MEMBRANAS DE EPIMASTIGOTES DE TRYPANOSOMA CRUZI	36
h) ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
i) INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA EN EPIMASTIGOTES DE TRYPANOSOMA CRUZI	37
j) ANÁLISIS DE APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	37
VI.- RESULTADOS	37
a) OBSERVACIÓN DE EPIMASTIGOTES DE TRYPANOSOMA CRUZI EN IMPRONTAS.	38
b) INCUBACIÓN DE EPIMASTIGOTES CON SUEROS DE RATÓN (MICROSCOPIA DE LUZ)	38
c) INCUBACIÓN DE EPIMASTIGOTES CON SUEROS DE CONEJO (MICROSCOPIA DE LUZ)	39
d) INCUBACIÓN DE EPIMASTIGOTES CON SUEROS DE RATÓN (MICROSCOPIA ELECTRÓNICA)	41
e) INCUBACIÓN DE EPIMASTIGOTES CON SUEROS DE CONEJO (MICROSCOPIA ELECTRÓNICA)	44
f) ANÁLISIS DE MEMBRANAS DE ORGANELOS	48
g) INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA EN EPIMASTIGOTES DE TRYPANOSOMA CRUZI	49
h) ANÁLISIS DE APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	50
VII.- DISCUSIÓN	53

VIII.-CONCLUSIONES

58

IX.- BIBLIOGRAFÍA

59

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Resumen.

Trypanosoma cruzi tiene un complejo ciclo de vida con 4 estadios característicos en el insecto vector y en el huésped mamífero. Varias observaciones morfológicas indican que existe una forma intracelular de epimastigote antes que el parásito alcance la forma de tripomastigote. La susceptibilidad a lisis de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* inducida por sueros normales o inmunes en una reacción dependiente de complemento, ha sido estudiada. Sin embargo los efectos inducidos directamente por anticuerpos específicos sin complemento en la fase de epimastigote en el huésped mamífero, aún no han sido reportados. El objetivo de este trabajo fue estudiar las alteraciones ultraestructurales en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en presencia de suero inmune de ratón y conejo con o sin complemento. Se utilizó un aislado de *T. cruzi* (Querétaro) para todos los experimentos. El suero inmune se obtuvo inmunizando ratones y conejos con un extracto crudo de antígenos de *T. cruzi*. Por microscopía de luz, se observó una intensa aglutinación de epimastigotes incubados con suero inmune completo de ratón ó conejo. El patrón de aglutinación también se observó después de incubar con sueros inmunes decomplementados. La microscopía electrónica de estos aglutinados mostró daño extenso en los organelos de epimastigotes incubados con suero inmune completo o decomplementado: como característica sobresaliente se observó fusión de membranas y microtúbulos subpeliculares entre 2 ó más epimastigotes, fragmentación de la membrana nuclear, picnosis, edema del citoplasma, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, mitocondria y cinetoplasto. El aumento del espacio intermembranal en epimastigotes incubados con sueros inmunes decomplementados de ratón fue estadísticamente significativo ($P < 0.001$), comparado con epimastigotes incubados en sueros normales de ratón decomplementados, confirmando que la aglutinación por anticuerpos específicos induce cambios en la membrana plasmática. Los parásitos aglutinados incorporaron azul de tripano indicando muerte celular. Los resultados de la incorporación timidina- ^3H] también confirmaron que los epimastigotes expuestos a anticuerpos específicos en ausencia de complemento son incapaces de proliferar.

Se realizaron estudios de citometría de flujo para determinar el efecto de los anticuerpos sobre epimastigotes. La citometría de flujo mostró que la enzima deoxinucleotidil transferasa incorporó

nucleótidos fluoresceinados a los fragmentos de ADN alcanzando un 26% de fluorescencia específica en epimastigotes incubados con suero inmune de ratón de complementado. Los resultados son compatibles con muerte celular por apoptosis.

Se concluye que el estadio de epimastigote es susceptible a la aglutinación por anticuerpos específicos, y que la aglutinación induce muerte celular en este esquema experimental.

1.- Antecedentes históricos.

Entre los antecedentes para conocer el origen y dispersión de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana existen conjeturas basadas en relatos de cronistas españoles, revisiones de publicaciones arqueológicas, así como la actual distribución de los triatóminos en América. La adaptación de *Triatoma infestans* Klug, importante transmisor de *Trypanosoma cruzi* en Sudamérica ocurrió hace aproximadamente 2000 o 2500 años. Según trabajos de Rothhamer y col. (1985), el análisis de 35 momias exhumadas en el desierto chileno, con la técnica de carbono¹⁴ reveló indicios que sugieren la presencia de la enfermedad de Chagas entre los años 470 a.C. y 600 d.C.

En 1590 Fray Reginaldo de Lizárraga, sacerdote misionero, hizo la primera descripción sobre insectos reducidos, con los que tuvo contacto en sus viajes de inspección por Argentina (Sherlock, 1979a). La tripanosomiasis americana, fue descrita en 1909 por Carlos Chagas en Minas Gerais, Brasil. El protozoario *Trypanosoma cruzi* se descubrió en el intestino de un hemíptero hematófago, *Panstrongylus megistus*. Los ejemplares que Chagas encontró positivos, los remitió a su maestro Oswaldo Cruz, quién hizo que estas chinches picaran a un mono (*Callitrix penicillata*) y después de 20 a 30 días encontró tripanosomas en sangre periférica de este animal. Chagas encontró, accidentalmente, este protozoo en la sangre de una niña de 2 años, Berenice Soares de Moura, quien en ese momento gozaba de buena salud. A los 15 días, la niña se encontró febril, con hepatoesplenomegalia y linfadenopatía. Un año más tarde, su temperatura era normal y los parásitos sanguíneos habían desaparecido (Chagas 1909).

En 1961, 53 años después del primer encuentro de Chagas con Berenice, un grupo de médicos del Hospital de la Facultad de Medicina de Belo Horizonte, Universidad de Minas Gerais, se reunieron con objeto de estudiar la evolución del primer caso registrado de tripanosomiasis americana. El sumario de la investigación es como sigue:

“ El primer caso de tripanosomiasis americana estudiado y descrito por Carlos Chagas, fue en una niña de dos años que había tenido una forma aguda y grave de la enfermedad. En abril de 1961, esta paciente fue sometida a una revisión con xenodiagnóstico positivo (la cepa de *T. cruzi* aislada todavía se encuentra en estudio). Este caso, históricamente documentado, señala la

posibilidad de infección en el humano por *T.cruzi* durante medio siglo, sin producir manifestaciones clínicas reconocidas"...

Este es el único caso en la historia de la medicina en que el agente etiológico y el insecto transmisor se descubrieron antes de ser reconocida la enfermedad de Chagas como entidad nosológica. Berenice vivió muchos años más y a partir de 1961 fue examinada periódicamente, permaneció asintomática, salvo que presentaba algunas disfagia ocasional, palpitaciones y dolor precordial espontáneo o producido por alguna emoción (Lewinsohn, 1979).

Chagas estableció el género *Schizotrypanum* para este parásito, al que dio el nuevo nombre de *Schizotrypanum cruzi* ya que pensó que se multiplicaba por esquizogonia durante alguna fase de su ciclo vital en el hombre. Como el nombre se basaba en un concepto falso, fue retirado por el mismo Chagas, quien volvió a incluir la especie en el género *Trypanosoma*. Los estudios de Carlos Chagas abrieron grandes posibilidades de investigación y a la vez, descubrieron una endemia que ha sido contenida parcialmente. Después de los primeros casos descritos por él, estudios progresivos sobre la tripanosomiasis americana en todo el continente sudamericano, han descubierto el polimorfismo de sus manifestaciones clínicas, con la presencia de lesiones en diferentes órganos que ilustran la complejidad de la patogenia y virulencia de *Trypanosoma cruzi* en el hombre (Lewinsohn R.1979; Guerra F. 1970; Sherlock IA. 1979b; Rothhamer F.1985).

2.-Epidemiología.

La enfermedad de Chagas, es un problema de Salud Pública que afecta entre 16 y 18 millones de habitantes y que se extiende desde México hasta el sur de Argentina (OMS 1999), aproximadamente 120 millones de habitantes están en riesgo de adquirir la enfermedad. Además es una de las causas de muerte por lesiones cardíacas (Amorin 1979, OMS 1999). Se han reportado alrededor de 50,000 muertes asociadas a la infección por *Trypanosoma cruzi* (Espinosa 1985, García-Zapata 1986, OMS 1999).

Si bien, el registro sobre prevalencia y morbilidad de la enfermedad de Chagas mejoró durante la década de los 80, aún es difícil establecer con precisión la distribución geográfica y la prevalencia de la enfermedad. Es importante señalar, que la prevalencia, incidencia y mortalidad de la

enfermedad varían constantemente como consecuencia de la migración poblacional, la ejecución de programas de control y los cambios socioeconómicos, entre otros factores (OMS 1999).

La enfermedad de Chagas es una zoonosis que se mantiene en focos enzoóticos sin que exista infección en el ser humano. Tales ciclos enzoóticos se extienden aproximadamente desde los 42° de latitud N hasta los 46° de latitud S (sur de Argentina y Chile). En contraste, la distribución geográfica de la infección en el hombre se extiende desde el sur de los Estados Unidos de América hasta la provincia Argentina de Chubut, al norte de los 44°45' de latitud S (OMS 1991) (Fig. 1). A pesar de que se han encontrado transmisores, mamíferos silvestres y perros infectados con *Trypanosoma cruzi*, existen pocos casos humanos autóctonos reportados en el sur de los Estados Unidos de Norteamérica (Williams y col.1977; Navin y col. 1985; Beard y col. 1988, Yaeger 1988).

La enfermedad endémica se encuentra asociada con áreas rurales pobres, siendo éstas un ambiente propicio para el desarrollo de huéspedes mamíferos silvestres. La naturaleza y la calidad de las edificaciones así como, las condiciones de vivienda incluyendo el almacenamiento de muebles y otros enseres del hogar dentro de la casa y sus alrededores, son importantes en la colonización domiciliaria por los insectos triatómíneos. A través de los hábitats domiciliarios y peridomiciliarios se crean microhábitats que protegen a los insectos de los depredadores.

Los factores que favorecen la infestación de insectos incluyen: el uso de cortinas, el almacenamiento de ladrillos de adobe en corredores y pasillos interiores, y el apilamiento de palos dentro de las casas. Las uniones entre ladrillos de adobe o bloques de cemento así como, los espacios entre tablas de madera ó secciones de bambú, techos de hojas de palma y los pisos de tierra constituyen hábitats domiciliarios que favorecen la infestación por triatomíneos (OMS 1999) (Barreto 1985).



Tomado de OMS 1991

Figura 1. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas en América.

Diversos factores domiciliarios y peridomiciliarios favorecen la asociación con ciertas especies. Por ejemplo los pisos de tierra, son favorables para *Triatoma dimidiata* (Zeledon 1981) mientras que, los techos de palma lo son para *Rhodnius prolixus* (Lent 1969). En este último caso, además de que el techo de palma proporciona un hábitat apropiado para el vector, las hojas provenientes del ambiente selvático y destinadas para la construcción o reparación de los techos, pueden transportar huevos de los vectores. Para todas las especies de transmisores, especialmente para *Triatoma infestans*, las rajaduras y grietas de las paredes y otras fallas de construcción son sumamente importantes (Wilton y Cedillos 1979). Este conocimiento ha permitido instrumentar programas para interrumpir la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en humanos por medio de la reducción de poblaciones de vectores (reforma de la vivienda y el uso de insecticidas). Estos

programas han tenido buen éxito en algunas áreas de América Latina. Otras acciones de prevención y control en diversos países latinoamericanos promovidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) conjuntamente con los Ministerios de Salud incluyen el control de bancos de sangre para transfusión, la transmisión congénita y el tratamiento del paciente infectado (OMS 1999).

3.- Morfología del parásito.

Trypanosoma cruzi es un protozoo que pertenece a la clase Zoomastigophora y a la familia Trypanosomatidae. El parásito tiene un ciclo de vida complejo. Se han reconocido al menos tres formas morfológicas del parásito: tripomastigotes (formas extracelulares no replicativas), amastigotes (formas replicativas intracelulares que se encuentran en el huésped mamífero), y epimastigotes (forma que se multiplican en el intestino de los reduvidos). Se puede observar con frecuencia una forma de transición llamada promastigote (Beaver 1993).

Tripomastigotes.

Los tripomastigotes son las formas infectivas del parásito para mamíferos y triatomneos, con un cuerpo alargado de 20 a 25 μm de largo y un cinetoplasto subterminal, posterior al núcleo, constituido por el blefaroplasto y un corpúsculo parabasal ovoide. Del blefaroplasto surge la membrana ondulante que recorre a lo largo el cuerpo del parásito y emerge por el extremo anterior como flagelo libre (Fig. 2). Esta forma no tiene la capacidad de multiplicarse (Atias y Apt 1994).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig 1. Tripomastigotes sanguíneos obtenidos de ratón CD-1 infectado con *Trypanosoma cruzi* aislado Querétaro. (m) mitocondria; (re) retículo endoplásmico. Barra = 1.2 μm .

Amastigote.

Es la forma intracelular y es la fase responsable de la patología de la enfermedad de Chagas. Tiene la capacidad de multiplicarse por división binaria (Pinto 1984) dentro del citoplasma de células de mamíferos como las del corazón, músculo, hígado y bazo (Melhorn y Waldorf 1988). Es redondeado u ovoide, mide de 2 a 2.5 μm , carece de flagelo y membrana ondulante, su núcleo es central y su cinetoplasto pequeño (Schmidth y Roberts 1989) (Fig. 3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

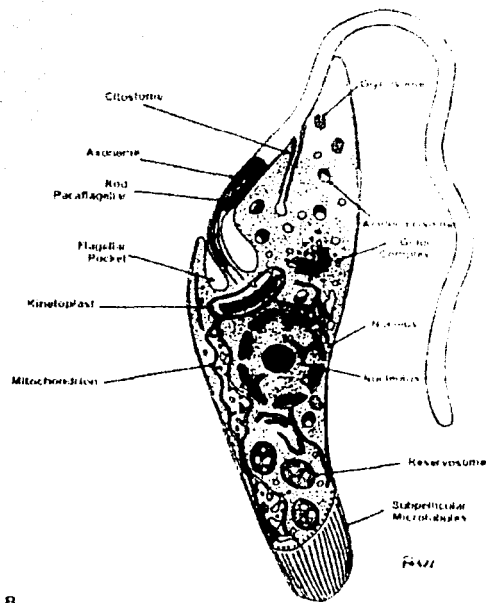


Figura 3. Células VERO infectadas con amastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Amastigotes (flecha corta) y epimastigotes (flecha larga). Barra = 4.0 μm .

Epimastigote.

Este estadio del ciclo de vida se encuentra en el intestino medio del vector y se desarrolla generalmente en medios de cultivo. Sin embargo, se han descrito en el huésped mamífero formas transitorias similares a epimastigotes antes de transformarse en tripomastigotes (Wenyon 1926; Hoare 1972; Gutteridge y Rogerson 1979; Mehlhorn 1987; Andrews y col.1988; Faucher y col 1995; Silva Pinto y col. 1999; Almeida-de-Faria y col. 1999; Tyler 2001).

La ultraestructura de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* ha sido estudiada por diferentes autores, mediante microscopía electrónica de transmisión (Wery 1966; Brack 1968; Delain y col.1969; Milder y col. 1969; De Boso y col. 1974; Peyrol y col. 1987; Docampo y Moreno 1999) y de barrido (Docampo y col. 1974). Los epimastigotes tiene aspecto fusiforme, miden aproximadamente 20 μm de longitud y el cinetoplasto se encuentra ubicado en posición anterior, cercano al núcleo. Tiene un flagelo y una pequeña membrana ondulante (Fig. 4).



8

Figura 4. Esquema de las diferentes estructuras del epimastigote de *Trypanosoma cruzi*.

Ultraestructura de epimastigotes de *T. cruzi*

Membrana plasmática

Los epimastigotes exhiben una membrana plasmática que mide aproximadamente 10 nm, de grosor. Rodeando la superficie del parásito se encuentra el glicocáliz y por debajo de la membrana plasmática, los microtúbulos subpelliculares con un diámetro aproximado de 30 nm. Los microtúbulos se conectan por pequeños puentes entre sí, a la membrana plasmática y a las cisternas del retículo endoplásmico.

En la membrana plasmática existen tres áreas especializadas, la más evidente es el citostoma que se observa como una hendidura de la superficie celular seguida por los microtúbulos subpelliculares. Se origina en la porción anterior de la célula y se proyecta a la región posterior hasta alcanzar el núcleo, su función es fagocitar material del huésped. Esta estructura se encuentra también en la fase de amastigote (Figs. 4 y 5). Otra área especializada se localiza en la base del flagelo, está conformada por proyecciones superficiales o agregados que unen el flagelo al cuerpo celular (De Souza 1999).



Figura 5. Epimastigote de *Trypanosoma cruzi* obtenido de medio de cultivo RPMI. (K) cinetoplasto; (G) Aparato de Golgi; (sf) saco flagelar; (m) mitocondria. Barra = 0.7 μ m.

La superficie de los epimastigotes observada al microscopio de barrido es sinuosa y rugosa y presenta protuberancias citoplasmáticas, algunas de las cuales se relacionan con el flagelo (De Boiso 1974) (Fig. 6).

Vacuolas.

En el citoplasma se observan vacuolas de diferentes tamaños que contienen lípidos; peroxisomas que almacenan macromoléculas que pueden ser utilizadas durante el proceso de transformación de epimastigotes a tripomastigotes; glicosomas; acidocalcisomas y reservosomas (De Souza 1999).

Los glicosomas pertenecen al grupo de peroxisomas y son organelos redondeados que miden 0.3 μm (Soares 1987), contienen catalasa y otras enzimas que participan en la oxidación de aminoácidos y de lípidos. Su función principal es reclutar las enzimas que participan en la vía glicolítica incrementando la eficiencia de este proceso (Oppeerdoes y Michels 1991).

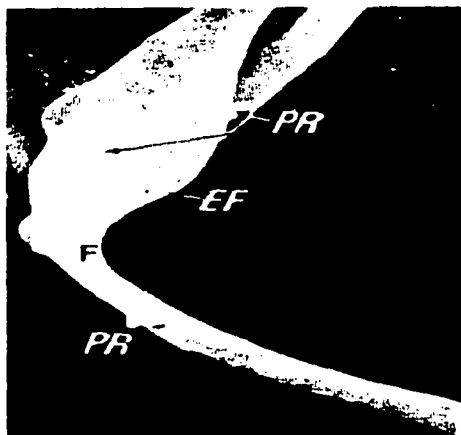


Figura 6. Microscopia electrónica de barrido de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. (EF) emergencia flagelar; (F) flagelo; (PR) protuberancias citoplásmicas 13000 x (Tomadas de Ultraestructura de *T. cruzi* con microscopia de barrido y de transmisión por De Bosa JF).

Docampo y Moreno (1999) describieron los acidocalcisomas que son organelos de almacenamiento de fósforo, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{2+} y Zn^{2+} , Cl^- , K^+ y sulfuros necesarios para regular la homeostasis del pH intracelular y participar en la osmoregulación. El número de acidocalcisomas de *T. cruzi*, varía de acuerdo a la fase del ciclo de vida (Fig. 4).

En la parte posterior de los epimastigotes existen estructuras asociadas a membranas conocidas como reservosomas tipo I y II, los primeros presentan una matriz electrodensa de lípidos y proteínas (cultivos jóvenes) mientras que los tipo II presentan una matriz homogénea sin inclusiones lipídicas (cultivos viejos) (Figueiredo y col. 1994). La acumulación de estas proteínas en los reservosomas sugiere que son utilizadas como fuente de energía durante la diferenciación a tripomastigotes. Los reservosomas desaparecen una vez que el parásito se establece en el huésped vertebrado (Figueiredo y col. 2000).

Flagelo.

El flagelo está constituido por 9 pares de microtúbulos dispuestos periféricamente y un par de microtúbulos centrales: se extienden dentro del saco flagelar y están anclados al corpúsculo basal (Farina y col 1986).

El flagelo de los tripanosomátidos participa en tres procesos biológicos importantes; en el movimiento del parásito, en la adhesión del parásito a la superficie celular de huéspedes mamíferos y a las membranas del intestino del vector (DeSouza 1999).

Retículo Endoplásmico y Aparato de Golgi.

Los estudios para determinar morfología y distribución del retículo endoplásmico y aparato de Golgi en epimastigotes obtenidos de cultivo demuestran que los compartimentos de estos organelos son mínimos, y que se tiñen intensamente después de post-fijarlos con tetraóxido de osmio y yoduro de potasio. Existe una clara asociación entre la cara cis del Golgi y las cisternas del retículo endoplásmico (Figuereido y Soares 1995) (Figs. 4 y 5).

Complejo Cinetoplasto-mitocondrion.

Bajo el microscopio electrónico de transmisión se observa el cinetoplasto que corresponde a una condensación de DNA extranuclear, constituye cerca del 30% del total del DNA. Este último se presenta como una red de fibras orientadas paralelamente al eje longitudinal de la célula, conformada por cerca de 20,000 a 30,000 minicírculos de DNA que tienen una longitud de 0.45 μm , que corresponde a 1440 pares de bases. El DNA-cinetoplástico también presenta maxicírculos de una longitud de 6 a 11 μm que corresponden al DNA mitocondrial de células eucarióticas. (Englund y col. 1996).

Debido a que los minicírculos de DNA tienen una secuencia muy heterogénea, son útiles para distinguir diferentes cepas y clones dentro de la misma especie (De Souza 1999). El DNA

citoplásmico difiere del nuclear por su composición de bases, estructura molecular y ausencia de histonas (Hecker y col. 1994).

Del cinetoplasto se origina una mitocondria tubular única que se extiende hasta la parte anterior del protozoo (De Boiso y col. 1974) (Figs. 4 y 5).

Núcleo.

El núcleo ocupa gran parte del cuerpo del parásito, mide aproximadamente $1\mu\text{m}$ y está conformado por fibrillas de 6-8 nm (pericromatina) y gránulos de 25 a 40 nm (intercromatina y pericromatina). La región central del nucléolo contiene proteínas ácidas y los poros nucleares que miden 80 nm (Tay 1966) (Fig. 4).

División de celular.

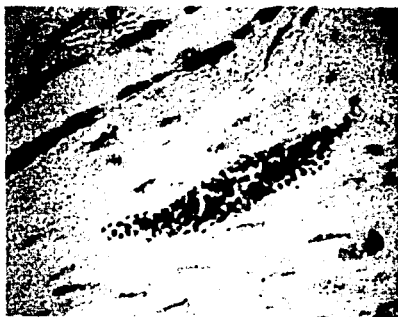
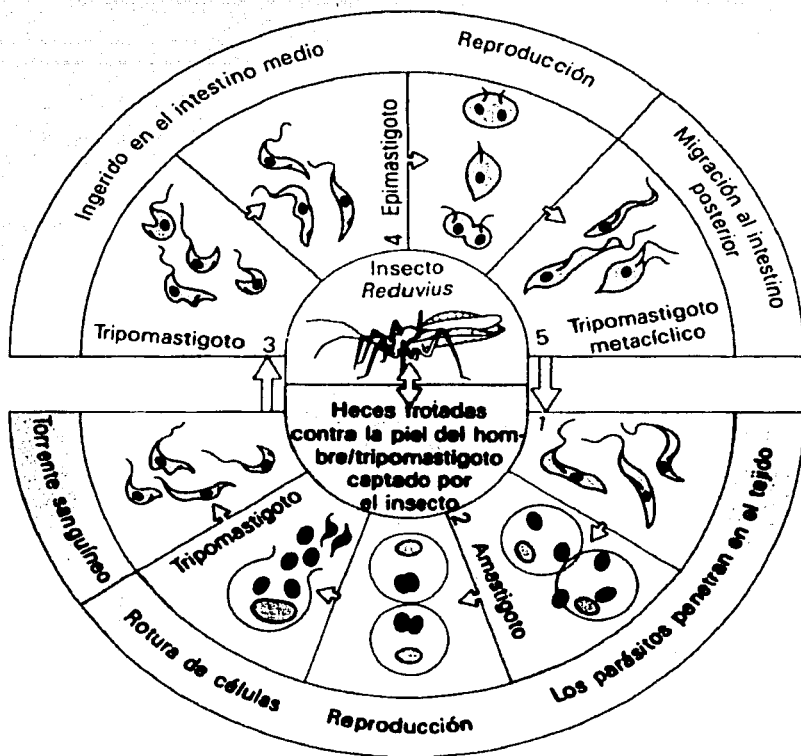
Cuando los epimastigotes se dividen, aparece en primer término un nuevo cuerpo basal y flagelo. Simultáneamente el nucleoide se elonga para después separarse en dos segmentos del mismo espesor. Casi con la misma frecuencia se puede observar otra forma de división del ADN, en la que en la parte media aparece otro nucleoide paralelo al primero y unido a veces tan estrechamente que se confunde con él, presentando forma de Y (Fig. 7). Finalmente, el nuevo nucleoide se separa y distancia del anterior. Con la división del núcleo y del citoplasma termina la duplicación celular.



Figura 7. Microscopía electrónica de transmisión de *T. cruzi*. (cb) corpúsculos basales; (ADN) ácido desoxirribonucleico; (m) mitocondria. 22 000 x (Tomadas de Ultraestructura de *T. cruzi* con microscopía de barrido y de transmisión por De Bosa JF).

4.- Ciclo de vida.

El ciclo de vida se inicia cuando el insecto vector ingiere sangre de un hospedero infectado con tripomastigotes sanguíneos. Al llegar éstos al intestino medio del insecto se multiplican por fisión binaria longitudinal (Tyler 2001) y 3 o 4 semanas después, aparecen los tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del redúvido. Cuando un insecto infectado se alimenta de un huésped no infectado ingiere sangre en volumen varias veces mayor que su peso corporal, por lo que el contenido intestinal es desplazado y obliga al insecto a defecar en la piel o mucosas cercanas al sitio de la picadura. Esto induce prurito intenso, favoreciendo el rascado del huésped y promoviendo la penetración de los tripomastigotes por el sitio de la picadura en la piel. Los tripomastigotes pueden ser fagocitados o penetrar activamente en las células del sistema reticuloendotelial, donde se transforman en amastigotes intracelulares y se multiplican por fisión binaria, hasta llenar la célula. Cuando ésta se lisa se liberan tripanomastigotes que infectan células vecinas ó pasan a la circulación sanguínea diseminándose por todo el organismo, estableciéndose en tejidos u órganos blanco, dependiendo del tropismo de la cepa. Este mecanismo de multiplicación se repite muchas veces, y el ciclo se completa cuando un nuevo transmisor se alimenta de este huésped infectado (Beaver 1994) (Fig. 8).



Tomado del Rott (1991)

Figura 8. Ciclo Biológico de *Trypanosoma cruzi*.

5.- Mecanismos de invasión.

Manque y col. (2000) caracterizaron el sitio de adhesión de la glucoproteína de superficie gp82, que se expresa en los tripomastigotes metacíclicos obtenidos del insecto vector y que participa en la penetración del parásito a la célula. Por otro lado, Ortega-Barria y Pereira (1991) mostraron en *T.cruzi* una proteína de superficie de 60 kDa denominada penetrina que promueve la adhesión e invasión a la célula huésped. La entrada del parásito a la célula huésped es un proceso complejo en el que intervienen moléculas de superficie de la célula huésped. Schenkman y col. (1988) han mostrado que los tripomastigotes penetran a las células del sistema reticuloendotelial de manera polarizada a través de la membrana basolateral, en donde hay mayor concentración de fibronectina y receptores. La fibronectina une a los tripomastigotes a la célula huésped favoreciendo su internalización (Peyrol 1987; Cornette y col. 1988; Rimoldi y col.1989). La invasión es un proceso activo asociado a la fosfolipasa A₂, al consumo de energía por parte del parásito y síntesis proteica de la célula huésped (Connelly y Kierzenbaum 1984; Schenkman y col. 1991). Se ha observado que la trans-sialidasa de *T.cruzi* facilita la generación de un epítipo específico, el Ssp-3 que es necesario para la invasión (Schenkman y col. 1992).

Por otro lado, se sabe que los tripomastigotes son refractarios a la lisis mediada por complemento mientras que los epimastigotes activan la vía alterna del complemento. Los tripomastigotes evaden la lisis mediada por complemento mediante la síntesis de una glucoproteína de 160 Kd, que inhibe la formación del componente C3 convertasa de la vías alterna y clásica del complemento, previniendo la activación del complemento en la superficie del parásito (Joiner y col. 1985; Joiner K 1986; Sher y col. 1986; Hall y col. 1991; Norris 1997). Los amastigotes son capaces de activar al complemento, pero no son lisados. (Norris y col. 1997).

No se ha reportado que los intermediarios reactivos del oxígeno participen limitando la infección intracelular (McCabe y Mullins 1990). Sin embargo, las enzimas lisosomales y el óxido nítrico se han relacionado con la muerte del parásito (Tanowitz col.1975; Tanaka y col. 1987; Muñoz-Fernandez y col. 1992).

Los tripomastigotes y amastigotes sintetizan una proteína capaz de lisar la vacuola parasitófora para quedar libres en el citoplasma de la célula huésped y multiplicarse por fisión binaria (Andrews

(Andrews y col. 1990). La célula del huésped se distiende y se rompe liberando amastigotes y tripomastigotes, los cuales infectan células adyacentes no infectadas. Rosenberg y col. (1991) han sugerido que una neuraminidasa asociada con tripomastigotes intracelulares podría jugar un papel importante en la salida de los parásitos de la célula huésped. Los tripomastigotes también entran al torrente circulatorio e infectan tejidos a distancia. A pesar que la mayoría de los tejidos son vulnerables a la infección, existe tropismo entre las diferentes cepas de tal suerte que el sistema reticuloendotelial, el sistema nervioso (especialmente los ganglios autónomos), los músculos estriados y cardíacos son particularmente susceptibles (Brenner 1973).

6.- Mecanismos de transmisión.

En zonas rurales, *Trypanosoma cruzi* se transmite a los seres humanos a través de la picadura y contaminación con heces de los insectos triatomíneos infectados. En zonas urbanas, donde los triatomíneos se encuentran presentes sólo ocasionalmente, el parásito se transmite principalmente por transfusión sanguínea o por infección intrauterina; otros medios de transmisión son la infección a través de las mucosas oral y ocular, el transplante de órganos infectados y la infección accidental en laboratorios de investigación.

Transmisión por el insecto vector.

En la mayoría de los casos de enfermedad de Chagas, la transmisión ocurre mediante una de las siete especies domiciliarias: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *Pastronyglus megistus*, *Rhodnius prolixus* y *R. pallenscens*. En la transmisión de *T. cruzi* influyen varios factores: la densidad del vector; la frecuencia de alimentación, el volumen humana o de la sangre de otros huéspedes reservorios con que se alimenta de sangre, longevidad, susceptibilidad a la infección, el intervalo entre la alimentación y la defecación, la susceptibilidad de los reservorios animales en relación con la población humana; el índice de infección en los vectores, en los huéspedes reservorios animales y humanos, y la duración de las parasitemias.

Transmisión por transfusión sanguínea.

Esta vía se considera como la segunda en importancia en la transmisión (OPS/OMS 1990), y adquiere cada vez mayor relevancia, ya que aún en países en donde la enfermedad de Chagas no es endémica se han reportado casos por transfusión (Grant y col. 1989). En México, solamente se sabe de un caso postrasfusional en el estado de Yucatán (Salazar P. y col. 1989).

Infección intrauterina.

La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas ocurre principalmente en hijos de mujeres infectadas provenientes de zonas rurales. En la mayoría de los casos, las mujeres no presentaron síntomas clínicos de la enfermedad de Chagas crónica. Esta forma de infección es importante en países como Argentina (6-20 % de prevalencia), en Bolivia (51 %) y en Chile (0.8 al 8.9%) (OMS 1991).

Infección accidental en el laboratorio.

La infección accidental no es muy frecuente, sin embargo las punciones con agujas infectadas, contacto con materiales contaminados y salpicaduras de suspensiones de *T. cruzi* en las conjuntivas representan un riesgo considerable (Bittencourt 1988).

Transmisión oral.

La adquisición del parásito mediante la ingestión de triatomíneos o mamíferos infectados se ha demostrado en animales experimentales pero hasta ahora, no se ha documentado la transmisión oral en el ser humano. No obstante, mediante investigaciones epidemiológicas de dos brotes independientes de enfermedad de Chagas aguda, se han obtenido datos que sugieren la transmisión oral a través de ingestión de alimentos contaminados. Si esto se confirmara, los alimentos contaminados con secreciones de zangüeyas que invaden las viviendas podrían poner en riesgo la salud humana (Lainson 1980, Nery-Gumarães 1968).

Transmisión por trasplante de órganos infectados.

El trasplante de órganos de donantes infectados se ha descrito recientemente como un mecanismo de transmisión de *T. cruzi*. Los pacientes que han recibido órganos de donantes con enfermedad de Chagas crónica han sufrido episodios agudos de la enfermedad y el parásito ha sido aislado de sangre periférica (Chocair 1981). Se han registrado algunos casos fatales, en los cuales se han aislado parásitos postmortem en varios órganos. Además, como los receptores de los órganos son sometidos a terapia inmunosupresora, aumenta significativamente su susceptibilidad a la infección (Leiguarda 1988).

7.- Reservorios animales.

La enfermedad de Chagas se consideraba una zoonosis que afectaba a numerosos triatomíneos selváticos y animales silvestres en focos naturales, en los cuales estaban ausentes los seres humanos y los animales domésticos (Tabla 1). Como resultado del contacto del hombre con el vector, así como la extensión hacia nichos ecológicos endémicos la infección se propagó, estableciéndose ciclos domiciliarios y peridomiciliarios (OMS 1999).

En casi todos los países, donde *Trypanosoma cruzi* es endémico, se han registrado ciclos de transmisión que involucran una amplia gama de huéspedes. En la actualidad, se ha registrado la infección por *T. cruzi* en más de 150 especies de 24 familias de mamíferos silvestres domiciliarios o peridomiciliarios. El perro, y en ciertas regiones, la zangüeya y los roedores son probablemente

los reservorios más importantes dentro del ciclo peridomiciliario, destacándose en el ciclo selvático, la zarigüeya (de la especie *Didelphis*) y el armadillo (Tabla 2). En el ciclo vital doméstico participan los triatomíneos domiciliarios y varios animales domésticos. A causa de la permanente disponibilidad de sangre, la densidad de los triatomíneos domiciliarios es elevada y el contacto entre el ser humano y el vector es frecuente (Barreto 1985).

Tabla 1. Reservorios domiciliarios y peridomiciliarios

Domiciliarios	Nombre común
<i>Canis familiaris</i>	Perros
<i>Felis domesticus</i>	Gatos
Peridomiciliarios	
<i>Rattus rattus</i>	Ratas
<i>Mus musculus</i>	Ratones
<i>Rattus norvegicus</i>	Cobayos
<i>Capra hircus</i>	Cabras
<i>Cavia porcellus</i>	Caballos
<i>Sus scrofa</i>	Cerdos
<i>Crytolagus caniculis</i>	Conejos

Tomado del Informe de Comité de expertos de la OMS 1991.

8.- Enfermedad de Chagas y el ciclo selvático.

La importancia y el papel que desempeñan los reservorios animales en los ciclos vitales selváticos y domésticos de *T. cruzi*, están relacionados con las diferentes especies y su hábitat (domiciliario, semidomiciliario o selvático); el alcance de su dispersión; su densidad poblacional; su distribución geográfica; su disponibilidad con respecto al vector y el grado de contacto con éste; las preferencias tróficas de los vectores; y las relaciones parásito/ reservorio-huésped.

Numerosas especies arbóreas y terrestres de mamíferos se encuentran involucradas en el ciclo selvático (Tabla 2) y como algunas de ellas invaden las zonas peridomiciliarias, pueden incrementar el riesgo de transmisión al ser humano (OMS 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.- Vectores.

Casi todas las especies triatomíneas se limitan a las regiones neotropicales y neoárticas. Se distribuyen geográficamente desde Salt Lake a 41° de latitud N, en los Estados Unidos de América, donde se ha encontrado *Triatoma protacta*, hasta la Patagonia, en América del Sur, donde se ha reportado *T. patagónica* a los 46° de latitud S (Zeledón 1981).

Los triatomíneos son insectos del orden *Hemiptera*, de la familia *Reduviidae* y de la subfamilia *Triatominae*. Los géneros de importancia médica son: *Triatoma*, *Rhodnius*, *Dipetologaster*, *Pariatroma*, *Eratyrus*, *Panstrongylus* y *Beminius*.

Tabla 2. Reservorios selváticos

Marsupiales	Roedores	Quiropéptidos
<i>Didelphys marsupialis</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Stumira liliun</i>
<i>Didelphys virginiana californica</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Carollia perspicillata azteca</i>
<i>Didelphys marsupialis caucásea</i>	<i>Rattus rattus</i>	
<i>Didelphys virginiana</i>	<i>Rattus rattus frugivorus</i>	
<i>Metachirops opossum pallidum</i>	<i>Rattus rattus alexandrinus</i>	
<i>Philander opossum.</i>	<i>Sigmodon hispidus saturatus</i>	
	<i>Tylomys nudicaudus nudicaudus</i>	
Carnívoros	<i>Otolomys phyllotis connectens</i>	
<i>Urusus maritimus</i>	<i>Peromyscus aztecus</i>	
	<i>Peromyscus mexicanus</i>	
Edentados	<i>Peromyscus yucatanensis</i>	
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	<i>Lymis sp.</i>	
<i>Mexicanus</i>	<i>Heteromys desmarestianus</i>	
<i>Sciurus vulgaris.</i>	<i>Neotoma micrupus</i>	
Tomado del informe de Comité de expertos de la OMS 1981.		

Las triatomas son de color pardo o negro miden de 2 a 4 cm de longitud y poseen alas bien desarrolladas. En la parte posterior de los ojos se encuentran los ocelos, la cabeza es cónica y larga y en la porción anterior presenta un par de antenas delgadas. La probóscide es larga y está doblada en ángulo hacia la porción ventral, el abdomen es alargado y ovoide, con marcas de colores brillantes que van del rojo al amarillo y que se alternan con colores oscuros según la especie (Sherlock 1979a). Los adultos se distinguen de las ninfas por la presencia de los ocelos,

órganos genitales bien desarrollados y dos pares de alas. Por lo general, la hembra es más grande que el macho, y además posee órganos genitales externos visibles e inequívocos (Fig. 9). El tamaño es una característica clave y varía según la subfamilia de 5-45 mm (Beaver 1994). Estos insectos son hematófagos obligados, ambos sexos se alimentan de sangre en sus cinco estadios ninfales lo que duplica su potencial transmisor de *T. cruzi*. En la actualidad, al transformarse la ecología, los hábitos de estos insectos también han cambiado, y algunos de ellos, como *Triatoma infestans* y *T. barberi*, realizan todo el ciclo dentro de la habitación humana, por lo que el riesgo de adquirir la infección es mucho mayor (Canale 1985, Salazar-Schettino 1988).

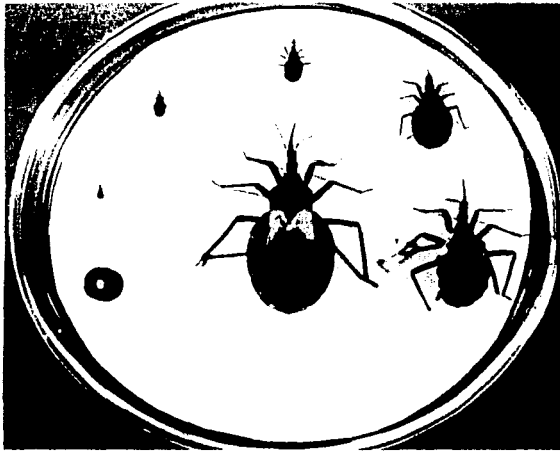


Figura 9 Diferentes estadios de desarrollo de *Triatoma phyllosoma pallidipenis*

La saliva del insecto induce reacciones de hipersensibilidad que se acompañan por prurito, eritema y edema. La importancia de este mecanismo se pone de manifiesto después de la picadura por el prurito intenso que contribuye al éxito de la infección por *T. cruzi* (Sherlock 1979a).

T. dimidiata, es el triatómino más importante en la transmisión de *T. cruzi*, tiene una distribución geográfica desde el norte de Perú al sureste de México. Su estudio ha contribuido al conocimiento del ciclo biológico del triatómino, longevidad del adulto, relación con clima y altura sobre el nivel del mar (Zeledon 1981).

10.- Enfermedad en el hombre.

FASE AGUDA.

En la fase aguda de la enfermedad de Chagas se desarrolla una lesión inflamatoria en el sitio de picadura, llamada chagoma y el proceso infeccioso se disemina localmente a los ganglios dando lugar a una linfadenopatía. En las células del sistema reticuloendotelial, se desarrollan ciclos asincrónicos de multiplicación de parásitos, destrucción celular y nuevas infecciones de células susceptibles. La mayoría de los pacientes, que desarrollan la fase aguda de la enfermedad de Chagas, no presentan sintomatología (Tanowitz y col. 1992). Sin embargo, los niños y con menor frecuencia los adultos que desarrollan síntomas, los presentan de 7 a 14 días postinfección. La sintomatología incluye edema bpalpebral unilateral y conjuntivitis (signo de Romana-Mazza) como resultado de la contaminación de los ojos con la materia fecal que contiene los tripomastigotes metacíclicos. Adicionalmente, se puede encontrar fiebre, hepatoesplenomegalia, náusea, vómito, diarrea, exantema, anorexia e irritabilidad meníngea.

Un pequeño número de pacientes con enfermedad de Chagas aguda desarrolla miocarditis severa, que se caracteriza por focos de necrosis y degeneración acompañada de células inflamatorias y miofibrillas parasitadas. Entre las fibras degeneradas puede encontrarse un exudado inflamatorio mixto constituido por leucocitos polimorfonucleares, células mononucleares y pseudoquistes de amastigotes de *T. cruzi* (Tanowitz 1992).

La miocarditis se hace evidente clínicamente y puede incluir taquicardia, falla cardiaca congestiva y cardiomegalia (Rassi 1979; Shikanai-Yasuda 1990; Ribeiro dos Santos 1992). En algunos pacientes, el electrocardiograma muestra prolongación en el intervalo P-R, cambios no específicos en la onda T. La aparición de arritmias, bloqueo y falla cardiaca congestiva progresiva durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas es de pronóstico reservado. Un número reducido de individuos con infección aguda muere de complicaciones asociadas a miocarditis aguda o meningoencefalitis. Es importante resaltar que la mayoría de los pacientes con enfermedad aguda se recuperan completamente a los 3-4 meses y la mayoría ignoran haber desarrollado la enfermedad aguda. En los pacientes que mueren durante la fase aguda, se demuestra fácilmente la presencia de nidos de amastigotes en células cardíacas, músculo liso y

esquelético así como en células gliales (Tanowitz 1992). Entre las anomalías reportadas en el laboratorio también se encuentran anemia, trombocitopenia, leucocitosis con predominio de linfocitos y niveles elevados de enzimas cardíacas (Tanowitz 1992).

Fase indeterminada.

Esta fase comienza 8 a 10 semanas después de la fase aguda y puede durar varios años o indefinidamente. Se caracteriza por la ausencia de síntomas y el enfermo tiene plena capacidad para realizar actividades físicas, los electrocardiogramas y las radiografías del tórax son aparentemente normales. Sin embargo, las pruebas serológicas son positivas a *T. cruzi*, y las parasitemias que no son detectables por métodos parasitológicos directos pueden detectarse por xenodiagnóstico en el 20 al 60% de los casos. Durante esta etapa, la mayoría de los pacientes no tienen síntomas y constituyen un importante reservorio de la infección (Shikanai-Yasuda 1990, OMS 1991).

Fase crónica.

El 30% de las personas asintomáticas desarrollarán daño cardíaco, digestivo o neurológico de 10 a 20 años después de haber contraído la enfermedad mientras que, los demás infectados, no manifestarán ninguna alteración orgánica (OMS 1991).

Cardiopatía.

Durante la fase crónica de la enfermedad, se pueden presentar arritmias, eventos tromboembólicos (Oliveira y col. 1983) o falla cardíaca congestiva. Con relativa frecuencia se encuentra aneurisma apical en el ventrículo izquierdo (Oliveira 1981).

Las manifestaciones clínicas dependen del grado de daño miocárdico, la presencia de arritmias y el grado de insuficiencia cardíaca. Los síntomas más frecuentes son: palpitaciones, mareos, síncope, disnea, edema y dolor pectoral. Mediante radiografías de tórax, se puede determinar el grado de cardiomegalia, y a través del electrocardiograma se pueden apreciar los defectos típicos en la conducción ventricular y arritmias. Los defectos más comunes de la conducción ventricular, que pueden ser aislados o combinados, son el bloqueo de rama derecha y el hemibloqueo anterior

izquierdo. Pueden presentarse diferentes grados de defectos de conducción auriculoventricular (A-V). Las complicaciones más importantes son el embolismo sistémico y pulmonar y la muerte súbita (Laranja 1956).

En la enfermedad de Chagas crónica puede presentarse casi cualquiera de las variedades de arritmia. Con frecuencia aparecen el síndrome de alteración sinusal con bradicardia sinusal y bloqueo senoauricular y extrasístoles ventriculares precoces. Estos últimos son, por lo general, polimórficos y aparecen aislados, en pares, o en episodios de taquicardia ventricular de duración variable. La taquicardia ventricular sostenida puede causar trastornos hemodinámicos que pueden ser mortales. De las arritmias ventriculares, la fibrilación ventricular es la más importante y probablemente sea el mecanismo más frecuente de muerte súbita en pacientes chagásicos crónicos (Andrade y Grimaud 1986). Se puede presentar también infartación miocárdica que puede ser debido a un proceso embólico de un aneurisma apical izquierdo. (Bestetti y col 1989; Marín-Neto 1990). La imagen resonancia magnética y la cineangiocoronariografía muestran diferentes grados de diquinesia o aquinesia ventricular y en muchos casos un aneurisma típico de la punta del ventrículo izquierdo. (OMS 1991).

Forma digestiva.

Cualquier porción del tracto digestivo puede estar afectada en la enfermedad de Chagas crónica, los segmentos más comúnmente afectados son el esófago y el colon. La enfermedad crónica gastrointestinal se encuentra asociada con una disminución de los plexos de Auerbach y Meissner. Adicionalmente, existen lesiones preganglionares y reducción en el número de células dorsales del núcleo motor del vago. Esto es debido a la pérdida paulatina de neuronas del plexo esofágico, lo que sugiere que no todo el daño al sistema nervioso autónomo ocurre durante la infección aguda (Koeberle 1968; Tanowitz y col.1992).

El desarrollo de la enfermedad gastrointestinal crónica puede tomar varias décadas, y aún se desconocen los factores involucrados. Koeberle (1968) ha demostrado que la enfermedad colónica en la enfermedad de Chagas se asocia con una pérdida del 50% de neuronas y en la enfermedad esofágica hasta del 85%. Estudios realizados en autopsias revelaron una incidencia

entre el 1 y 35% de megacolon y megaesófago, y 5.8% de cardiopatías (Chapadiero y col. 1964; Barbara y col.1970).

Diagnóstico.

El diagnóstico de la infección por *T.cruzi* en la fase aguda de la enfermedad de Chagas se establece mediante la observación del parásito en sangre. Los tripomastigotes se observan con movimientos activos desplazando a los eritrocitos. Se recomienda realizar gota gruesa, frotis y tinción con Giemsa ó Wright para determinar las características morfológicas del parásito. Otro método consiste en cultivarlos a partir de 1 a 5 ml de sangre en medio de Novy, Nicolle y McNeal (NNN), LIT, Grace u otros. Con este método se obtienen buenos resultados en la etapa final de la fase aguda cuando empiezan a disminuir los tripomastigotes en la sangre del paciente. Otros métodos incluyen: la inoculación de sangre en animales de experimentación, en particular el ratón blanco, que es susceptible a la infección por *T.cruzi* y en el cual, a partir del décimo día, se podrán observar los tripanosomas en la sangre del ratón (Botero y Restrepo 1998).

El xenodiagnóstico es un método que permite detectar tripomastigotes, empleando ninfas de triatóminos criadas en el laboratorio, las cuales se depositan sobre el antebrazo del paciente, para que ingieran sangre y posteriormente, se buscan los parásitos en las heces de las chinches. Este procedimiento es sumamente sensible para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la fase aguda, pero solamente es positivo para el 50% de los pacientes con enfermedad crónica (Tanowitz y col.1992).

También existen técnicas que detectan al parásito en el sitio de la lesión como el PCR e hibridación *in situ*. (Zhang y Tarleton 1999).

12- Patogenia.

En la enfermedad de Chagas no se conoce bien el mecanismo del daño observado en el esófago, colon y corazón. Debido a que es de tipo inflamatorio se han propuesto 2 hipótesis. La hipótesis autoinmune postula que el daño es generado a través de una reacción inflamatoria y que la infección induce una respuesta autoinmune (Theofilopoulos 1995). El principal argumento que

apoya esta hipótesis es el hecho de que existen signos evidentes de la enfermedad en los tejidos en ausencia de los parásitos (Andrade y col. 1986; Tarleton 2001). Se tiene evidencia de que una vez que el parásito desaparece de la circulación, no se encuentra en los sitios de inflamación, pero si se encuentran antígenos de secreción (De Titto y col., 1995; Higuchi y col. 1997). Esta observación, probablemente sugiera que la respuesta inflamatoria presente en pacientes chagásicos inicialmente es inducida por *T.cruzi*, generando autoanticuerpos que cruzan con antígenos del huésped, por lo que el sistema inmunológico genera una respuesta contra sí mismo. Esto explicaría la presencia de autoanticuerpos y linfocitos en huéspedes infectados por *T.cruzi* y otras características de la enfermedad como el retardo en su establecimiento, el tropismo en órganos y su espectro (Fernández y col. 1992; Tarleton 2001). Por otro lado, Bonfa y col (1993) han reportado la presencia de un anticuerpo anti-ribosomal que cruza con una proteína ribosomal de *T.cruzi*, sugiriendo que este anticuerpo podría ser inducido por mimetismo molecular. También se ha descrito la presencia de anticuerpos contra otra proteína ribosomal P2 de *T. cruzi* que participa en la patología cardíaca crónica en la enfermedad de Chagas (Sepúlveda 2000).

La segunda hipótesis postula, que los antígenos del parásito por sí mismos o formando complejos con otras proteínas activan células que participan en la inflamación (Morrot y col. 1997; Zhang y Tarleton 1999). Los complejos inmunes formados por antígenos unidos a su anticuerpo son capaces de promover la inflamación a través de macrófagos (Roitt y col. 1998). Algunos antígenos de *T.cruzi* generan una respuesta de tipo humoral durante la fase crónica y debido a que se encuentran en los sitios de inflamación, existe la posibilidad que formen complejos inmunes que a su vez promueven el aumento de volumen y distrofia del esófago, colon y corazón (Higuchi y col., 1997; Morrot y col., 1997; Reis y col., 1997).

II. Antecedentes.

a) Observación de epimastigotes de *T.cruzi* en huéspedes mamíferos.

Se ha estudiado ampliamente la fase de epimastigote de *T.cruzi* en el intestino del insecto vector, así como en medio de cultivo. Sin embargo, la presencia de esta fase en el huésped mamífero es controversial. En la literatura, existen reportes sobre una forma intracelular parecida al

epimastigote en mamíferos que antecede a la fase de tripomastigote (Weryon 1926; Hoare 1972; Gutteridge y Rogerson 1979; Mehlhom 1987; Andrews y col.1988; Faucher 1995 y col.; Silva Pinto y col 1999; Almeida-de-Faria y col. 1999., Tyler 2001).

En improntas de corazón de ratón infectado con *T.cruzi*, hemos observado epimastigotes fuera de las células identificados morfológicamente por la posición del cinetoplasto anterior al núcleo, su forma fusiforme y la ausencia de membrana ondulante.

c) Apoptosis en epimastigotes de *T.cruzi*.

La muerte celular por apoptosis es un fenómeno biológico encontrado en organismos eucariontes. Estudios realizados por Billut-Mullot y col. (1996) mostraron que *T.cruzi* autorregula su crecimiento y que los epimastigotes proliferantes en cultivo de *T.cruzi* sufren muerte masiva por apoptosis durante la fase estacionaria de crecimiento. La muerte puede ser prevenida o acelerada modificando las condiciones de cultivo.

Durante la fase estacionaria, una gran proporción de epimastigotes, se diferencia hacia tripomastigotes metacíclicos, lo mismo se observa en el vector triatómino. Esto sugiere que, en un ambiente sin nutrientes parecido al de los cultivos estacionarios, existe una presión selectiva sobre el parásito, que induce una forma infectante. El agotamiento de nutrientes en el medio de cultivo propicia una selección de epimastigotes que se diferencian a tripomastigotes metacíclicos infectantes, mientras que un número significativo de epimastigotes muere. Los parásitos muertos aparecen como células esféricas con un largo flagelo y muestran patrones citoplásmicos nucleares típicos de apoptosis con los característicos patrones de fragmentación de ADN .

También existe evidencia de muerte por apoptosis en epimastigotes expuestos al daño inmunológico mediado por complemento (Ameisen y col 1995).

III.- Hipótesis.

Los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* son susceptibles a lisis por anticuerpos y complemento. Los anticuerpos aglutinan a los parásitos en ausencia de complemento y es posible que este fenómeno de aglutinación mate a los parásitos..

IV.-Objetivos.

- 1.- Identificar a epimastigotes en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.
- 2.- Analizar los daños ultraestructurales en epimastigotes de *T.cruzi* expuestos a sueros inmunes de complementados de ratón y conejo.
- 3.- Estudiar el mecanismo de muerte de epimastigotes de *T.cruzi* crecidos *in vitro* cuando son expuestos a anticuerpos específicos.

V. Material y Métodos.

Se obtuvo un aislado de *T.cruzi* de heces de *Triatoma barberi* en el Estado de Querétaro, que se ha mantenido en cultivo y en ratones blancos en el laboratorio de Parasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM desde 1990.

a) Animales experimentales.

Se trabajó con ratones de la cepa CD-1 del sexo femenino, de 4 semanas de edad y de 20 ± 2 g de peso. Se utilizaron además conejos cepa Nueva Zelanda del sexo masculino, de 16 semanas de edad y de 3 ± 0.5 kg de peso. Los animales se mantuvieron bajo un fotoperíodo 12 h luz y 12 h de obscuridad; temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$; humedad $55 \pm 10\%$, y se les administró agua y alimento comercial Purina.

b) Cultivo de epimastigotes.

Los epimastigotes se cultivaron en medio RPMI 1640 (GIBCO; Grand Island, New York), suplementado con 10 ml de penicilina 10U/ml, 25 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland) 10 ml de L-glutamina 200 mM (Sigma St.Louis,MO) y 10% de suero fetal bovino de complementado (GIBCO; Grand Island, New York) a 28°C . Entre los 5 y 8 días se llegó de la fase logarítmica de crecimiento (Powell y Kunh 1980) (Fig. 10). Los parásitos se cosecharon por centrifugación ($750 \times g$ durante 20 min, a 4°C), y se lavaron tres veces en PBS pH 7.4 por centrifugación en las mismas condiciones.

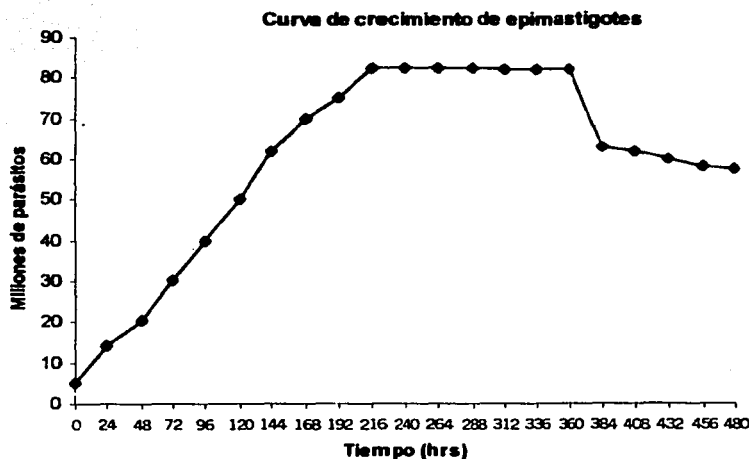


Figura 10. Curva de crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

c) Preparación del extracto crudo de antígenos.

Los parásitos se homogenizaron mediante 7 ciclos de congelación a -82°C , descongelación y sonicación por 10 minutos (Sonicador, Ladd, 50/60 cycles, ME 21). La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (1951).

d) Obtención de sueros inmunes.

Suero inmune de ratón

Se inocularon 100 ratones de la cepa CD-1 durante 6 semanas a intervalos de 8 días con el extracto crudo ($100\ \mu\text{g} / 50\ \mu\text{l}$ en PBS) por vía intraperitoneal. En la primera inmunización, se agregó adyuvante completo de Freund volumen a volumen y en la segunda, adyuvante incompleto de Freund. Se administraron 4 refuerzos solo con el antígeno. A la séptima semana se obtuvieron los sueros por punción cardíaca, se les determinó la presencia de anticuerpos por ELISA (Buttler y col. 1978) y se guardaron a -20°C . Como controles se utilizaron los sueros de los mismos ratones obtenidos por punción retroorbital antes de la primera inmunización (Cuadro 1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 1. Esquema de inmunización de 100 ratones cepa CD-1 de 4 semanas de edad.

Semana	Adjuvante Freund (μ l)	Antígeno (μ l)	Concentración (μ g)
1	Completo 50	50	100
2	Incompleto 50	50	100
3	—	50	100
4	—	50	100
5	—	50	100
6	—	50	100

* Vía de inoculación: intraperitoneal

Suero inmune de conejo.

Se inocularon 6 conejos durante 8 semanas a intervalos de 10 días por vía subcutánea en sitios diferentes del dorso. La concentración de antígeno fue de 300 μ g/500 μ l en PBS. En la primera inmunización, se agregaron 500 μ l de adjuvante completo de Freund y en la segunda, adjuvante incompleto y antígeno v/v. Se administraron 6 refuerzos aplicando el antígeno en PBS (Cuadro 2). A la novena semana se sangraron por la vena marginal de la oreja, se obtuvo el suero y se determinó la presencia de anticuerpos por ELISA (Butler y col.1978). Se hicieron alicuotas de los sueros y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Parte de los sueros controles e inmunes de ratones y conejo se decomplementaron por calentamiento a 56°C durante 30 min.

Cuadro 2. Esquema de inmunización de 6 conejos Nueva Zelanda de 6 semanas de edad .

Semana	Adyuvante (μ l) Freund	Antígeno (μ l)	Concentración (μ g)
1	Completo 500	500	300
2	Incompleto 500	500	300
3	—	500	300
4	—	500	300
5	—	500	300
6	—	500	300
7	—	500	300
8	—	500	300

Vía de inoculación: subcutánea.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

e) Improntas de corazón de ratón infectado con *Trypanosoma cruzi*.

Improntas.

Se infectaron, por vía intraperitoneal, 5 ratones hembras de la cepa CD-1 de 4 semanas de edad con 1×10^6 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* obtenidos de ratones previamente infectados con la cepa Querétaro. Catorce días después de la infección, los animales se sacrificaron por desnucamiento y se obtuvieron los corazones. Se cortó el corazón en 2 mitades y se tomaron impresntas en portaobjetos limpios y desengrasados. La improntas se tñieron con Giemsa y se observaron al microscopio de luz (Nikon Optiphot).

f) Determinación de las alteraciones de epimastigotes incubados con los sueros.

Se utilizaron dos criterios distintos para estudiar el daño o muerte de los epimastigotes de *T. cruzi*: la exclusión de azul de tripano y los cambios morfológicos del parásito. Los epimastigotes expuestos a sueros normales o inmunes de ratón ó conejo con ó sin complemento se contaron a diferentes tiempos de incubación en un hemocitómetro en el microscopio de luz. Los

epimastigotes redondeados y sin movilidad, y los que se tiñeron con azul tripano (0.4%) (Sigma Chemical, St. Louis MO)) se consideraron muertos (Boyse y col. 1964).

Análisis en microscopio de luz.

Los epimastigotes obtenidos en la fase logarítmica de crecimiento, se lavaron 3 veces en RPMI 1640 por centrifugación (750 x g por 20 min). Se incubaron en 50 μ l de la suspensión de parásitos (5×10^5) en tubos Eppendorf durante 5, 30 y 60 min a 37°C con 100 μ l de sueros de ratón y conejo diluidos 1:100 con o sin complemento. Después de la incubación, se depositaron en portaobjetos alcuotas de 150 μ l de epimastigotes, se secaron al aire, se tiñeron con Giemsa y se observaron. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis en microscopio electrónico.

Suspensiones de parásitos (5×10^6) en 50 μ l se incubaron durante 5, 30 ó 60 min a 37°C con 100 μ l de suero (ratón ó conejo) diluidos 1:100 con o sin complemento. Después de la incubación, se lavaron 3 veces por centrifugación con medio de cultivo a 4°C, se fijaron primero en solución de Karnovsky (1000 mOsm/kg) durante 1 hora a temperatura ambiente (Karnovsky, 1965), se lavaron en amortiguador de cacodilatos 0.1M, se postfijaron con tetraóxido de osmio 1%, se deshidrataron y se incluyeron en resina poly/bed 812/DMP30 (Polysciences, Warrington Pennsylvania). Se prepararon cortes finos (40-50 nm) con una navaja de diamante en un microtomo Reichert S, los cortes se depositaron en rejillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo en 0.1% de NaOH (Reynolds, 1963). Los cortes se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1200 EXII.

g) Medición del hinchamiento de membranas de epimastigotes de *T. cruzi*.

Para el análisis de los cambios en membranas, se midieron las distancias entre la doble bicapa de las membranas del núcleo, de la plasmática, del cinetoplasto y de la mitocondria en más de 200 parásitos controles y experimentales con un lente amplificador 7x (Buasch & Lomb) en micrografías de 60000 x. Se realizaron 3 mediciones de cada membrana. Para la medición de los núcleos, se tomó el diámetro mayor en micrografías de luz a un aumento de 400 x.

h) Análisis estadístico.

Los resultados de las mediciones se analizaron por análisis de varianza (ANOVA). La comparación entre los grupos se realizó con la prueba de Student Newman-Keuls. Se consideró significativo una diferencia de $p < 0.05$. Se utilizó el programa InStat Statistical program (GrapPad San Diego, California).

i) Incorporación de timidina-[³H] tritiada en epimastigotes de *T. cruzi*.

Para determinar proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi*, los parásitos se incubaron con sueros de ratón normal e inmune de complementado y diluido en PBS 1:1, 1:5 o 1:10 y con 1.0 μ Cl de [³H]-timidina (74 Gbq mmol⁻¹ICN, Irvine CA) a diferentes tiempos (0.5, 24 y 48 hrs). Los parásitos se cosecharon en filtros de fibra de vidrio (Whatman 934-AH) y se lavaron con agua destilada en un cosechador automático múltiple (Nunc, Denmark). La incorporación de timidina se cuantificó en un contador de centelleo (Beckman LS 6000 TA, Inc., Fullerton, USA). Los datos de cada condición se expresan como la media de cpm \pm DE.

j) Análisis de apoptosis por citometría de flujo.

Para determinar la apoptosis se utilizó un estuche comercial (Boehringer-Mannheim). Los epimastigotes (5×10^5) se incubaron con sueros controles e inmunes de complementados de ratón (dilución 1:10) durante 5, 30 y 60 min. Después del tiempo de incubación, se lavaron dos veces por centrifugación con PBS/BSA 1% (750 x g por 10 min). Se fijaron con solución de paraformaldehído 4% en PBS pH 7.4 a temperatura ambiente por 30 min y se lavaron por centrifugación en PBS pH 7.4 a 750 x g durante 10 min. Se permeabilizaron con 0.1% tritón 100 en 0.1% de citrato de sodio a 4°C por 2 min y se lavaron dos veces mas con PBS pH 7.4 durante 10 min. Finalmente, se resuspendieron en una solución que contenía dUTP (deoxiuridín trifosfatos) y tDt (deoxinucleotidil-transferasa). Se incubaron a 37°C durante 60 min, se lavaron en PBS pH 7.4 y se analizaron en un citometro de flujo FACS Calibur (Beckton Dickinson). Se analizaron 10,000 eventos por cada condición experimental.

VI.- Resultados

a) Observación de epimastigotes de *T. cruzi* en improntas.

Se observaron formas fusiformes de epimastigotes de *T. cruzi* en improntas de corazón de ratones infectados, que se distinguen morfológicamente de la fase de tripomastigotes por el cinetoplasto localizado en la parte anterior del parásito y el flagelo que emerge de la parte anterior de los epimastigotes (Fig. 11a, b).

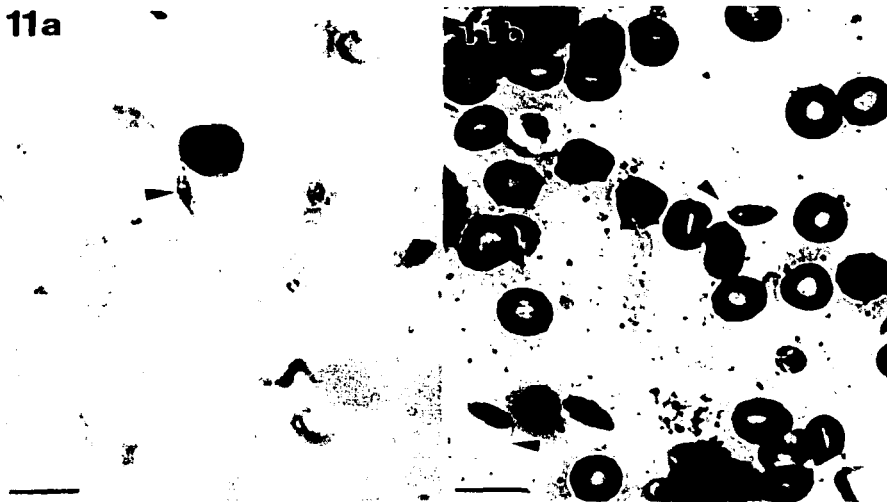


Figura 11. Improntas de corazón de ratón infectado con *Trypanosoma cruzi*. a) Se muestra claramente la fase de epimastigote con forma fusiforme y el cinetoplasto localizado en la parte anterior del cuerpo del parásito (flecha). Barra =10 μ m. b) Se observa el flagelo de epimastigote de *T. cruzi* (flecha). Barra =10 μ m

b) Incubación de epimastigotes con sueros de ratón.

Observaciones por microscopía de luz.

Los epimastigotes incubados con suero inmune de ratón de complementado durante 5 min se aglutinaron formando redes (Fig. 12a), imágenes similares se observaron a los 30 y 60 min de incubación. Se consideraron muertos los parásitos que perdían su movilidad, se redondeaban y se teñían con azul tripano. Es importante resaltar que, a pesar de que la aglutinación de los parásitos eran casi inmediata al adicionarle los sueros inmunes, no todos los epimastigotes morían.

Los parásitos incubados durante 5, 30 o 60 min con sueros inmunes en presencia de complemento, mostraron un patrón mas compacto de aglutinación a medida que transcurría el tiempo de incubación los conglomerados aumentan de tamaño (Fig. 12b). Los parásitos incubados a diferentes tiempos con suero normal con complemento o sin complemento permanecieron en suspensión (Fig. 12c, d).

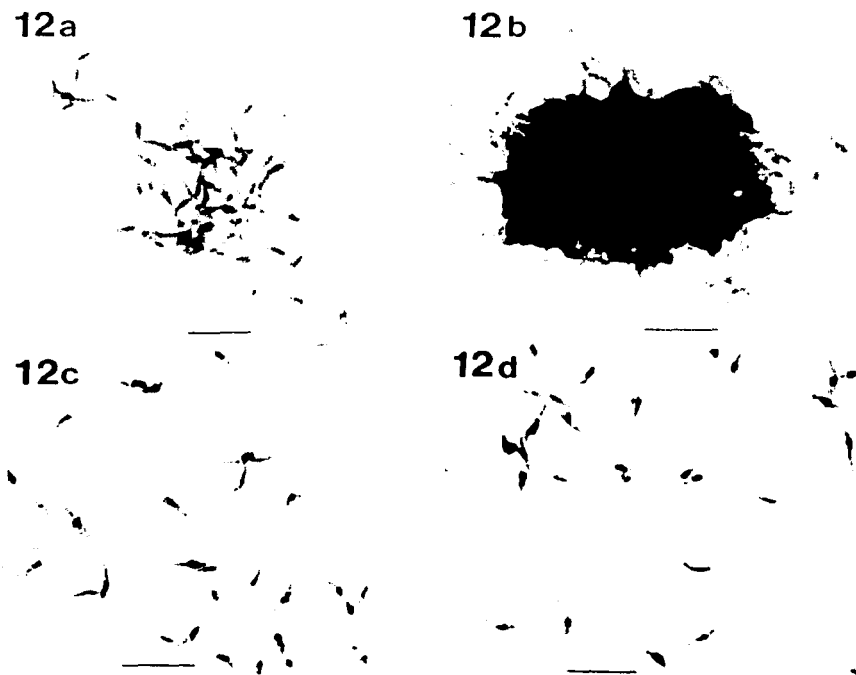


Figura 12. Micrografías de epimastigotes incubados a 37°C durante 30 min con suero de ratón. A) Suero inmune de complementado donde se observan los parásitos aglutinados en forma de redes. b) Suero inmune con complemento, se muestra a los epimastigotes estrechamente aglutinados. c) Suero normal de complementado, los parásitos no se encuentran aglutinados d) Suero normal con complemento, los epimastigotes se encuentran en suspensión.

c) Incubación de epimastigotes con sueros de conejo.

Observaciones por microscopía de luz.

Los parásitos incubados con suero inmune de conejo de complementado durante 5, 30 o 60 min se aglutinaron formando redes (Fig. 13a), mientras que los epimastigotes incubados con sueros

inmunes en presencia de complemento forman masas compactas (Fig. 13b). La incubación de epimastigotes con suero normal de conejo de complementado a diferentes tiempos indujo la aglutinación de parásitos, los que formaron redes que incrementaron su tamaño en función del tiempo de incubación (Fig. 13c). Los parásitos incubados con suero normal de conejo formaron aglutinados compactos que incrementaron su tamaño a lo largo del tiempo de incubación (Fig. 13d). Todos los parásitos aglutinados se tiñeron con el colorante azul de tripano. Algunos epimastigotes se lisaron en presencia de sueros inmunes de ratón o conejo con complemento.

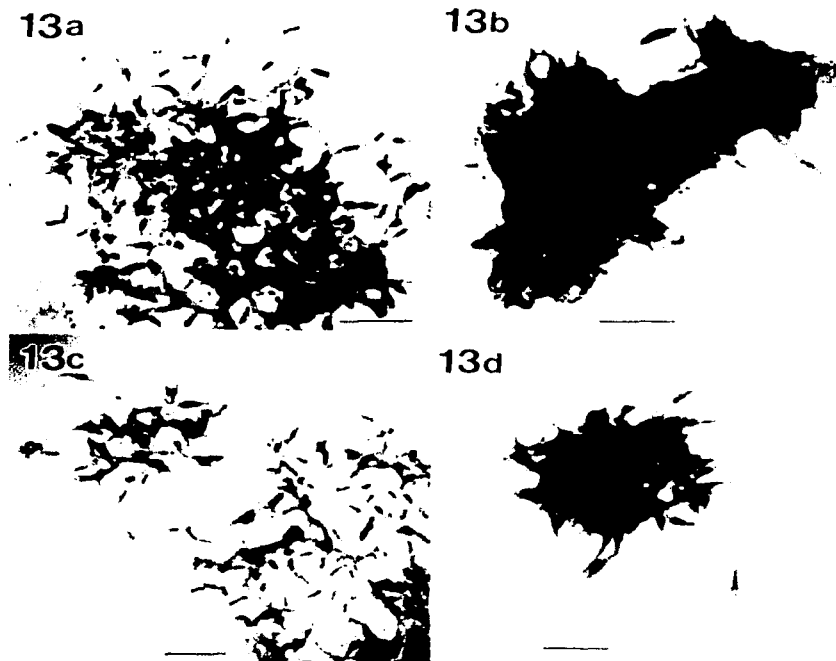


Figura 13. Micrografías de epimastigotes incubados a 37°C durante 30 min con suero de conejo. a) Suero inmune de complementado, se observan los parásitos aglutinados en forma de redes. b) Suero inmune con complemento, se muestran los epimastigotes estrechamente aglutinados c) Suero normal de complementado, los parásitos no se encuentran aglutinados. d) Suero normal con complemento, los epimastigotes se encuentran aglutinados formando masas compactas. Barra = 10 μ m.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

d) Incubación de epimastigotes con sueros de ratón.

Observaciones por microscopía electrónica.

Los epimastigotes incubados durante 5 y 30 min con suero inmune de ratón decomplementado se aglutinaron, observándose fusión de los microtubulos subpeliculares y de la membrana plasmática en los sitios de unión de 2 o más parásitos. Las cisternas del aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y el cinetoplasto se observaron hinchados. También se observó condensación y disminución de la heterocromatina nuclear y a los 60 min de incubación, ya no fue posible observar las membranas nucleares, ni el aparato de Golgi o retículo endoplásmico (Fig. 14a).

Las alteraciones observadas en epimastigotes incubados con suero inmune de ratón con complemento a diferentes tiempos fueron similares a las descritas con suero inmune decomplementado (Fig. 14 b,b').

Los epimastigotes incubados con suero normal de ratón decomplementado y con complemento no presentaron daño aparente a ninguno de los tiempos de incubación; el cinetoplasto, el núcleo y la membrana nuclear se observaron bien preservadas (Fig. 14c). Los epimastigotes incubados en medio de cultivo RPMI se encontraron siempre en suspensión, la membrana plasmática, los microtúbulos, las cisternas del aparato de Golgi, mitocondria, cinetoplasto y flagelo se observaron normales. Los parásitos presentaban vacuolas electrodensas de diferentes tamaños, que corresponden a los acidocalcisomas descritos por Docampo y Moreno (1999) (Fig. 14d).

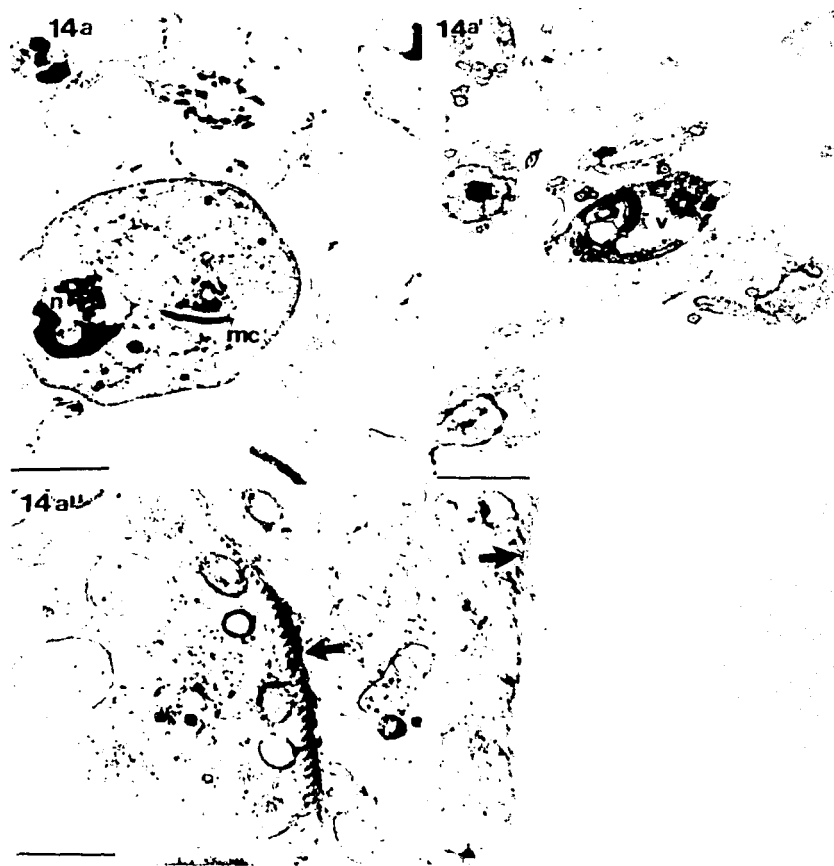


Figura 14a. Micrografía electrónica de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* incubados durante 30 min con suero de ratón. a) Suero inmune de complementado: se observa una disminución en la electrodensidad del citoplasma, el núcleo picnótico (n) y la membrana del cinetoplasto (mc) hinchada Barra= 1.8 μm . a') Suero inmune de complementado: se observan los parásitos dañados, con pérdida del material citoplásmico, así como la presencia de grandes vacuolas (v) aparentemente vacías. Barra =2 μm . a'') Suero inmune de complementado: se observa claramente la fusión de microtubulos (flecha) y de la membrana plasmática en los sitios de unión de varios parásitos. Barra=0.5 μm .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 14b. Micrografía electrónica de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* incubados durante 30 min con suero de ratón. b) Suero inmune con complemento: se observa el aparato de Golgi (g), la membrana del cinetoplasto (mc), la mitocondria (m) y el retículo endoplásmico (re) hinchados así como pérdida de material citoplásmico. Barra = 0.4 μ m. b') Suero inmune con complemento: el cinetoplasto (k) se encuentra dañado, se observa condensación y disminución de la heterocromatina nuclear y cambios en la forma del núcleo (n). Barra= 0.82 μ m.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 14c y d. Micrografía electrónica de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* incubados durante 30 min. c) Suero normal con complemento: los parásitos se encuentran normales, se observa el cinetoplasto (k), núcleo (n), la mitocondria (m), y el saco flagelar (sf) Barra= 1.4 μm . d) Epimastigotes incubados en RPMI: se observa el núcleo (n), aparato de Golgi (G), cinetoplasto (k), y el saco flagelar (sf) bien preservados. Acidocalcisomas (A). Barra = 0.4 μm .

e) Incubación de epimastigotes con sueros de conejo.

Observaciones por microscopía electrónica.

Las imágenes observadas de epimastigotes incubados con suero inmune de conejo de complementado durante 5, 30 o 60 min mostraron daño ultraestructural en los parásitos, similar a los descritos con la incubación de parásitos con suero de ratón. Además, se pudo observar iruptura de las membranas nucleares y del cinetoplasto, picnosis nuclear, hinchamiento del cinetoplasto y de la mitocondria. Los microtúbulos se observaron a lo largo de todo el tiempo de incubación, la electrodensidad del citoplasma gradualmente disminuyó (Fig 15a).

Los parásitos incubados con suero inmune de conejo con complemento mostraron cambios similares a los descritos con suero de complementado, los parásitos se aglutinaron en presencia de los sueros durante los diferentes tiempos de incubación. A los 30 min, se observó que la superficie del parásito estaba cubierta con un material amorfo y la formación de vesículas de la

membrana plasmática de algunos parásitos, que aumentaron en número en función del tiempo de incubación (Fig. 15 b).

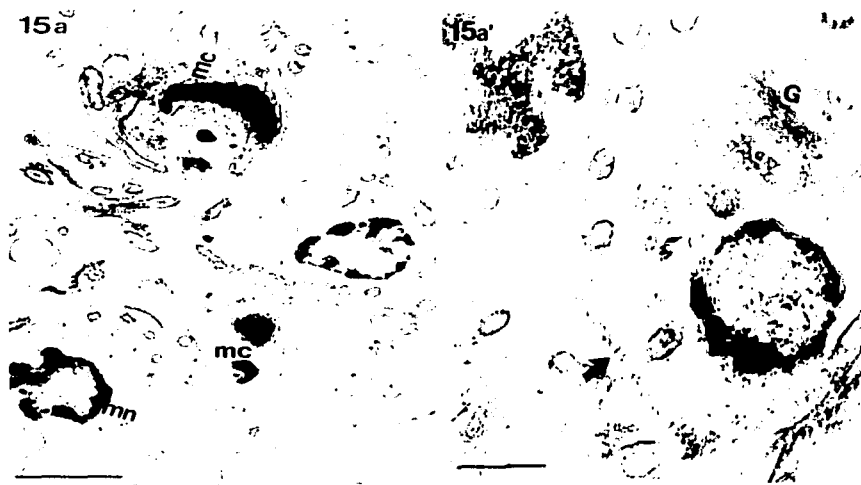


Figura 15a. Micrografía electrónica de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* incubados durante 30 min con suero de conejo. a) Suero inmune deconplementado: se observa discontinua la membrana nuclear (mn) y del cinetoplasto (mc) y pérdida del material citoplásmico. Barra = 1.2 μm . a') Suero inmune deconplementado: se observa la fusión de microtúbulos y de la membrana plasmática de 2 parásitos (flecha), el aparato de Golgi (G) se observa bastante dañado. Barra= 5.6 μm .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

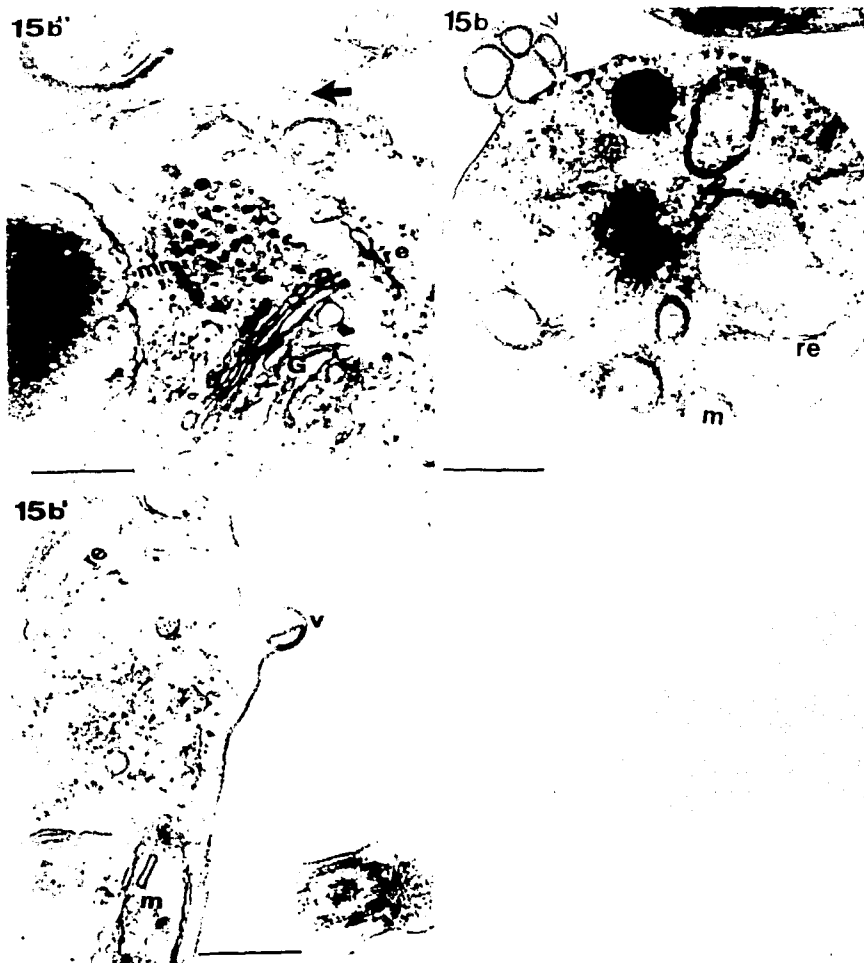


Figura 15b. Micrografía electrónica de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* incubados durante 30 min con suero de conejo. b) Suero inmune con complemento: se observan vesículas en la membrana plasmática (v), el retículo endoplásmico (re) y la mitocondria (m) están hinchados. Barra = 0.4 μ m. b') Suero inmune con complemento: se observa el retículo endoplásmico (re) y la mitocondria (m) hinchados, disminución en la electrodensidad del citoplasma y la formación de vesículas de la membrana plasmática (v). Barra = 0.26 μ m. b'') Suero inmune con complemento: el aparato de Golgi (G), la membrana nuclear (mn), y el retículo endoplásmico (re) están hinchados. Se observa un depósito amorfo entre las membranas plasmáticas de 2 parásitos (flecha). Barra = 0.2 μ m.

Los epimastigotes incubados con suero normal de conejo de complementado durante 5, 30 y 60 min también se aglutinaron, los parásitos estaban en contacto pero no se observó fusión de microtúbulos y de membranas ni alteración ultraestructural (Fig. 15c).

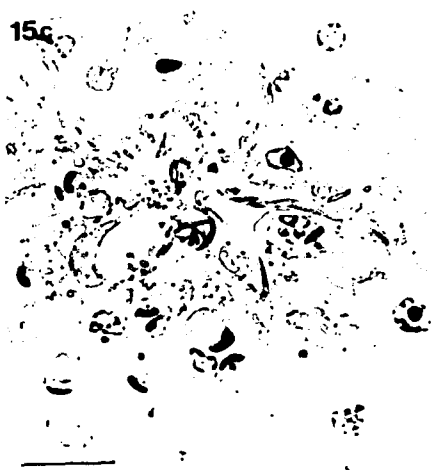


Figura 15c. Micrografía electrónica de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* incubados durante 30 min con suero normal de conejo de complementado. Los parásitos se observan aglutinados sin fusión de membranas y microtúbulos. Barra= 1.72 μm .

Los parásitos incubados con suero normal de conejo con complemento se aglutinaron con fusión de las membranas de 2 o más parásitos. Se observó hinchada las membranas plasmáticas, la nuclear; el cinetoplasto, la mitocondria y el retículo endoplásmico (Fig. 15d).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

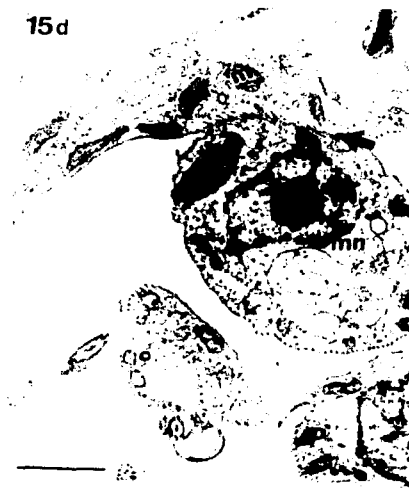


Figura 15d. Micrografía electrónica de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* incubados durante 30 min con suero normal de conejo con complemento. Se observa separación de la membrana nuclear (mn), la mitocondria (m) se observa hinchada y hay fusión de microtúbulos y de la membrana plasmática entre los 2 parásitos (flecha). Barra = 1 μ m.

f) Análisis de membranas de organelos.

El principal patrón de cambio observado en epimastigotes incubados con sueros inmunes decomplementados fue un aumento en grosor de las membranas de la mitocondria ($p < 0.001$), cinetoplasto ($p < 0.001$), núcleo ($p < 0.001$) y membrana plasmática, ($p < 0.05$) comparadas con epimastigotes incubados con sueros normales decomplementados. El análisis de las alteraciones ultraestructurales resultó altamente significativo (Tabla 3). No se encontró diferencia significativa entre epimastigotes incubados con sueros normales decomplementados y epimastigotes incubados en medio de cultivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 3

Análisis estadístico del hinchamiento en membranas.

Epimastigotes incubados con:	Plasmática		Membranas Mitochondria		Cinetoplasto		Núcleo	
	(N)	(H)	(N)	(H)	(N)	(H)	(N)	(H)
	© Media nm ± DE		© Media nm ± DE		© Media nm ± DE		© Media nm ± DE	
Suero normal de ratón decomplementado	(198)	(16)	(189)	(30)	(170)	(30)	(174)	(33)
	3.24 ± .43		8.41 ± 1.60		9.12 ± 2.92		10.55 ± 1.06	
Suero inmune de ratón decomplementado	(115)	(96)	(80)	(180)	(96)	(111)	(127)	(98)
	4.46 ± .64*		12.19 ± 2.45**		17.00 ± 5.280**		13.58 ± 2.27**	

N = número de membranas normales medidas.

H = Número de membranas hinchadas medidas.

*p < 0.05, ** p < 0.001

© Media en nanómetros = distancia entre las bicapas ± DE

g) Incorporación de timidina tritiada por epimastigotes de *T. cruzi*

Los resultados de la incorporación de timidina en epimastigotes incubados con suero inmune de ratón decomplementado dilución (1:1) mostraron que los parásitos no fueron capaces de proliferar durante las primeras 48 h después de la incubación. Los parásitos incubados con suero inmune (1:5) no proliferaron durante 24 h, mientras que en los epimastigotes incubados con suero inmune dilución 1:10 solo se inhibió la proliferación por 30 minutos de incubación. Estos datos sugieren que la inhibición del crecimiento de los parásitos es dependiente de la concentración de anticuerpos, la que solo solo se observó con la menor concentración de anticuerpos (Fig. 16a, b, c). Por otro lado, se observó una disminución de la incorporación de timidina en epimastigotes incubados con suero normal de ratón decomplementado (1:1) comparado con epimastigotes incubados en RPMI 1640 (p < 0.05) a las 48 h (Fig. 16a). El suero normal de ratón decomplementado (1:5, 1:10) no inhibió el crecimiento de parásitos en ninguno de los tiempos de incubación (Fig. 16 b, c).

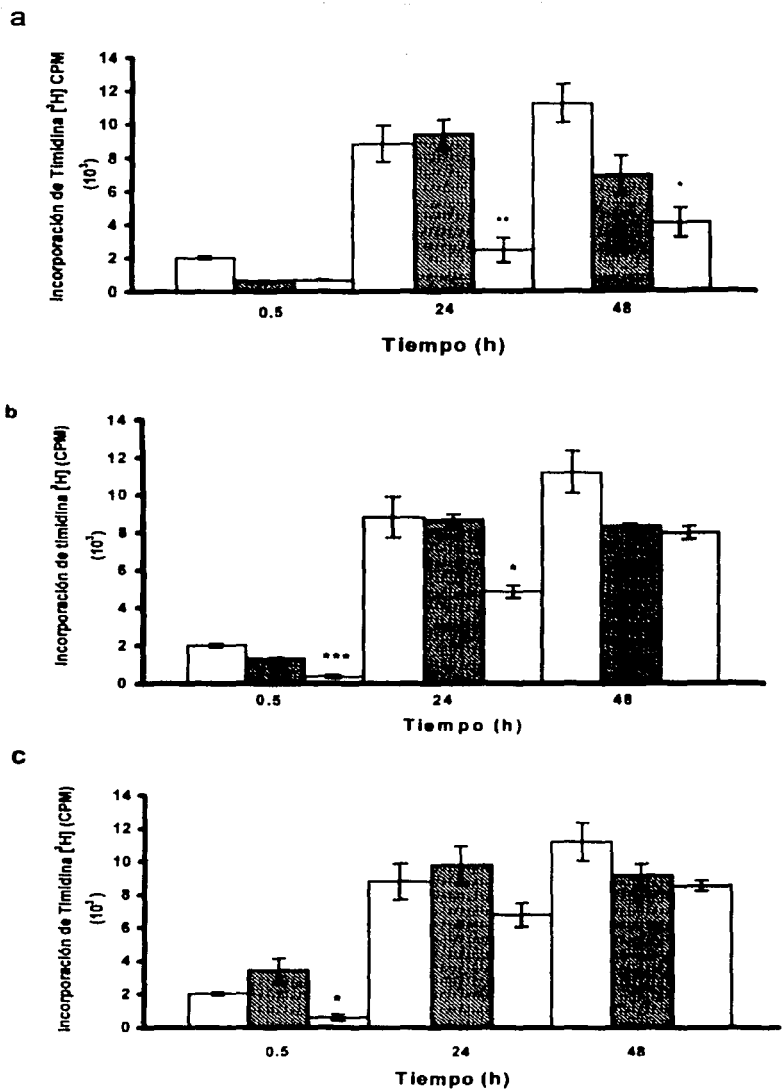


Figura 16. Incorporación de timidina tritiada en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* incubados con suero de complementado de ratón en : RPMI \square , Suero normal ▨ , Suero inmune \square
a) Dilución 1:1 b) 1:5 c) 1:10. $p < 0.001^{***}$, . $p < 0.01^{**}$, . $p < 0.05^*$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

h) Análisis de apoptosis por citometría de flujo.

El análisis cuantitativo por citometría de flujo mostró un 26% de fluorescencia específica en epimastigotes incubados (5 min) con suero inmune de ratón decomplementado y teñidos con el kit comercial (Fig. 17a). A los 30 min, la fluorescencia fue del 8 % (Fig. 17b) y a los 60 min de incubación se encontró el 17.8% de fluorescencia específica (Fig. 17c). Contrastando con el 1.3, 0.09 y 0.4 % (5, 30, 60 min respectivamente) en epimastigotes incubados únicamente con los nucleótidos fluoresceinados (Fig. 18a,b,c) y y el 0.15, 0.01 y 0.88% en epimastigotes incubados con suero normal de ratón decomplementado (Fig. 19a,b,c).

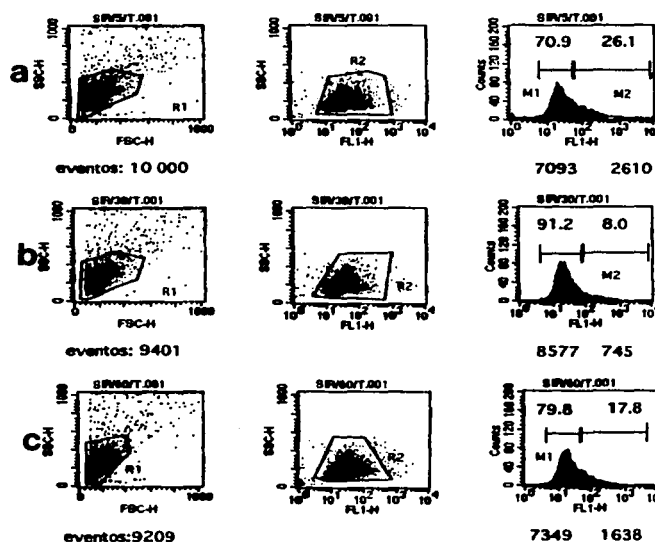


Figura 17.- Determinación de apoptosis en epimastigotes de *T. cruzi* incubados con suero inmune de ratón decomplementado por citometría de flujo. a) 5 min de incubación: se observa el 26.1% de apoptosis. b) 30 min de incubación: se observa el 8.0% de apoptosis. c) 60 min de incubación: se observa el 17.8% de apoptosis.

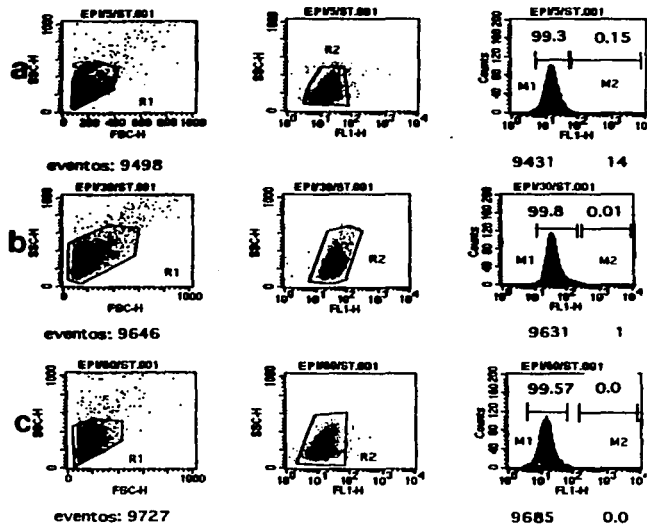


Figura 18. Determinación de apoptosis en epimastigotes de *T. cruzi* incubados con medio de cultivo (RPMI). No se observa apoptosis en ninguno de los tiempos de incubación. a) 5 min (0.15%); b) 30 min (0.01%); c) 60 min (0%).

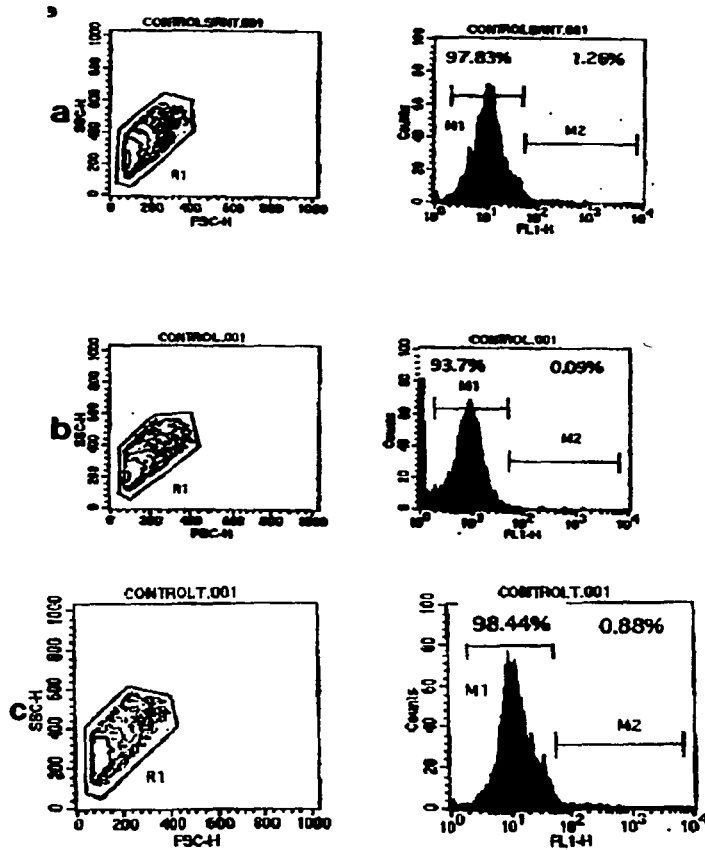


Figura 19. Determinación de apoptosis en epimastigotes de *T. cruzi* incubados con suero normal de ratón de complementado. No se observa apoptosis en ninguno de los tiempos de incubación. a) 5 min (0.13) b) 30 min (0.09); c) 60 min (0.88%)

Discusión.

Se han realizado numerosos estudios sobre el efecto de sueros normales de humanos, conejos, aves, ranas, ratas y ratones en epimastigotes de *T. cruzi*, que sugieren que los cambios morfológicos en los parásitos son consecuencia de una lisis inmune dependiente de complemento (Muñiz 1945; Rubio 1956; Tay 1974; Nogueira 1975; Kototani 1979). Algunos de los daños ultraestructurales que sufren los epimastigotes en presencia de sueros descritos por diferentes autores incluyen: membrana plasmática sinuosa y discontinua; las membranas nuclear, del cinetoplasto, de la mitocondria y del saco flagelar también se observan interrumpidas, y hay disminución en la densidad del citoplasma. El aparato de Golgi y el retículo endoplásmico se encuentran dañados.

En nuestro estudio, encontramos que el suero inmune de complementado de ratón y conejo, indujeron aglutinación y muerte en epimastigotes. El patrón de aglutinación se observó desde los 5 min de incubación de los parásitos con sueros inmunes de complementados. Sin embargo, pudimos observar una población de parásitos que escapan al efecto aglutinante después de 30-60 min de la incubación con sueros inmunes.

La característica ultraestructural más sobresaliente en el patrón de aglutinación fue la fusión de microtúbulos subpeliculares y de la membrana plasmática en los sitios de unión de 2 ó más parásitos. También observamos separación de las dobles membranas de la mitocondria, membrana plasmática, retículo endoplásmico, cinetoplasto, y ruptura de la membrana nuclear. Estos datos sugieren un daño general a las membranas del parásito, asociado con pérdida de la función que se demuestra por la incorporación del azul de tripano en parásitos aglutinados. Esto nos indica que anticuerpos dirigidos contra epimastigotes de *T. cruzi*, inducen daño irreversible a los parásitos por la aglutinación.

Por otro lado, ya ha sido reportada la presencia de receptores para Fc en *T. cruzi* (Rodríguez de Cuna y col.1991), por lo que es posible que bajo nuestras condiciones experimentales se lleve a cabo una doble unión de membranas por la porción Fab de anticuerpos específicos, y el Fc de inmunoglobulinas inespecíficas pudiendo ser ambos los responsables de la aglutinación y de la

unión estrecha entre epimastigotes lo que conduce a la fusión de membranas y al daño subsecuente.

La aglutinación también conduce a la inhibición la proliferación de epimastigotes of *T. cruzi*, ya que no hay incorporación de timidina en epimastigotes incubados con suero inmune de ratón decomplementado, lo que indica que los anticuerpos aglutinantes matan a casi todos los parásitos, observación que es confirmada por la incorporación de azul de tripano en los parásitos aglutinados. Sin embargo, algunos epimastigotes escapan a la acción de los anticuerpos quedando viables y en consecuencia, recuperan la capacidad de incorporar timidina tritiada a las 48 h. La inhibición del crecimiento parasitario es dependiente de la concentración de anticuerpo, como se muestra en los resultados, en los cuales la incorporación of [³H]-timidina es restaurada a concentraciones decrecientes de anticuerpos.

La observación de inhibición en la incorporación de timidina por epimastigotes incubados por 48 h con suero normal decomplementado a la dilución (1:1) podría deberse a la participación de algunos factores presentes en el suero.

En contraste, con el daño observado en sueros inmunes decomplementados de ratón y conejo, con suero normal de ratón no se observó aglutinación o daño ultraestructural. Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas por Rubio (1956) quien reportó que los epimastigotes incubados con suero normal de ratón no sufrían ningún tipo de daño.

El suero normal de conejo es capaz de inducir aglutinación en el parásito y, en presencia de complemento, la aglutinación se acompaña de daño ultraestructural. Este hallazgo ha sido previamente reportado por Nogueira (1975), quien describió aglutinación y daño en los epimastigotes. En este estudio, el complemento fue el responsable del daño, ya que cuando el suero era tratado con zymosan no se observaba daño ni lisis de los parásitos.

Nuestros resultados muestran que el suero normal de conejo decomplementado induce aglutinación de los parásitos sin daño aparente. La aglutinación observada en epimastigotes podría deberse a la presencia de los "anticuerpos naturales" descritos previamente por Rubio (1956) y Kotofani (1979). Probablemente, la presencia de bajos títulos de "anticuerpos naturales" con baja afinidad hacia los parásitos podría conducir a una unión transitoria, no lo suficientemente

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

estrecha para inducir la fusión de membranas entre los parásitos u otro daño ultraestructural permanente.

Nuestras observaciones indican que, anticuerpos policlonales específicos, en ausencia de complemento son capaces de aglutinar y dañar en forma irreversible a epimastigotes de *T. cruzi*. Los datos ultraestructurales muestran una estrecha fusión de membranas en los parásitos acompañada de daño ultraestructural, sin embargo no está claro si es la fusión de las membranas lo que conduce al daño de los organelos del parásito encontrados en este estudio.

Krettli y Brener (1976) han reportado que la incubación de parásitos con sueros inmunes conduce a la formación de grandes aglutinados de parásitos, fenómeno que se correlaciona con una disminución en la infectividad de tripomastigotes sanguíneos.

Algunos de los daños observados en los parásitos incubados con sueros inmunes de complementados fueron: picnosis nuclear y disminución en la heterocromatina, patrones morfológicos compatibles con apoptosis (Fig. 20a,b). Estudios realizados por Billaut-Mullot (1996) indican que los epimastigotes de *T. cruzi* mueren por apoptosis durante la fase estacionaria de crecimiento al establecerse competencia por los nutrientes. La fusión de membranas observada en los parásitos incubados con anticuerpos específicos pudiera impedir que el parásito lleve a cabo sus funciones esenciales por lo que, pudiera activarse la maquinaria de apoptosis induciendo la muerte de los parásitos. El estudio de citometría de flujo mostró que al menos un 26% de los parásitos mueren por apoptosis, aunque por microscopía electrónica, el porcentaje de células con alteraciones típicas de apoptosis fue menor (2.6%). Es probable que otros mueran por necrosis.

La fase de epimastigote ha sido ampliamente estudiada en el intestino medio del insecto vector y en medio de cultivo *in vitro*, sin embargo, existen datos contradictorios acerca de su presencia en el huésped mamífero. Varios autores han detectado formas intracelulares con morfología parecida a los epimastigotes en mamíferos, antes de que el parásito asuma la forma de tripomastigote (Wenyon 1926; Hoare 1972; Gutteridge and Rogerson 1979; Mehlhom 1987; Andrews y col. 1988; Faucher y col 1995. Silva Pinto y col 1999; Almeida-de-Faria y col. 1999; Tyler 2001).

Nosotros tenemos también la evidencia de una forma transitoria parecida al epimastigote observada en improntas de corazón de ratones infectados. La presencia de anticuerpos específicos contra epimastigotes podrían estar participando en la disminución de la diseminación de los parásitos en el huésped mamífero antes de que se transforme a tripomastigote.

Por otro lado, el conocimiento de que anticuerpos específicos contra epimastigotes dañan irreversiblemente a los parásitos, podría ser útil en los animales vectores de *T. cruzi*, los cuales al ser inoculados con proteínas del epimastigote, desarrollarían anticuerpos que eliminarían los epimastigotes del intestino medio del transmisor cuando se alimenta, contribuyendo a controlar la infección principalmente en zonas rurales, en donde los individuos conviven estrechamente con los transmisores.



Figura 20. Micrografías de epimastigotes incubados a 37°C con suero inmune de ratón de complementado durante 30 min. a) Se observa un parásito con el núcleo picnótico (flecha) y restos celulares (d). Barra =10 μ m. b) Se observa picnosis nuclear (flecha) disminución en la electrodensidad del citoplasma, la mitocondria (M) y el retículo endoplásmico están hinchados (re). Barra =10 μ m.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Conclusiones.

Se comprobó la presencia de epimastigotes fuera de las células infectadas en el análisis de las improntas de corazón obtenidas de ratones infectados con *T. cruzi*. Se encontró que anticuerpos específicos anti-epimastigotes de *T. cruzi* son capaces de inducir muerte de los parásitos por aglutinación. Los datos de citometría de flujo, indicaron que un 26% de los epimastigotes incubados con sueros inmunes mueren por apoptosis.

Bibliografía.

- 1.- Rothhammer F., Allison MJ., Núñez L., Standen V., Arriaza B. (1985) Enfermedad de Chagas en Sudamérica pre-colombina. *Rev.Amer.Antrop. Fis:* 68:495-498.
- 2.- Sherlock I. (1979a) Vetores en: Brener Z. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Ed Guanabara Koogan Río de Janeiro, Brasil. p.63.
- 3.- Chagas C. (1909) Nova tripanozomiaza humana. Estudos sobre morfología e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.gen.,sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem.Inst Oswaldo Cruz* 1.159-218.
- 4.- Lewinsohn R. Carlos-Chagas (1879-1934): the discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American trypanosomiasis (foot-notes to the history of Chagas'disease). (1979). *Trans.R.Soc. Trop. Med. Hyg.* 73 (5): 513-523.
- 5.- Guerra F. (1970) American Tripanosomiasis. An historical and human lesson. *J.Trop.Med.Hyg.* 73 (5): 105-118.
- 6.- Sherlock I A. (1979b) Prevention of Chagas'disease. *Rev Bras Malariol Doencas Trop.*31:121-35.
- 7.- WHO (1999). Moncayo Alvaro. Progress Towards interruption of Transmission of Chagas Disease. TDR, Ch-1211, Geneve Switzerland, Vol 94, Suppl. 1:401-404.
- 8.- Amorin DS. (1979) Chagas'disease. *Prog. Cardiol.* 8:235-279.
- 9.- Espinosa R., Carrasco HA., Belandria AM., Fuenmayor MC., Gonzalez y Martinez. (1985) Life expectancy analisis in patients with Chagas' disease: prognosis after one decade (1973-1983). *Int J. Cardiol.* 8:45-56.
- 10.-Garcia-Zapata., MTA ,Marsden PD. (1986) Chagas'disease. *Clin. Trop.Med. Commun. Dis.* 1:537-585.
- 11.- WHO (1991) Control of Chagas disease. *Tech.Rep.Ser. No.811.* 95,WHO.
- 12.-Williams GD., Adams LG., Yaeger RG. (1977) Naturally occurring trypanosomiasis (Chagas'disease) in dogs. *J. Am. Vet. Assoc.*171:171-177.
- 13.- Navin TR, Roberto RR, Juranek DD. (1985) Human and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection. *Am.J.Public Health.* 75: 366-369.

- 14.- Beard CB, Young DG, Butler JF, Evans DA. (1988) First isolation of *Trypanosoma cruzi* from a wild-caught *Triatoma sanguisuga* (LeConte) (Hemiptera: Triatominae) in Florida, U.S.A. *J. Parasitol.* 74:343-344.
- 15- Yaeger RG, (1968) The prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in armadillos collected at a site near New Orleans, Louisiana. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 38:323-326.
- 16.- Barreto MO. (1985) Reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909. En: Carcavallo R.U; factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud (OPS/OMS) y Servicio Nacional de Chagas de la República Argentina. 2: 275-288.
- 17.- Zeledón R. (1981) El *Triatoma dimidiata* (Latereille, 1811) y su relación con la Enfermedad de Chagas. Ed. Universidad Estatal a Distancia. San José de Costa Rica. pp 1-146.
- 18.- Lent H., Wygodzinsky P. (1979) Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of The American Museum of Natural History.* 163: 123-520.
- 19.- Wilton DP., Cedillos RA. (1979) Los triatomíneos domésticos (Reduidos) y las infecciones tripanosómicas en insectos en El Salvador. *Bol.Of.Sanit.Panam.* 86:148-156.
- 20.- Beaver PC, Jung RC, Cuppo EW. (1994) *Parasitología Clínica.* Ed. Salvat 2ª edic. Barcelona España. pp 65-66.
- 21.- Atlas A., Apt W. (1994) *Parasitología Clínica.* Ed. Interamericana. Chile. p.p 255-288.
- 22.- Pinto DJ. (1984) *Enfermedad de Chagas : Epidemiología-Clinica-Terapéutica.* Programa de Salud Humana. Buenos Aires, Argentina. p.p 106.
- 23.- Mehron H., Waldorf V. (1988) Life Cycles. In: Heinz M, and Springer Verlag., editores. *Parasitology in Focus. Facts and Trends.*, N.Y. p.p 1-147.
- 24.- Schimdt GD., Roberts LS. (1989) *Foundations of Parasitology.* Timer Mirrow/Mosby Collegue Publishing, USA. p.p 750.
- 23.- Wenyon CM (1926) *Protozoology.* Balliere, Tindall & Cox, London.
- 24.- Hoare C (1972) *The trypanosomes of mammals. A zoological monograph.* Blackwell Scientific, Oxford. 114.

- 25.-Gutteridge WE, Rogerson GW (1979) Biochemical aspects of the biology of *Trypanosoma cruzi*: In:Lumeden WHR, Evans DA (eds) *Biology of the Kinetoplastida*. vol 2. Academic Press, New York, pp 62217.- Brener ZO, Andrade Z. (1979). *Parásito: Relações hospedeiro Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. pp 2-4.
- 26.-Mehlhorn H (1987) *Parasitology in focus*. Springer, Berlin Heidelberg New Y,pp 11-12
- 27.- Andrews NW, Robbins ES, Ley V, Hon KS, Nussenzweig V (1988) Developmentally regulated phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 167:300-314.
- 28.- Faucher JF, Baltz TH, Petry KG (1995) Detection of an "epimastigote-like" intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*: *Parasitol Res* 81 441-443.
- 29.-Silva Pinto PL, Takami R., Nunes VE., Guilherme SC., Cruz Oliveira O., Gama-Rodríguez J., Okumara M. (1999) *Rev. Hosp..Clin.Fac.Med.S.Paulo*.54 (5):141-146
- 30.- Almeida-de-Faria., Freymuller E., Colli W., Alves JM. (1999)*Trypanosoma cruzi*. Characterization of an intracellular Epimastigote like form. *Ex. Parasitology*. 92:263-274.
- 31.-Tyler KM., Engman DM. (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal of Parasitology*. 31:472-481
- 32.- Wery M., De Groot-Lasseel M. (1966) Ultrastructure de *Trypanosoma cruzi* en culture sur milieu semi-synthétique. *Ann. Soc. Belge.Med Trop*. 46: 337-348.
- 33- Brack C. (1968). Elektronenmikroskopische untersuchungen zum lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 25:289-356.
- 34.- Delain E., Rion G. (1969) Ultrastructure du kinétoplaste de *Trypanosoma cruzi* cultivé *in vitro*. *C.R Acad.Sc. Paris*.268:1225-1227.
- 35.- Milder R., Deane MP. (1969) The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma conorhini* .*J. Protozool*. 16:730-737
- 36.- De Bolso JF., Docampo R., Stoppani OM.(1974) Nuevas observaciones de la ultraestructura del *Trypanosoma cruzi* con microscopía de electrónica de barrido y transmisión. *Rev.Asoc.Microbiol*. 6 (3) : 119-126.

- 37.- Peyrol S, OuaiSSI MA, Capron A, Grimaud JA. (1987) *Trypanosoma cruzi*: Ultrastructural Visualization of Fibronectin Bound To Culture forms. *Exp.Parasitol.* 63: 112-114.
- 38.- Docampo R., Moreno SNJ.(1999) Acidocalcisome: A novel Ca^{2+} Storage Compartment in Trypanosomatidas and Apicomplexan Parasites. *Parasitology today.* 15(11): 427-468.
- 39.- DoCampo R., Boiso JF., Stopanni AOM (1974) Scanning and transmission electron microscopy of culture form of *Trypanosoma cruzi* . *Rev. Assoc.Arg.Microbiol.* 5:117-122.
- 40.- De Souza W. (1999). A short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz.* 94:17-36.
- 41.- Soares MJ., De Souza MF., De Souza W. (1987) Ultrastructural Vizualization of Lipids in Trypanosomatids. *J.Parasitol.* 34 (2): 199-203.
- 42.- Oppeerdoes FR., Michels PAM. (1991) The evolutionary origin of glycosome.*Parasitol Today* 7: 105-109.
- 43.- Figueiredo RCBQ., Steindel M; Soares MJ.(1994) The reservosomes of epimastigotes formas of *Trypanosoma cruzi*: occurrence during in vitro cultivation.. *Parasitol Res.* 80 (6).517.522.
- 44.- Figueiredo RCBQ., Rosa S D., Soares MJ. (2000) Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: Metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional strees. *J. Parasitol.* 86: 1213-1218.
- 45.- Farina M., Attias M., Souto-Padron T., De Souza W. (1986) Further studies on the organization of paraxial rod of trypanosomatids. *J. Protozool.* 33: 552-557.
- 46.- Figueiredo RCBQ., Soares MJ. (1995) The Golgi complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *J. Submicrosc Cytol Pathol.* 27 (2):209-15.
- 47.- Englund P., Guilbride DL.,Hwa KY., Johnson CE., Li C., Rocco LJ., Torri AF.(1996) Kinetoplast DNA: structure and replication, p.p 75-87. In DF Smith & M Parsons (eds). *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*, IRL press, New York.
- 48.- Hecker H.,Betschart K., Bender M., Burri M., Schlimme W. (1994) The chromatin of Trypanosomes. *Int. J. Parasit.* 24 (6): 809-819.

- 49.-Tay J. (1966) Descripción de *Leishmania mexicana* mediante el microscopio electrónico. Prens Med Mex. 10:39.
- 50.- Kototani K, Kanbara H, Fukuma T, Nakabayashi (1979) Electronmicroscopic observations on lysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigote by normal rabbit serum. Biken J 22:109-115
- 51.-Manque PM., Eichinger D., Juliano MA., Juliano L., Araya JE., Yoshida N. (2000). Characterization of the Cell Adhesion Site of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Stage Surface Glycoprotein gp82. Infection and Immunity. 68: (2). 478-484.
- 52.-Ortega-Barria E., Pereira EA.(1991) A novel *Trypanosoma cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cell. Cell. 67:411-421.
- 53.-Schenkman S., Andrews W., Nussenzweig V.(1988). *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. Cell. 55:157-165.
- 54.- Comette J., Capron A. Ouaisi MA. (1988)*Trypanosoma cruzi* : fibronectin promotes uptake of epimastigote culture forms by human neutrophils and monocytes. Int. Arch.Allergy Appl. Immunol. 86:139-146.
- 55.-Rimoldi MT., Tenner AJ., Bobak DA., Joiner KA. (1989). Complement component C1q enhances invasion of human mononuclear phagocytes and fibroblasts by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. J. Clin. Invest. 84:1982-1989.
- 56.-Connelly MC., Kierzenbaum F. (1984). Modulation of macrophage interaction with *Trypanosoma cruzi* by phospholipase A2-sensitive components of the parasite membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun. 121: 931-939.
- 57.-Schenkman S.,Robbins ES., Nussenzweig V.(1991) Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. Infect.Immun. 59:645-654
- 58.-Schenkman S., Kurosaki T., Ravetch JV., Nussenzweig . (1992). Evidence for the participation of the Ssp-3 antigen in the invasion of nonphagocytic mammalian cells by *Trypanosoma cruzi*. J Exp Med. 175 (6): 1635-1641.

- 54.- Joiner K., Hieny S., Kirchhoff LV. (1985). gp 72 the 72 kilodalton glycoprotein, is the membrane receptor size for C3 on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. J.Exp. Med. 161:1196-1212.
- 55.- Joiner K., Sher A., Gaither T., Hammer C. (1986) Evasion of alternate complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. Proc.Natl.Acad.Sci. USA.86:6593-6597.
- 56.- Sher A., Hieny S., Joiner KA. (1986). Evasion of the alternative complement pathway by meta cyclic trypomastigotes; The *Trypanosoma cruzi*: dependence on the development regulated synthesis of surface protein and N-linked carbohydrate. J. Immunol. 137: 2961-2967.copy. J. Bacteriology.60:617-625.
- 57.- Hall BF., Joiner A. (1991). Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. Parasitol Today.7:A-A27.
- 58.- Norris AK., Scrimpf JE., Szabo MJ (1997) Identification of the Gene Family Encoding de 160.Kilodalton *Trypanosoma cruzi* Complement Regulatory Protein. Infection and Immunity:66(2) 349-357.
- 59.- McCabe RE., Mullins BT. (1990) Failure of *Trypanosoma cruzi* to trigger the respiratory burst of activated macrophages. Mechanism for immune evasion and importance of oxygen-independent-killing. J. Immunol. 144:2384-2388.
- 60.- Tanowitz HB., Wittner M., Kress Y., Bloom BR. (1975) Studies *in vitro* infection by *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop.Med,Hyg. 24:25-33.
- 61.- Tanaka Y., Kiyotaki C., Tanowitz HB., Bloom BR.(1987) Reconstitution of a variant macrophage cell line defective in oxygen metabolism with an H₂O₂ generating system. Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 79: 2584-2588.
- 62.- Munoz-Fernandez MA., Fernández MA., Fresno M. (1992) Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric-oxide-dependent mechanism. Eur.J.Immunol. 22:301-307.
- 63.- Andrews NW., Abrams CK., Slatin SL., Griffiths GA. (1990). A *T.cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. Cell. 61:1277-1287.

- 64.- Rosenberg IA., Prioli RP., Mejia JS., Pereira MEA. (1991). Differential expression of *Trypanosoma cruzi* neuraminidase in intra-and extracellular trypomastigotes. *Infect.Immun.* 59:464-466.
- 65.- Brener Z. (1973). *Biology of Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev: Microbiol.* 27: 347-382.
- 64.- Grant I,Gold JD.,Wittner M. (1989) Transfusion associated acute Chagas'disease acquires in the Unites States. *Ann Intern med.* 11:849-851
- 66.- Salazar P., Barrera M., Bucio M.(1989) .Transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión sanguínea. Primer caso humano en México.*Rev Mex Patol Clinc.* 36: 2-4
- 67.- Bittencourt AL.(1988). Evaluation of Chagas'disease transmission through breast-feeding. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 83:37-39.
- 68.- Lainson R.(1980). Chagas's disease in the Amazon basin: speculations on transmission per os. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 22: 294-297.
- 69.- Nery-Guimarães F. (1968). Um surto epidêmico de Chagas de provavel transmissão digestiva, ocorrido em Teutona (Estrêla-Rio Grande do Sul) Hospital (Rio de Janeiro) 73: 1767-1804.
- 70.- Leiguarda R (1988) Acute CNS infection by *Trypanosoma cruzi* in immunosuppressed patients. *Neurology*, 38 (Supp) : Abstract 114.
- 71.- Canale D, Carcavallo R. (1985). *Triatoma infestans* (Klug) en : Carcavallo R, Rabinovich J, Tonn R, Mena C. Factores biológicos y ecológicos de la enfermedad de Chagas. Tomo I y II. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Programa de Salud Ambiental, OPS/OMS, Servicio Nacional de Chagas. Ministerio de Salud y Acción Social (República
- 72.- Salazar- Schettino PM, Haro I, Uribarren BT.(1988). Chagas disease in México. *Parasitology Today.* 4 (12): 348-352.
- 73.- Tonawitz HB, Morris SA, Factor SA, Weiss LM, Wittner M. (1992). Parasitic diseases of the heart I: acute and chronic Chagas' disease. *Cardiovasc. Pathol.*1:7-15.
- 74.- Rassi A. (1979). Clínica:fase aguda, In Z.Brener and Z.A, Andrade (ed.) *Trypanosoma cruzi e Doneça de Chagas*. Guanabara Koogan. Río de Janeiro Brasil. pp.249-254.
- 75.- Shikanai-Yasuda MA, Lopes MH, Tolezano JE, Umezawa E, Amato Neto V, Pereira Barreto AC, Higaki AAB, Moreira G, Funayama AA, Barone A, Duarte V, Odone GC, Cerri M, Sato Possi

D, Shiroma M. (1990). Doença de Chagas aguda: vias de transmissão, aspectos clínicos e resposta à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 32: 16-27.

76.- Ribeiro dos Santos RM, Rossi MA, Kaus JL, Silva JS, Savino W, Mengel J. (1992). Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngenic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. J. Exp. Med. 175: 29-39.

77.- Oliveira JSM, Correo de Araujo RC, Navarro MA, Mucillo G. (1983). Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. Am. J. Cardiol. 52: 147-151.

78.- Oliveira JSM, De Oliveira JAM, Frederique U, Filho EC. (1981). Apical aneurysm of Chagas' heart disease. Br. Heart J. 48: 432-437.

79.- Laranja FS (1956) Chagas' disease a clinical, epidemiologic and pathologic study. Circulation. 14; 1035-1060.

80.- Andrade ZA, Grimaud JA. (1986). Chronic murine myocarditis due to *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study and immunochemical characterization of cardiac interstitial matrix. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro. 81: 29-41.

81.- Bestetti RB, Oliveira JSM. (1989). A hitherto neglected cause of myocardial infarction associated with normal coronary arteries: Chronic Chagas' disease. Am. J. Cardiol. 63: 766.

82.- Marín-Neto JA., Marzullo PC., Marcassa C., Gallo RL., Marciel CR., Bellini C., L'Abbate. (1990). Perfusion defects detected by thallium-201 scintigraphy in Chagas' heart disease. J. Am. Coll. Cardiol. 15: 240^a.

83.- Koeberle F. (1968). Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. Adv. Parasitol. 6: 63-116.

84.- Chapadeiro E, Lopes E, Mesquita P, Pereira FE. (1964) Incidência de "Megass" associados a cardiopatia Chagásica. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 6: 287-291.

85.- Barbara A, Pitella J, Tafuri W. (1970). Incidência da cardiopatia Chagásica em 15,000 necropsias consecutivas e sua associação com os "megass". Reuta Soc. Bras. Med. Tro. 4: 219-223.

86.- Botero y Restrepo. (1998). Parasitosis humanas. Medellín, Colombia. Ed. Corporación para investigadores biológicas. 203-222.

- 87.- Zhang L., Tarleton RL. (1999). Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas disease. *J. Infect. Dis.* 180:480-6.
- 88.- Theofilopoulos A. (1995). The basis of autoimmunity. Part 1 Mechanism aberrant self-recognition. *Immunol. Today* 16:90-98.
- 89.- Tarleton RL. (2001) parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *International J of Parasitology.* 31:550-554.
- 90.- De Titto E., Brun M., Lazzari J., Segura E. (1985) Cell mediated reactivity against human *Trypanosoma cruzi* antigens according to clinical status in Chagas' disease patients. *Imm.Lett.* 9: 249-254.
- 91.- Higuchi M., Reis M., Aiello., Benvenuti L., Gutierrez p., Belloti G., Pileggi F. (1997) Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic human chagasic myocarditis. *Am.J. trop. Med. Hyg.* 56:485-489.
- 92.- Fernandez A, Hontebeyrie M., Said G (1992). Autonomic neuropathy and immunological abnormalities in Chagas' disease. *Clin Auton Res* 2 (6): 409-412.
- 93.- Bonfa E., Viana VS., Barreto AC., Yoshinari NH., Cossermelli W. (1993). Autoantibodies in Chagas' disease. An antibody cross-reactive with human and *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. *J Immunol.* 150(9):3917-23.
- 94.- Sepulveda P., Liegeard P., Wallukat G., Levin M.J., Hontebeyric M. (2000). Modulation of Cardiocyte functional activity by antibodies against *Trypanosoma cruzi* Ribosomal P2 Protein C Terminus. *Infection and Immunity.* 68: 5114-5119.
- 95.-Morrot A., Strickland D., Higuchi M., Reis M., Pedrosa R., Scharfstein. (1997). *Trypanosoma cruzi*: detection of a surface antigen cross-reactive to human C.reactive protein. *Exp. Parasitol.* 90:143-153.
- 96.- Roitt I., Brostoff J., Male D. (1998). *Immunology.* London, UK. Ed. Mosby. p.p 423.
- 97.- Reis M., Higuchi M., Benvenuti L., Aiello V., Gutierrez P., Belloti G., Pileggi F. (1997). An *in situ* quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Immunopathol.* 83: 165-172.

- 98.- Billaut-Mulot.,Fernandez-Gomez R., Ioyens M., OuaiSSI Ali (1996). *Trypanosoma cruzi* elongation factor 1- α nuclear localization in parasites undergoing apoptosis.gene 174.19-26.
- 99.- Ameisen JC., Idziorek T., Billaut-Mulot O., Tissier JP., Potentier A., OuaiSSI A (1995) Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death and Differentiation*. 2:283-300.
- 100.- Powell MR, Kuhn RE (1980) Measurement of cytolytic antibody in experimental Chagas disease using a terminal radiolabeling procedure *J Parasitology* 66: 399-406
- 101.- Lowry OH, Rosebrough NJ, Rabdall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- 102.- Butler JE, Feldbush TL, McGivern PL, Stewart N (1978) The enzyme-linked immunosorbent assay ELISA A measure of antibody concentration or affinity. *Immunochemistry* 15:131-136
- 103.-Kamovsky MJ. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biology* 27:137A
- 104.- Reynolds ES. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opoque stain in electron microscopy *J Cell Biol* 17:208-215
- 105.- Boyse EA., Old LJ; Chouralinkou I.(1964). Cytotoxic test for demonstration of mouse antibody. *Methods Med. Res*, 10:39
- 106.- Muniz J.,Boriello A (1945). Estudio sobre acción lítica de diferentes sueros sobre as formas de cultura e sanguícolas do_Schizotrypanum cruzi_ Rev Bras Biol 5:563-576
- 107.-Rubio M.(1956) Actividad lítica de sueros normales sobre formas de cultivo e sanguícolas de *Trypanosoma cruzi* . *Bol Chil Para* 11:62-69
- 108.- Tay J., Abiti AT., RiveroA. (1974) Acción de sueros inmunes contra *Trypanosoma cruzi*, con observación al microscopio electrónico. *Rev.Inv.Salud Pública* 84:13-29.
- 109.- Nogueira N, Bianco C, Cohn Z (1975) Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*_ *J Exp Med* 142:224-229

110.- Rodriguez de Cuna C, Kierszenbaum F, Wirth JJ (1991) Binding of the specific ligand to Fc receptors on *Trypanosoma cruzi* increases the infectivity capacity of the parasite. *Immunology* 72 :114-120.

111.- Kretzli AU, Brener Z (1976) Protective effects of specific antibodies in *T. cruzi* infections. *J Immunol* 116: 755-760