

20943

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



* 5 3 0 9 6 0 7 3 1 8 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL IMPACTO DE LA
ESTRUCTURA CLONAL DE *TRYPANOSOMA CRUZI*
SOBRE ASPECTOS MEDICO-BIOLÓGICOS

TESIS DOCTORAL

MARIA TERESA PALAU CASTAÑO

MADRID, 1996



ARCHIVO

**ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL IMPACTO DE LA
ESTRUCTURA CLONAL DE *TRYPANOSOMA CRUZI*
SOBRE ASPECTOS MEDICO-BIOLÓGICOS**

Maria Teresa Palau C.

MARIA TERESA PALAU CASTAÑO

Vº Bº de los Directores

Jose Antonio de Diego

Dr. JOSE ANTONIO DE DIEGO CABRERA

Pilar Penin Alegre

Dra. PILAR PENIN ALEGRE

**JOSE ANTONIO DE DIEGO CABRERA, PROFESOR TITULAR DE
MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PUBLICA (PARASITOLOGIA) Y
PILAR PENIN ALEGRE, PROFESORA ASOCIADA DE
PARASITOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA
PREVENTIVA Y SALUD PUBLICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID.**

CERTIFICAN

Que Dña MARIA TERESA PALAU CASTAÑO, ha realizado la Tesis Doctoral que lleva por título "Estudio experimental del impacto de la estructura clonal de *Trypanosoma cruzi* sobre aspectos mèdico-biològicos", bajo nuestra direcciòn, reuniendo los requisitos necesarios para optar al grado de doctor en Ciencias Biològicas.

Y para que asi conste, se expide el presente en Madrid a seis de Mayo de mil novecientos noventa y seis.



Fdo.: Dr. José Antonio de Diego

Fdo.: Dra. Pilar Penin

El amor de mi madre me dió
la fuerza para continuar.

A su memoria

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sentido agradecimiento al Dr. José Antonio de Diego Cabrera, Profesor Titular de Parasitología y responsable de la Unidad de Parasitología y Medicina Tropical, del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, quien me brindó todo su respaldo cuando más lo necesité y me prestó su ayuda y valiosa colaboración para que este trabajo se pudiera llevar a cabo.

Agradezco a la Dra. Pilar Penín Alegre, Profesora Asociada de Parasitología, en el del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina de La Universidad Autónoma de Madrid, por su colaboración, buena voluntad, y simpatía.

Al Dr. Carlos Gamallo Amat, Jefe de la Sección de Anatomía Patológica del Hospital la Paz de Madrid y sus colaboradores, por su valioso aporte con el estudio histopatológico.

Al Dr. Manuel Sánchez Moreno, Profesor Titular de Parasitología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, y sus colaboradores, por su importante ayuda con la Resonancia Magnética Nuclear.

Al Dr. Michel Tibayrenc, Jefe del Laboratorio de Genética Molecular de Parásitos e Insectos Vectores, ORSTOM. Montpellier-Francia, por el suministro de los clones del presente estudio.

Al Dr. Juan del Rey Calero, Director del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y a todos los integrantes de dicho departamento.

Al Dr. Antonio Tormo Garrido, Profesor Titular en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de ciencias Biológicas en la Universidad Complutense de Madrid, por su oportuna colaboración en todo lo relacionado con las gestiones académicas en la universidad.

A Susana García G., Técnico de la Unidad de Parasitología y Medicina Tropical, del departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, con quien hicimos equipo en esos días cuando ratones, láminas y parásitos superaban la capacidad de una sola persona.

A Elena Martínez T., Técnico de la Unidad de Parasitología y Medicina Tropical del departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, por su colaboración y valioso aporte con sus frases de aliento.

A todos los compañeros del laboratorio de Parasitología y Medicina Tropical, con quienes día a día y de manera cordial, se compartió dificultades y alegrías.

Agradezco a la Dra. Carmen Fernández Criado y todos los integrantes del grupo del Animalario de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Madrid, especialmente a Agapito García por su esmerado cuidado de los ratones.

En general agradezco a todas las personas que de una u otra manera, contribuyeron en la realización del presente trabajo.

Expreso sincero agradecimiento a todas las personas cercanas a mis afectos, porque con su cariño y comprensión se me hizo más grata la estancia en España.

Todo mi agradecimiento a Claudio Z., el hombre de mis sueños y realidades, el duende y el amigo, compañero de trabajo y de vida, quien en todo momento me brindó su comprensión y respaldo. En gran parte debo a él, haber logrado llevar a feliz término este trabajo.

Mi agradecimiento especial a Luis Alfonso P., quien además de ser mi hermano es el amigo sincero, a quien admiro por su enorme capacidad para comprender la vida y quien siempre me ha brindado comprensión, compañía y solidaridad velando por mi bienestar.

A mi hermana Angela María de A. por su apoyo y ejemplo de fortaleza y dedicación.

A Rodrigo P., por sus mensajes de aliento y su actitud optimista ante la vida.

Agradezco a mi hermano Mauricio P., por su cariño, cómplice y silencioso sin abandonar los sueños.

A María Cecilia G., quien con sus mensajes de arte me permitió ver más allá de los colores.

A Martha Inés P. por su inmensa colaboración y empeño cuidando de mi tranquilidad.

Doy las gracias a Germán A. por su generosidad y apoyo.
A Luis Edo. A., Germán D. A., y Luis David P. de quienes siempre percibo sus aportes de cariño.

Agradezco a mis amigos y amigas, los de aquí y los de allá, no son muchos pero sí suficientes para sentir que a los amigos se les lleva en el corazón. Todos sus mensajes y colaboraciones fueron un aporte muy valioso.

Especialmente doy las gracias a Sofía D., Carmenza de D., Martha E. A., Santiago N., Pablo P., Beatriz B., Augusto C. J. Ramón A., Rafael M. Soledad G., Enrique T. y Pilar A.

Agradezco a mis padres, quienes ya no están físicamente pero quienes siguen viviendo a través de sus hijos.

A mi madre quien siempre ha estado conmigo y de quien aprendí entre otras muchas cosas, el significado y valor de la alegría por la vida y el coraje para saber vivirla.

A mi padre por su ejemplo de cordura y honestidad.

Llevo mi equipaje, con gratos recuerdos de una España que me aportó una experiencia inolvidable.

Me voy con el gusto de sentirme otro integrante en la magnífica obra del maestro Velázquez, donde no sólo las Meninas son protagonistas.

Seguir adelante... y como dice el poeta, "no hay camino, se hace camino al andar, golpe a golpe... beso a beso".

Finalmente doy crédito de agradecimiento por el soporte financiero, a las siguientes Instituciones:

Proyecto STD-3 de la Comunidad Económica Europea (CEE).
Nº del contrato TS3- CT92-0155

Beca ICI de la Agencia Española de Cooperación Iberoamericana,
Madrid- España.

Fondo COLCIENCIAS Bid- ICETEX Cod 12-847,
Santa Fé de Bogotá- Colombia.

Instituto Nacional de Salud, Santa Fé de Bogotá -Colombia.

INDICE

Páginas

1. INTRODUCCION

1.1. Generalidades	1
1.2. Descripción y ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.3. El parásito <i>Trypanosoma cruzi</i> - Características de la población	4
1.4. El parásito <i>Trypanosoma cruzi</i> en cultivo Diferenciación y Metabolismo.....	7
1.5. Infección celular in vitro con <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
1.6. Infección con <i>Trypanosoma cruzi</i> - modelo experimental.....	16
1.7. Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas.....	20
1.7.1. Transmisión del parásito.....	20
1.7.1.1 El ciclo doméstico.....	21
1.7.1.2. El ciclo peridoméstico.....	21
1.7.1.3 El ciclo selvático.....	21
1.7.2. Fases de la enfermedad de Chagas.....	21
1.7.2.1. Enfermedad aguda.....	21
1.7.2.2 Fase latente.....	22
1.7.2.3 Enfermedad crónica.....	22
1.8. Inmunología en la infección chagásica.....	24
1.9. Protección y perspectivas.....	27

2. OBJETIVOS

2.1. Generales	30
2.2. Particulares	31

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. El parásito <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
3.1.2. Modelo experimental murino.....	32
3.1.3. Células VERO y macrófagos.....	33
3.1.4. Medios de cultivo utilizados	
3.1.4.1 Para cultivo axénico de clones de <i>T. cruzi</i>	33
3.1.4.2 Para cultivo de líneas celulares VERO y macrófagos.....	35

3.2. Metodología

3.2.1. Clones de <i>T. cruzi</i> en medio de cultivo LIT, GRACE, TAUP-Mantenimiento.....	36
---	----

3.2.2.	Seguimiento de la metaciclo­génesis de los clones de <i>T. cruzi</i>	36
3.2.3.	Estudio metabólico mediante RMN H ¹	38
3.2.4.	Clones de <i>Trypanosoma cruzi</i> para inoculación a ratón e infección celular.....	38
3.2.5.	Mantenimiento del líneas celulares VERO y macrófagos (J774).....	39
3.2.6.	Infección de VERO y macrófagos con los clones <i>T. cruzi</i>	39
3.2.7.	Estabilización de los clones en ratón.....	41
3.2.8.	Infección experimental en modelo murino.....	42
3.2.8.1	Estudio de la evolución de la parasitemia....	43
3.2.8.2	Estudio anatomopatológico - seguimiento macroscópico y estudio histológico.....	43
4.	RESULTADOS	
4.1.	Cultivo axénico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
4.2.	Metaciclo­génesis de <i>T. cruzi</i> en cultivo axénico	46
4.3.	Estudio metabólico mediante RMN H ¹	47
4.4.	Infección celular en VERO y macrófagos	48
4.5.	Adaptación y estabilización de los clones de <i>T. cruzi</i> en ratón.....	50
4.6.	Evolución de la parasitemia en ratón.....	51
4.7.	Observación macroscópica de órganos.....	52
4.8.	Estudio histopatológico en los ratones infectados.....	53
5.	DISCUSION	
5.1.	Cultivo axénico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
5.1.1.	Metaciclo­génesis.....	54
5.1.2.	Resonancia magnética nuclear de protones.....	57
5.2.	Infección celular in vitro con <i>T. cruzi</i>	59
5.3.	Adaptación de los clones <i>T. cruzi</i> en ratón.....	61
5.4.	Infección experimental con <i>T. cruzi</i> en ratón comportamiento de la estructura clonal.....	63
6.	CONCLUSIONES	75
7.	RESUMEN	76
8.	BIBLIOGRAFIA	79

INTRODUCCION

1. 1. GENERALIDADES

El parásito protozoo, *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis Americana, que afecta alrededor de 18 millones de personas.

T. cruzi fué aislado por primera vez en el año 1909, por el investigador brasileño Carlos Chagas, a partir del contenido intestinal de un insecto redúvido (*Panstrongylus megistus*).

En su honor, la tripanosomiasis americana, lleva su nombre como enfermedad de Chagas.

1. 2. DESCRIPCION Y CICLO BIOLÓGICO DE *Trypanosoma cruzi*

El parásito *T. cruzi* tiene un ciclo biológico complejo, siendo un organismo digenético con alternancia entre un hospedador vertebrado, donde usualmente se encuentra en sangre y tejidos, y en el tracto digestivo de un insecto vector, cambiando su morfología y expresión antigénica de acuerdo a su estadio y lugar donde se encuentra.

Estas diferencias en morfología y estados funcionales, implican una importante adaptación a una variedad de condiciones medio ambientales en el insecto vector y en las células del hospedador mamífero.

Es de anotar por ejemplo, que las formas de tripomastigotes sanguíneos y epimastigotes de *T. cruzi* en el insecto vector, se encuentran en un medio donde la concentración de calcio es muy elevada, y los amastigotes intracelulares en el mamífero por otra parte, se encuentran en una concentración muy baja.

Estos cambios drásticos de calcio libre en el medio durante el ciclo de vida sugieren que el parásito tiene una gran capacidad de adaptación (Vercesi A. E., 1994).

El parásito presenta tres distintas morfologías funcionales de acuerdo a donde se encuentre (Brenner Z., 1973), caracterizadas según el nacimiento del flagelo, curso intracelular y punto donde emerge libre, además se tiene en cuenta la posición del kinetoplasto con relación al núcleo celular (Braun M., y De Titto E., 1985).

Las formas llamadas epimastigotes, las cuales se caracterizan por su flagelo emergente desde la región lateral anterior y kinetoplasto anterior al núcleo, se encuentran en la luz del tracto intestinal del insecto vector, donde se multiplican extracelularmente.

Luego se transforman en tripomastigotes metacíclicos, los cuales se caracterizan por su flagelo emergente desde el extremo apical posterior y con el kinetoplasto ubicado posterior al núcleo, distinguiéndose una membrana ondulante característica.

Estos tripomastigotes se acumulan a nivel de la ampolla rectal del insecto y son excretados por las heces (Hoare C. A.,1972).

Trypanosoma cruzi es un parásito intracelular obligatorio y por lo tanto se multiplica dentro de las células del hospedador vertebrado. La multiplicación en este hospedador ocurre en su estadio de amastigote, el cual se caracteriza por su forma redondeada y sin flagelo aparente al microscopio óptico (Zeledon R. et al.,1977; Hyde T.P., y Dvorak J.A.,1973).

Se describe el ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* paso a paso siguiendo el esquema adjunto, (Despommier D. y Karapelou J.W., 1987).

1a. El estadio infectivo de *T. cruzi* es el tripomastigote metacíclico. Tiene una longitud aproximada de 15 μm , posee un núcleo simple y un kinetoplasto, estructura fundamentalmente compuesta de ADN, extranuclear dispuesto en maxi y mini círculos. A lo largo del cuerpo del parásito se observa una membrana ondulante característica la cual se continúa con un flagelo que sale libre por el extremo anterior.

1b. La transmisión de *T. cruzi* al hospedador mamífero, incluyendo el humano, ocurre por las deyecciones en el momento de la picadura de un insecto hematófago infectado.

Los géneros más frecuentes involucrados como vectores son *Panstrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius*. La infección ocurre después de la toma de sangre, ya que durante el proceso de ingestión, el insecto simultáneamente defeca sobre la piel del hospedador, muy cerca al sitio de la picadura. En las heces del insecto se encuentran las formas infectantes del parásito.

2. Después de la picadura, el hospedador experimenta sensación de escozor y con el efecto mecánico de roce, el parásito penetra por la piel a través de la pequeña lesión dejada por la picadura o por alguna otra herida.

Si la picadura ocurrió en el rostro cerca de los ojos o labios, *T. cruzi* puede penetrar a través de las membranas mucosas, observándose horas después un fuerte edema.

El parásito *T. cruzi* también puede transmitirse de persona a persona por transfusión sanguínea e infección transplacentaria.

3a. Los tripomastigotes entran a una amplia variedad de células, localizadas cerca del sitio de la picadura y se transforman en estadio de amastigotes. Esta forma del parásito mide 3-5 μm de diámetro y no posee flagelo libre. Se multiplica intracelularmente por fisión binaria.

3b. El hospedador desarrolla hipersensibilidad al parásito, como resultado de una extensa destrucción celular en el sitio de la infección inicial. Se puede observar en algunos casos edema palpebral y/o chagoma de inoculación.

4a. Algunos amastigotes se transforman en tripomastigotes dentro de la célula infectada. luego ocurre la lisis celular y los parásitos salen al torrente circulatorio, por medio del cual migran a diferentes órganos del cuerpo.

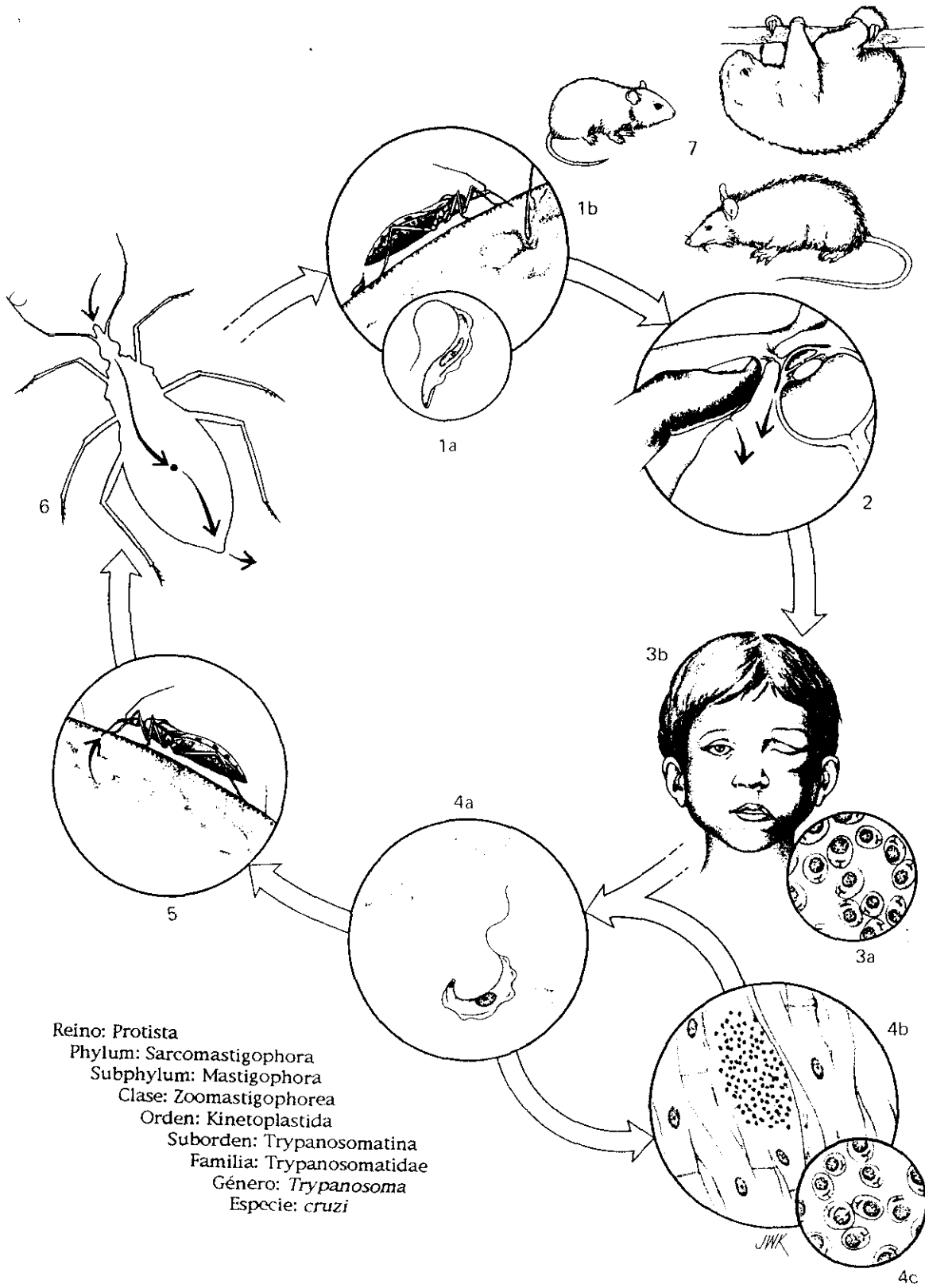
4b En este punto de la infección, cualquier tejido puede albergar parásitos, siendo unos órganos más afectados que otros, tales como el músculo del corazón, músculo esquelético y sistema nervioso.

4c. Los tripomastigotes sanguíneos, penetran a otras células, se diferencian nuevamente en amastigotes y se continúa el proceso de infección indefinidamente, hasta que la respuesta inmune del hospedador se establece o los fármacos actúen.

5. El vector hematófago se infecta, cuando toma sangre de un individuo con tripomastigotes circulantes. En la mayoría de los casos el insecto se infecta a partir de hospedadores silvestres o domésticos que actúan como reservorios.

6. Dentro del insecto vector, el tripomastigote se transforma rápidamente en la forma epimastigote, la cual se multiplica dentro del intestino, produciendo cientos de nuevos parásitos. Los epimastigotes se diferencian en el intestino posterior, en tripomastigotes metacíclicos. El proceso de transformación del parásito involucra una expresión génica diferencial, la cual capacita al parásito para infectar al hospedador.

7. Todos los mamíferos son susceptibles a la infección y pueden servir como reservorios silvestres y domésticos. Algunos presentan signos de enfermedad pero otros establecen un equilibrio de infección, por mecanismos desconocidos.



Ciclo Biológico de *Trypanosoma cruzi*

En condiciones de laboratorio se ha podido obtener el ciclo completo de *Trypanosoma cruzi*. Utilizando medios de cultivo apropiados, se ha podido mantener los parásitos en su forma de epimastigotes como su estadio de multiplicación extracelular, también se pueden obtener las formas metacíclicas infectantes y por medio de infecciones celulares se completa el ciclo obteniendo las formas replicativas de amastigotes intracelulares.

1.3. EL PARASITO *Trypanosoma cruzi* CARACTERISTICAS DE LA POBLACION

La marcada heterogeneidad de *T. cruzi* en la naturaleza y su alta variabilidad genética como ha sido revelada por los estudios de esquizodemas y zimodemas (Dvorak J.A., 1984; Morel C. et al, 1986; Miles M.A. et al., 1977; Tibayrenc M., et al.,1986), requiere y hace posible múltiples investigaciones que permiten relacionar los parámetros funcionales y propios del parásito, con las manifestaciones de la enfermedad en el hospedador mamífero, dentro de áreas geográficas particulares.

La teoría clonal en las poblaciones de *T. cruzi* tiene importantes aplicaciones para el diagnóstico y tratamiento de la tripanosomiasis y para el desarrollo de medicamentos y vacunas contra el parásito. Es conocido que los diferentes clones difieren en su patología y otras propiedades biológicas

Según resultados recientes de los estudios del ADN, *Trypanosoma cruzi* es un organismo que presenta alto polimorfismo cromosomal con complejidad de cariotipo, por lo cual es difícil estimar el número de cromosomas, sin embargo la estabilidad de las moléculas del cariotipo se mantiene durante el tiempo de cultivo.

Ocurren rearrreglos cromosomales que incluyen cambios en el número de copias de genes. Existe por lo tanto cierta correlación entre cariotipo y patrones isoenzimáticos.

La ploidía de *T. cruzi* no es muy clara, algunos estudios atribuyen a *T. cruzi* la constitución diploide otros sugieren la aneuploidía y haploidía con varios cromosomas y/o genes duplicados (Henrikson J., et al., 1996).

Se mantiene la hipótesis de su reproducción básicamente clonal, lo cual es importante en los aspectos biológicos y médicos.

Los zimodemas y esquizodemas descritos por Miles M.A., et al 1987 y Morel C., et al., 1980, se pueden igualar a clones naturales, como lo revelan estudios isoenzimáticos de Tibayrenc M., et al.,1986).

Estos clones naturales se consideran como unidad taxonómica (Tibayrenc M., et al., 1990) y parecen ser estables en amplias zonas geográficas y por largos períodos de tiempo (Tibayrenc M., y Breniere S. F.,1988).

Mediante técnicas electroforéticas se pueden observar diferencias en patrones isoenzimáticos del parásito, correspondientes a variaciones fenotípicas, que a su vez se relacionan con la variabilidad genética de *T. cruzi* (Miles M.A., et al., 1984; Romanha A.J., et al., 1988; Breniere S.F., et al.,1991).

Se ha demostrado que la evolución clonal en *T. cruzi* es muy antigua y por lo tanto los diferentes clones naturales han ido evolucionando de manera independiente en un largo período de tiempo (Tibayrenc M., y Ayala F.J.,1988; Breniere S. F., et al., 1992).

La estructura clonal de las poblaciones de *T. cruzi*, implica una ausencia de reproducción sexual en la naturaleza, ya que ni la segregación de alelos de un locus simple, ni la recombinación entre alelos de diferentes loci, están presentes.

Los criterios que se tienen en cuenta para afirmar la teoría clonal en las poblaciones de *T. cruzi* según lo propone Tibayrenc M., et al., 1990, han sido:

- a. Fijación de la heterocigosidad la cual es incompatible con la segregación meiótica.
- b. Ausencia de segregación genotípica.
- c. Desviación de las expectativas de Hardy-Weinberg dentro de un área geográfica particular.
- d. Idénticos genotipos distribuidos en grandes y diferentes zonas geográficas.
- e. Ausencia de genotipos recombinantes, ya que el número de diferentes genotipos encontrados es mucho más pequeño de lo que se esperaría.
- f. Desequilibrio de linkage.
- g. Correlación entre marcadores genéticos no relacionados.

Los clones, no las especies, serían las unidades evolutivas a considerarse, particularmente con fines médicos y epidemiológicos en el caso de *T. cruzi* y otros parásitos protozoos (Tibayrenc M., y Ayala F.J., 1991).

Estudios de análisis isoenzimáticos de un gran número de aislados de diferentes áreas geográficas, han revelado la existencia de 43 genotipos o cepas isoenzimáticas llamadas también zimodemas,

siendo posible su ubicación filogenética por medio de cálculo de distancias genéticas de los diferentes alelos involucrados (Tibayrenc M., y Ayala F.J.,1988).

A estos genotipos dominantes o cepas isoenzimáticas se les ha designado con el término clonnet o clon Mayor, agrupando así las muestras que tienen idéntico marcador genético, refiriéndose a loci isoenzimático (Veas F., et al., 1990; Breniere S.F., et al.,1992).

Entre el gran número de diferentes clones naturales que han sido aislados, algunos están siempre presentes y se les encuentra frecuentemente en amplias áreas endémicas (Tibayrenc M., y Ayala F.J.,1987).

Se ha reportado el hallazgo de una región hipervariable del ADN del kinetoplasto de *T. cruzi* en el minicírculo HVRm, la cual exhibe secuencias específicas para los clones naturales identificados por trabajos de caracterización isoenzimática.

Se puede considerar el HVRm un buen marcador clonal para los clones Mayores 20 y 39 (Veas F. et al., 1990).

Trabajos recientes, realizados con la técnica de PCR, utilizando la secuencia HVRm, demuestran que es posible identificar los diferentes clones de *T. cruzi* que circulan tanto en vectores como en hospedadores. Considerandose ésta, una metodología bastante específica (Breniere SF. et al, 1992).

Estudios de amplificación génica confirman un fuerte desequilibrio de linkage, comparando aislados de diferentes zimodemas, resultados consistentes con los estudios usando isoenzimas y de acuerdo con lo ya conocido de la estructura clonal de las poblaciones de *T. cruzi* (Steindel M. et al., 1993).

El modelo clonal propuesto, requiere una mayor elaboración y para ello es muy importante un amplio estudio de estas unidades clonales que componen las cepas o aislados naturales de *T. cruzi*. En la presente investigación de tesis, se hace un estudio comparativo cuyos resultados aportarán al conocimiento del comportamiento de diferentes clones, los cuales pertenecen a tres clones Mayores, de los 43 conocidos e identificados por estudios isoenzimáticos, siendo dos de ellos, clon Mayor 19 y 20, muy cercanos en distancias genéticas, reveladas por el número de codones diferentes entre dos poblaciones, y por lo tanto isoenzimáticamente son muy similares entre sí, y a su vez ambos, están más alejados filogenéticamente del clon Mayor 39. (Diagrama adjunto).

1. 4. EL PARASITO *Trypanosoma cruzi* EN CULTIVO DIFERENCIACION Y METABOLISMO

Durante el ciclo de vida del parásito *T. cruzi* ocurren cambios de formas o estadios con características propias.

Estos cambios involucran al parásito en una serie de eventos fundamentales para la supervivencia y la interacción con su hospedador.

El cambio de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos, proceso de metaciclogénesis, observado en los cultivos axénicos de *T. cruzi*, merece especial interés, ya que este proceso ocurre naturalmente dentro del insecto vector triatomino, e involucra una expresión génica diferencial, lo cual capacita a esta forma para infectar al hospedero mamífero (Golbenberg S., et al., 1984).

Se ha encontrado una estrecha relación entre el porcentaje de parásitos diferenciados y la resistencia a la lisis del complemento. Experimentos realizados con *T. cruzi* clon Dm 28c cultivados en medio TAUP, muestran que los tripomastigotes metacíclicos son resistentes a la lisis del complemento (Contreras V.T., et al, 1985).

Se han desarrollado varios sistemas complejos de diferenciación in vitro para *T. cruzi*, con el fin de seguir el proceso de transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos (Camargo E. P.,1964; Castellani N., et al.,1967; Chiari E.,1975; Sullivan J.,1983; Contreras V.T., et al.,1985).

También se han introducido cambios químicos en las composiciones de los medios de cultivo con el fin de proveer reproducibilidad de la metaciclogénesis en cultivo axénico de *T. cruzi* (Contreras V.T., et al., 1985; Goldenberg S., et al, 1987).

En condiciones de cultivo y cuando la glucosa está presente, el catabolismo de epimastigotes en fase exponencial ocurre vía glicolítica, con producción neta de succinato, CO₂ y acetato, como productos finales (Cazzulo J., et al.,1985; Cannata J. B., et al.,1984).

Cuando la glucosa se consume, los parásitos activan el catabolismo de los aminoácidos, con producción neta de CO₂ y NH₃ y aunque los epimastigotes continúan dividiéndose aún con disminución de nutrientes, las células empiezan a transformarse en tripomastigotes metacíclicos (Fernández J.F. et al.,1969; Krassner S. M. et al., 1990; Urbina J.A., 1994).

Estudios diversos de la metacicloogénesis de *T. cruzi* en cultivos axénicos, confirman que la escasez de nutrientes inducen una presión de "stréss fisiológico" que desencadena la transformación del parásito a su estadio infectivo.

Otros experimentos han revelado que la formación de ácidos orgánicos estimulan la transformación. Es así como adicionando ácido acético y pirúvico al medio libre de glucosa, con ph ligeramente ácido, ocurre una rápida diferenciación, lo que sugiere la participación del ciclo tricarboxílico en el metabolismo de la diferenciación en *T. cruzi* (Brener Z., 1973).

Al parecer la ausencia de glucosa disponible, combinada con una actividad aumentada del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), es un evento simultáneo con la transformación de *T. cruzi* (Krassner S.M. et al.,1990), además este autor informa como resultado de su estudio, que azúcares intermedios en el metabolismo de la glucosa, inducen la transformación de epimastigotes a formas metacíclicas. Igualmente se confirma que la glucosa y la prolina inducen la transformación de *T. cruzi* in vitro.

La metacicloogénesis en cultivo también puede estar condicionada por la concentración de aniones y cationes libres en el medio.

Algunos autores reportan la presencia de aminoácidos como factor importante en la metacicloogénesis (Adroher F.J. et al.,1990).

Otros reportes enfatizan la importancia de la duración del cultivo (Chiari E., 1976), el ph del medio y la cantidad de población inicial del parásito (Castellani N.,et al.,1967).

Otro factor a tener presente en la diferenciación es la cepa o clon de *T. cruzi* que se está estudiando, ya que existen comportamientos diferentes entre las poblaciones del parásito (Carne M. y Dvorak J.A.,1982).

Es conveniente asegurarse que la expresión génica diferencial observada durante la metacicloogénesis, no se debe a la heterogeneidad de la población clonal dentro de la cepa de *T. cruzi* (Deane M.P.,1984; Dvorak J.A.,1985).

Por tal razón es conveniente el uso de poblaciones homogéneas como lo son los clones, para el estudio de diferenciación en *T. cruzi* (Contreras V.T. et al., 1988).

Como respuesta al "strés fisiológico" sufrido por *T. cruzi* en cultivo axénico, se ha encontrado que hay un incremento en la concentración intracelular del AMP cíclico y de los activadores de la adenilato ciclasa, lo que conduce a la estimulación de la metacicloogénesis (González-P et al.,1988).

Otros resultados confirman los estudios que revelan claramente, que los tripomastigotes despliegan mayores niveles de AMP cíclico que los epimastigotes (Rangel-Aldao R. et al., 1987).

Estudios posteriores indican que durante la metacicloogénesis, la fosforilación proteica es muy dinámica y que el AMP cíclico efectivamente puede ser el responsable (Goldenberg S.,1990). Igualmente se encontró que el mayor antígeno de superficie de tripomastigotes metacíclicos está fosforilado.

En otras investigaciones se había descrito que el AMP cíclico estimula la transcripción de un gen de *T. cruzi* el cual presenta homología con el proto-oncogen C-Fos (Heath S. et al., 1989).

Los tripomastigotes metacíclicos expresan diferentes grupos de genes, ya que los parásitos sintetizan diferentes proteínas de acuerdo a su origen sea de cultivo, vector o de sangre (Contreras V.T. et al., 1985b).

Otra de las características de *T. cruzi* en la metacicloogénesis in vitro es la necesidad de adhesión de los epimastigotes a un substrato, antes de la diferenciación (Bonaldo M.C., et al., 1988). Igual está de acuerdo con los estudios previos, en los cuales se demuestra que el epimastigote se adhiere a la superficie del intestino del insecto vector para que ocurra su transformación (Zeledon R., et al., 1984).

De los estudios realizados por Goldenberg S., 1990 y Esteves M.G., et al.,1989, se deriva la información que durante la metacicloogénesis, ocurre un cambio en la composición de los ácidos grasos, como una de las primeras señales del inicio de la metacicloogénesis, evento que se relaciona con los cambios en la fluidez de la membrana del parásito consecuentemente a su interacción con el medio ambiente.

Dado que el contenido del ADN del kinetoplasto en epimastigotes y tripomastigotes, es esencialmente el mismo pero que las fibras están más fuertemente empaquetadas en epimastigotes que en tripomastigotes, se sugiere que esta diferencia es debida a la actividad de la topoisomerasa durante el proceso de diferenciación (Dvorak J.A., et al., 1982).

En estudios realizados por Goldenberg S.1990, se encuentra que la topoisomerasa II antagonista, inhibe la replicación y la metaciclogénesis en *T. cruzi* siendo entonces una posible diana para la quimioterapia en la enfermedad de Chagas.

Existen varias evidencias que los parásitos eucariotes, expresan proteínas de shock térmico (HSP) en sus procesos de diferenciación (Rondinelli E.,1994).

Los mecanismos moleculares en la diferenciación de *T. cruzi* a formas metacíclicas, involucran efectivamente, la producción de proteínas de shock térmico (HSP), las cuales preparan al parásito para infectar al hospedador humano (Moncayo A., 1994).

Los estudios de Nozaki T. y Dvorak J.A.,1993, demuestran que la marcada diversidad intraespecífica que existe en *T. cruzi* se extiende a la respuesta específica que desarrolla el parásito ante el "stress" medio ambiental que experimenta en su ciclo de vida.

Se ha encontrado que los cambios de temperatura inducen cambios en el ADN del parásito, sin embargo estos cambios son temporales, implicando que representan adaptaciones más que mutaciones. Finalmente se demuestra que los cambios de temperatura únicamente, no son suficientes para desencadenar el desarrollo de la transformación.

Es sabido que la mayor proteinasa de cisteína responsable de la mayor actividad proteolítica del parásito *T. cruzi* es la cruzipain (Cazzulo J.J., et al.,1985). Esta proteinasa es codificada por un alto número de copias de genes repetidos, localizados en un número variable de cromosomas (Captella O.,et al.,1992).

Estudios posteriores revelan que inhibidores específicos de la cruzipain proteasa en *T. cruzi* bloquean la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos (Urbina J. A.,1994).

Es bien conocido que los aislados de *T. cruzi* tienen una notoria capacidad para utilizar carbohidratos o aminoácidos como fuentes de carbono y de energía (Cazzulo J.J.,1992).

Igualmente, se sabe que estos parásitos son incapaces de degradar completamente los carbohidratos, incluso en presencia de oxígeno, produciendo una mezcla de CO₂, ácidos orgánicos y alanina como productos finales del metabolismo (Bowman I. B. y Flynn I. W. 1976; Rogerson G. N. y Gutteridge W. E. 1980; Cazzulo J. J.,1992; Sánchez-M M., et al.,1995).

La relativa proporción de estos productos de degradación varía según los aislados de *T. cruzi*, que se estudian (Urbina J. A., et al., 1993).

El consumo de la glucosa por los protozoos trypanosomátidos está caracterizado por la excreción de productos reducidos tales como el succinato, piruvato, etanol, alanina o lactato, dependiendo de las especies, tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas (Cazzulo J. J., 1992).

1. 5. INFECCION CELULAR IN VITRO CON *T. cruzi*

El parásito *Trypanosoma cruzi* tiene la capacidad de invadir un gran número y variedad de células de mamíferos. La naturaleza de receptores y el mecanismo de interacción es motivo de múltiples investigaciones.

Se ha encontrado que los macrófagos y células musculares son las principales células diana para la invasión de *T. cruzi*.

Estudios ultraestructurales de este fenómeno in vitro, muestran que la invasión ocurre por procesos de endocitosis, con unión e interiorización mediados por diferentes componentes capaces de reconocer al parásito (Araujo-J T.C de. et al., 1992).

Estudios de infección con *T. cruzi* reportan que el parásito reconoce residuos síalicos en la superficie de las células durante el proceso inicial de invasión (Ming M. et al., 1993).

Otras investigaciones revelan que el balance entre ácido síalico y galactosa/N-acetil galactosamina en la superficie de los tripomastigotes, es uno de los factores determinantes en la capacidad de invadir las células (Araujo-J T.C.de. et al,1992).

Se ha demostrado que *T. cruzi* no sintetiza ácido siálico pero contiene la transialidasa capaz de transferir el ácido siálico de glicoconjugados del hospedador.

Se reconoce que este ácido es necesario para la invasión celular (Schenkman S., y Eichinger D., 1993).

La adhesión y la interiorización son los dos eventos iniciales en la asociación entre *T. cruzi* y la célula hospedadora, siendo el parasitismo celular, el suceso que tiene un papel central en la patogénesis (Henriquez D. et al.,1981; Andrews N. y Colli W., 1982).

Tanto los epimastigotes, como los tripomastigotes y formas metacíclicas se unen a la superficie celular, no hay diferencia en este paso (Monteon V. M. et al., 1992).

La formación de vacuola parasitófora durante la penetración del parásito *T. cruzi* ha sido demostrada tanto en células fagocíticas como en las no fagocíticas, como fibroblastos y células musculares (Nogueira N. y Cohn Z., 1976; Meirelles M.N., et al., 1986).

Aunque las formas epimastigotas no infectivas, y las formas infectivas tripomastigotas, entran a las células mediante la formación de vacuola parasitófora, únicamente el estadio infectivo sobrevive a la ingestión por mecanismos complejos de evasión. .

Esto puede indicar que las proteínas de la membrana plasmática, incorporadas dentro de la vacuola son diferentes, dependiendo del estadio del parásito que fué interiorizado y que estas diferencias reflejan receptores de unión selectivos (Hall B. F., et al., 1991).

Estudios de infección con *T. cruzi* revelan que la entrada del parásito a la célula, está mediada por receptores específicos, requiere síntesis de proteínas, involucra azúcares de superficie e intervención de nucleótidos. A su vez puede ser inhibida por varios factores y moléculas como la N-acetil glucosamina (Piras R. et al., 1982; Crane M.S. y Dvorak J.A., 1982).

Ha sido documentado que el ataque inicial y la invasión de *T. cruzi* a las células del hospedador, pueden ser afectados por una variedad de perturbaciones químicas, que involucran tanto a la célula como a la membrana plasmática del parásito.

Ejemplo de ello es el tratamiento con proteasas (Nogueira N., y Cohn Z., 1976; Henriquez D. R. et al., 1981; Piras M. et al., 1985), lectinas (Zenian A. y Kierszenbaum F., 1982; Meirelles M N. et al, 1983), y azúcares específicos (Dvorak J A., 1984; Zingales B. y Colli W. 1985).

De acuerdo a resultados de estudios con microscopía electrónica, se ha evidenciado la interacción del parásito *T. cruzi* con la célula de macrófago, revelándose el papel importante que desempeña la proteinasa de cisteína o cruzipain, presente en la superficie del parásito (Moncayo A., 1994).

Amplios estudios, sobre las interacciones moleculares entre el parásito *T. cruzi* y la célula hospedadora, se han obtenido a partir del análisis de los determinantes moleculares en la superficie del parásito, tratando de dilucidar cuál de todas las moléculas juega un papel predominante en la invasión.

Varias moléculas han sido candidatizadas, la glicoproteína Tc-85 (Zingales B. y Colli W., 1985), la glicoproteína 83 kilodalton (Boschetti M., et al.,1987), y el receptor colágeno-fibronectina (Ouaissi M A. et al, 1986; Velge P., et al.,1988).

Se han encontrado altos niveles de la enzima neuraminidasa asociada con el proceso de invasión del parásito *T. cruzi* y un progresivo incremento de la afinidad específica por la D-galactosa (Csete M., et al., 1985; Barbosa H.S., et al., 1993).

La relación entre varias glicoproteínas no está muy clara todavía y no existe un consenso de cuál o cuáles en combinación, son más relevantes en el proceso de la invasión del parásito.

Sin embargo la opinión común de los investigadores es que la invasión de células de mamíferos por *T. cruzi*, depende de la habilidad del parásito para reconocer los receptores específicos en la membrana de la célula (Snary D.,1985; Zingales B., y Colli W.,1985).

Información acerca de receptores de superficie designan a las proteínas 32 y 34 kda. como receptores de la célula hospedadora para antígenos del parásito *T. cruzi* comprometidas en la invasión y los cuales no corresponden a las subunidades polipéptidas receptoras de la fibronectina (Davis C. D., y Kuhn R., 1990).

El parásito *T. cruzi* entra a la célula hospedadora formándose la vacuola parasitófora que a su vez se une con el lisosoma, y mediante mecanismos de evasión el parásito logra escaparse al citoplasma donde se establece la infección.

En el escape del *T. cruzi* del fagosoma se cree puede estar implicada una hemolisina capaz de perforar la membrana (Ley V., et al.,1990).

Otros investigaciones revelan la existencia de un antígeno glicoconjugado de 35/42 kda. y de una glicoproteína 90 kda presentes en la superficie de la forma metacíclica del parásito.

Investigando acerca de si la molécula 35/42 kda podría ser ligando para receptor celular, utilizando anticuerpos monoclonales que lo reconocen, se encontró que efectivamente, este antígeno purificado puesto en contacto con células VERO, se une a ellas, inhibiendo la entrada de las formas metacíclicas, lo que confirma su papel de ligando en el proceso de la invasión (Ruiz R. de C., et al., 1993).

Se conoce que *T. cruzi* no realiza variación antigénica de superficie como ocurre con *T. brucei*, sin embargo cada forma del ciclo biológico tiene diversidad de glicoproteínas y glicolípidos en su

superficie, siendo algunas específicas de estado y varían su estructura según la cepa del parásito (De Souza W. et al., 1978).

Otros estudios moleculares han revelado la existencia de una glicoproteína de aproximadamente 82 kda. en la superficie de tripomastigotes metacíclicos, como la responsable de la entrada del parásito en las células del hospedador a través de un ligando receptor. También se descubrió que este componente de superficie de los tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* involucrado en la penetración, es una molécula que no hace parte de los tripomastigotes sanguíneos ni de aquéllos derivados de cultivo celular (Ramirez M.I., et al., 1993).

Como se ha mencionado anteriormente, *Trypanosoma cruzi* se divide intracelularmente como amastigotes y finalmente se transforma en tripomastigotes que salen al exterior de la célula y eventualmente pueden ser ingeridos por el insecto vector (Mortara R.A., 1991).

En la infección celular con *T. cruzi*, la vacuola parasitófora contiene la forma metacíclica. En los primeros momentos de la entrada del parásito ocurren procesos fisiológicos importantes y la forma metacíclica se transforma en amastigote.

Se confirma que los amastigotes producen proteínas hemolíticas TC-TOX, las cuales forman poros en la membrana del fagosoma, permitiendo el escape del parásito al citoplasma donde empieza a diferenciarse en tripomastigotes (Rondinelli E., 1994).

Después de la penetración del parásito en la célula, el tripomastigote envuelto por la vacuola mantiene escasa movilidad, luego empieza a transformarse en amastigote, proceso que puede durar cerca de tres horas y así permanece durante aproximadamente cuarenta horas antes de iniciar su replicación. La síntesis de ARN se inicia tres horas después de la penetración (Crane M.S.T., et al., 1980).

Se han realizado numerosos estudios, con el fin de dilucidar los mecanismos de interacción del parásito con su célula hospedadora, se conoce que el contacto inicial y la interiorización requiere energía metabólica, las enzimas succinato dehidrogenasa y la fumarato reductasa son dos enzimas críticas para el metabolismo energético (Rubbo H. et al., 1994).

Además ya es conocido que, componentes de la membrana lisosomal contribuyen a la formación de la vacuola parasitófora.

El escape del parásito de la vacuola, depende de la acidificación y al parecer está mediada por la acción coordinada de una

neuroaminidasa derivada del parásito y una sialidasa capaz de desializar los constituyentes de dicha membrana con una consecuente formación de poros (Hall B.F.,1993).

Los amastigotes en el citoplasma celular, se van multiplicando por fisión binaria, mediante nueve a diez divisiones consecutivas, y revierten de manera no sincrónica, a tripomastigotes, vía epimastigotes como estadios intermedios.

Luego la célula se rompe liberando los tripomastigotes, y se continúa la infección (Dvorak J.A., 1976; Tafuri W.L., et al.,1983.).

Existen líneas celulares establecidas con propiedades óptimas para estudios de infección celular, ya que posibilitan la interiorización del parásito y el posterior establecimiento de la infección, características que permiten estudios de seguimiento de los mecanismos y comportamiento del parásito *T. cruzi* en condiciones de laboratorio.

Algunas de las células más utilizadas en los estudios del desarrollo intracelular de *T. cruzi* han sido, los cultivos celulares de embrión de pollo (Meyer H. y Oliveira M., 1948), líneas celulares permanentes como células VERO (Hanson W.L. et al.,1976; Brener Z. et al, 1976; Bertelli M.S. y Brener Z., 1980; Velasco J.R.,1989), líneas de macrófagos (Carvalho V.T.,1983) y fibroblastos de ratón (Tanowitz H. et al., 1975).

Se ha demostrado que la línea celular J774 es deficiente en la producción de metabolitos intermedios de oxígeno después de la fagocitosis, lo que permite la continuidad intracelular del parásito, esta línea se comporta como macrófagos (Ralph P., et al., 1975).

Estudios de infección con *T. cruzi* han revelado que los tripomastigotes invaden células de mamíferos de manera polarizada y penetran los fibroblastos en la periferia celular donde la fibronectina y sus receptores celulares están concentrados (Schenkman S. et al., 1988).

La alta motilidad del tripomastigote es más eficiente que el amastigote para la interiorización en la célula hospedadora, lo que supone un mecanismo que involucra la participación activa del parásito en el proceso de entrada (Kipnis T.L., et al., 1979).

Durante el proceso de invasión celular de *T. cruzi* a la célula y después de la asociación del parásito con dicha célula, se ha encontrado un aumento significativo en la concentración de calcio intracelular.

Es de anotar que el calcio intracelular sirve como factor de los segundos mensajeros con miras al control de la variabilidad funcional de la célula (Do Campo y Moreno S.N.J.,1996).

Existen sólidas evidencias que demuestran la citotoxicidad del óxido nítrico en macrófagos en contra de parásitos y bacterias. Se demuestra la actividad parasiticida de éste, contra *Trypanosoma cruzi* (Denicola A. et al, 1993).

Son numerosos y complejos todos los mecanismos que implican la interacción hospedador-parásito, los cuales se han desarrollado coevolutivamente en una fina y especial adaptación.

1. 6. INFECCION CON *T. cruzi* EN MODELO EXPERIMENTAL

El parásito *T. cruzi*, tiene un amplio rango de hospedadores mamíferos, en los cuales se establece la infección.

En experimentos controlados se utilizan diferentes modelos tales como conejos, ratones, ratas, perros y hamsters (Pizzi T.P., 1957; Okuma M. et al.,1966; Brener Z.,1973; Scott M.T.,y Goss-Sampson 1984; Figueiredo F. et al.,1985; De-Gaspari E. et al. 1990; De-Lana M. et al., 1992; Ramirez L.E. et al., 1994).

El modelo murino es muy adecuado para reproducir las lesiones y alteraciones histológicas de la enfermedad de Chagas. También ha sido utilizado para estudios de respuesta inmune, obteniéndose los mejores resultados de infección experimental y es un buen modelo en programas de prueba para drogas y posibles vacunas (Wrightsmán R., et al., 1982; Andrade V. et al.,1985; Zweerink H. et al.,1985; González -C S.M., y Mirkin G.,1994).

Es conocido que, distintas cepas de ratones difieren en la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* y se ha planteado que existe un control genético complejo de los niveles de parasitemia y de la supervivencia de los animales infectados (Wrightsmán R. et al.,1982; Zweerink H. et al., 1985).

Algunas cepas de ratones se comportan como resistentes y otras como susceptibles (Juri M.A., et al., 1990). Estudios en fase aguda de infección con *T. cruzi* en diferentes cepas de ratones, revelan que ratones cepa Swiss son medianamente susceptibles (Mc Cabe R., et al., 1989).

Entre los factores genéticos importantes que determinan la resistencia o susceptibilidad a la infección con el parásito *T. cruzi* se encuentran los genes ubicados en el sistema mayor de histocompatibilidad del ratón (complejo H-2), cuyos productos están involucrados en la regulación de la respuesta humoral y celular a diversos antígenos (Wrightsmann R. et al., 1982; Juri M., et al., 1990).

La edad, sexo, constitución genética y dosis del parásito inoculada a los ratones, al igual que la cepa o clon de *T. cruzi* son factores importantes que influyen en la evolución de la infección y enfermedad. También es conocido que a bajas temperaturas ambientales se encuentran mayores parasitemias y las deficiencias nutricionales afectan notoriamente (Brener Z., 1973).

Los tripomastigotes infectan un gran número de células del hospedador mamífero, el parásito se diferencia en amastigotes intracelulares, los cuales se multiplican y a su vez se transforman en tripomastigotes.

Las células se rompen y los parásitos son liberados, invaden otras células adyacentes o se diseminan por el torrente sanguíneo llegando a otros órganos.

Este ciclo lleva a un incremento exponencial en la población del parásito, tanto intracelularmente como en sangre (Brener Z., 1994). Los amastigotes intracelulares se dividen de manera asincrónica, dando lugar a muchos amastigotes dentro, los cuales se evidencian como agrupaciones del parásito llamadas pseudoquistes (Dvorak J.A., 1975).

Han sido numerosos los estudios realizados con el parásito *T. cruzi* con miras a dilucidar factores involucrados en la parasitosis y las diferencias existentes de acuerdo a los estadios.

En investigaciones de Ouaiissi M. A., et al., 1984, se pudo identificar un sector específico en el tripomastigote sanguíneo, que se une a fibronectinas de las células de los mamíferos.

Por otra parte el investigador Nogueira N., 1980 y 1983, encontró un factor antifagocítico en la superficie del tripomastigote sanguíneo, con actividad glicosidasa, y que no se encuentra en la forma metacíclica procedente de cultivo. Lo que permite pensar que este factor probablemente defiende al parásito del ataque humoral, alterando el dominio Fc de las inmunoglobulinas.

Resultados de recientes estudios, confirman el papel relevante de las lectinas específicas en trypanosomátidos, las cuales intervienen en la interacción del hospedador con el parásito, ya que son

proteínas que se unen a residuos de carbohidratos específicos (Jacobson R.L., y Doyle R.J., 1996).

Estudios llevados a cabo por Wrightsman R. et al 1982, permitieron dilucidar los varios genes en el genoma del ratón, los cuales son responsables del control de la respuesta a parásitos intracelulares y en general de la respuesta a la infección con *T. cruzi* .

Por lo tanto, según sus observaciones los autores concluyen que las bajas parasitemias son debidas en parte, a una expresión dominante del ratón a la infección. Además anotan que, las células T están involucradas en los niveles de parasitemia en todas las cepas de ratón.

En ocasiones se ha planteado que los niveles de parasitemia que se obtienen en ratones infectados experimentalmente, dependen de la cepa del parásito sin tener en cuenta el tamaño del inóculo (Andrade S.G.,1974).

Sin embargo estudios recientes revelan que el número de parásitos de *T. cruzi* inoculados es un factor muy importante para la evolución de la infección, ya que modifican la prepatencia, los niveles de parasitemia y la supervivencia de los ratones susceptibles.

Se ha revelado, que cepas de ratones susceptibles a la infección con 2.000 a 10.000 parásitos, se comportan en realidad como resistentes, cuando se infectan con una dosis menor de parásitos (Zúñiga C.,1995).

Probablemente la baja carga parasitaria inicial permite al animal desarrollar una respuesta inmune adecuada para controlar la infección (Marsden P.D.,1967).

Diferentes investigaciones de infección con modelos experimentales de ratones, muestran de igual manera, que los niveles de parasitemia no son indicadores de la potencial duración de los animales (Kuhn R.E., y Durum S.K.,1975; Wrightsman R. et al, 1982). Estudios realizados por DeTitto et al., 1987, revelan que subpoblaciones de *T. cruzi* obtenidas de ratones previamente infectados, pueden diferir en la capacidad de infectar células y en la capacidad de infección letal en ratones.

Ratones infectados con el parásito *T. cruzi* muestran severa inmunosupresión, afectándose la actividad de las células T ayudadoras y la anormal supresión y expresión de citoquinas. Poco se sabe acerca de los mecanismos por los cuales la inmunosupresión es inducida y mantenida durante la infección, ni

acerca de la interacción celular la cual puede ser requerida por la actividad inmunoreguladora (Cerrone M.C., y Kuhn R.,1991).

Ha sido postulado, que ratones infectados con un simple estímulo antigénico de *T. cruzi* desarrollan una pequeña población de células T ayudadoras, pero la expansión clonal de los linfocitos es reducida por un segundo grupo de macrófagos supresores en el umbral requerido para producir una respuesta inmune detectable.

La administración de un segundo reto antigénico en el tiempo correcto, puede desencadenar la expansión de células T ayudadoras en tasa superior a la de los macrófagos supresores, en el umbral necesario para vencer la supresión e inducir la respuesta inmune (Cerrone M.C., y Kuhn R.,1991).

Algunos agentes químicos y físicos se han utilizado para el estudio del efecto de inmunosupresión en la enfermedad de chagas experimental.

La ciclofosfamida regularmente incrementa la parasitemia y en algunos casos la mortalidad y la severidad de la miocarditis, en la fase aguda en ratones de experimentación .

Todo parece indicar que la ciclofosfamida interfiere con la red de inmunosupresión la cual aparentemente, sostiene la forma indeterminada de la enfermedad (Brener Z.,1994).

Estudios inmunológicos revelan la importancia de las células T para el control de la parasitemia y susceptibilidad a la infección con el parásito *T. cruzi*.

Una alta parasitemia que impide la supervivencia del ratón durante la fase aguda, puede estar relacionada con la pérdida de la síntesis de anticuerpos específicos, o por la ausencia de citoquinas capaces de activar los macrófagos que destruyen los parásitos intracelulares.

Se enfatiza el papel de los linfocitos CD8 en la protección contra la infección de *T. cruzi* en los hospedadores mamíferos incluyendo el humano (Hontebeyrie M.,1994).

Otras investigaciones con ratón realizadas en fase aguda de la infección con *T. cruzi*, muestran que el interferon gamma activa los macrófagos, inhibiéndose la multiplicación del parásito, lo que conlleva a una disminución de la parasitemia y de la mortalidad en muchos casos.

En otro estudio paralelo se comprueba que no hay ningún efecto del factor de crecimiento celular (TGF) en la disminución de la parasitemia ((Mc Cabe R.E. et al.,1991; Silva J.S., et al.,1991).

Son muchos los cambios que se observan en la actividad celular del hospedador en las infecciones con *T. cruzi*.

Los tripomastigotes pueden ser destruidos por los macrófagos activados y los mecanismos independientes de oxígeno también tienen gran importancia (Mc Cabe R.E. y Mullins B.T., 1990).

Posteriormente con otros estudios, se ha demostrado la actividad parasiticida del óxido nítrico (NO), producido por los macrófagos activados en contra del parásito (Denicola A., et al, 1993).

Estudios en macrófagos de ratones infectados con *T. cruzi*, revelan transferencia de fragmentos de ADN entre el parásito y la célula del hospedador. El ADN del kinetoplasto de *T. cruzi* se integra en el genoma del macrófago, alterándose la regulación de la expresión génica en el hospedador (Texeira A.R., et al., 1994).

Trabajos en el campo de la biología molecular, han reportado que un péptido sintético de *T. cruzi*, de 19 aminoácidos (SP4), muestra actividad de protección cuando se administra a ratones, ya que se observa que induce las respuestas humoral y celular, por semejanza conformacional del antígeno del parásito (Bua J. et al., 1991).

1. 7 TRIPANOSOMIASIS AMERICANA O ENFERMEDAD DE CHAGAS

Las infecciones humanas con el parásito *T. cruzi*, pueden ocasionar serios problemas de morbilidad y mortalidad en poblaciones de países endémicos de América.

Se estima que 16 a 18 millones de personas están infectadas y cerca de 90 millones están en riesgo de adquirir la infección (Moncayo A. 1994).

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es fundamentalmente una zoonosis, donde el humano es un hospedador accidental.

El parásito *T. cruzi* es un protozoo hemoflagelado el cual es transmitido a los hospedadores vertebrados mediante las deyecciones infectadas de un insecto hematófago, en el momento de la ingestión de sangre.

1.7.1. Transmisión del parásito: Existen tres ciclos de transmisión de *T. cruzi* en los cuales el vector participa (Schmunis GA.,1994).

1.7.1.1 El ciclo doméstico, responsable de la infección en humanos, ocurre en viviendas rurales y periurbanas, cuyas paredes de las casas son construídas con bareque y techo de paja.

Los animales domésticos que viven estrechamente con el humano, son los reservorios del parásito. El insecto vector vive y se multiplica en las hendiduras de las paredes, debajo de los muebles y en rincones oscuros de las habitaciones.

1.7.1.2 El ciclo peridoméstico, en el cual animales domésticos se mueven libremente fuera de la habitación humana y pueden ser picados por insectos selváticos infectados.

1.7.1.3 El ciclo selvático, involucra vectores netamente selváticos que se infectan de animales silvestres y a su vez los infectan, tales como diferentes especies de roedores y marsupiales. El humano también se puede infectar ocasionalmente cuando incurre a este habitat.

Las infecciones humanas por transmisión involucrando al vector, suelen ocurrir en poblaciones endémicas socioeconómicamente deprimidas.

Existen otras infecciones por *T. cruzi* que son de importancia y en las que no interviene el vector directamente, son las adquiridas por transfusiones sanguíneas (Zuna H., et al., 1985; Martelli C.M.T., et al., 1992), transmisión transplacentaria encontradas en recién nacidos entre 1-10% y algunas pocas infecciones por accidentes en laboratorio (Azogue E. et al., 1985; Brener Z., 1984; Zuna H., et al., 1985; Martelli C.M.T., et al., 1992; Kirchhoff L.V., 1993).

En los últimos años debido a la problemática del SIDA se ha incrementado el conocimiento de la población infectada con *T. cruzi* por la necesidad del análisis serológico, lo que ha evitado en alto grado la transmisión transfusional de la enfermedad de Chagas (Schmunis G. 1994).

1.7.2. FASES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

En la tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas pueden distinguirse tres fases o formas clínicas:

1.7.2.1 Enfermedad aguda: Se presenta en el 5% de los individuos infectados. Comprende la primoinfección y la observación del parásito en su estadio de tripomastigote sanguíneo, en la cual se puede evaluar las parasitemias, que estarán de acuerdo con las características del hospedador y la virulencia del parásito.

Las manifestaciones del Chagas agudo aparecen después de un período de incubación de 3 a 12 días. La evidencia de entrada del parásito o chagoma de inoculación es notable en los casos agudos, cerca del 80% al 100% presentan la manifestación cutánea o el signo de Romaña caracterizado por el edema palpebral, constituyendo un elemento de alto nivel diagnóstico.

La sintomatología incluye hipertemia con intensidad y duración variables, irritabilidad, cefaleas y mialgias, astenia, anorexia, y en ocasiones somnolencia, dolores osteoarticulares, adenopatías satélites o generalizadas, hepato y esplenomegalia y ocasionalmente vómitos (Basso G. et al, 1978).

En alto porcentaje ocurre compromiso cardíaco con miocarditis aguda, y en menor grado compromiso neurológico que puede llegar a la meningoencefalitis. En los niños lactantes se presentan las mayores complicaciones y su severidad guarda estrecha relación con el pronóstico (Bocca T. C.,1972).

La fase aguda de la enfermedad suele pasar inadvertida en muchos casos.

Aproximadamente entre uno y dos meses después de la primoinfección, la parasitemia cesa por la respuesta inmune y se establece la fase crónica. Se han reportado casos de reagudización en pacientes crónicos inmunosuprimidos.

1.7.2. 2 Fase latente: La mayoría de los pacientes se recuperan de la fase aguda y permanecen aparentemente asintomáticos por largos períodos de tiempo, incluso toda la vida, considerándose ésta, la forma "indeterminada" de la enfermedad de Chagas (Brenner Z., 1994).

Los individuos infectados pero sin ninguna sintomatología inicial, sufren una evolución lenta de la infección, la cual dará paso a una sintomatología, sin resolver la infección como suele ocurrir algunas veces en otras parasitemias. Por lo tanto también se les debe considerar como individuos enfermos (Braun M. y De-Titto E. 1985).

1.7.2.3 Enfermedad crónica: Se caracteriza por la desaparición de parásitos en sangre. Entre el 60-80% de los individuos infectados la padecen (Hontebeyrie-J M., 1993).

El Chagas crónico afecta con un grado variable de compromiso, los diferentes órganos del individuo infectado. Los órganos más frecuentemente afectados son el corazón, tubo digestivo y musculatura en general.

No se tiene muy claro todavía si las formas crónicas son secuelas de la enfermedad aguda o son manifestaciones tardías o independientes de la primoinfección (Braun M. y De-Titto E.,1985).

Cabe señalar que la mayor prevalencia de patología en la fase crónica se presenta en pacientes que tuvieron alguna manifestación clínica durante la fase aguda y que al parecer existe una correlación significativa entre las formas clínicas y el área geográfica, lo que lleva a pensar que puede haber una relación importante con la variabilidad de los parásitos, con los hospedadores y sus condiciones ambientales y de nutrición (Pinto-D. J.C.,1982).

El compromiso cardíaco es la manifestación más frecuente de la enfermedad crónica, se expresa varios años después de adquirida la infección, con evolución lenta e irreversible.

Clinicamente la cardiopatía chagásica, puede presentarse con síntomas de trastornos del ritmo cardíaco y/o de insuficiencia miocárdica. Por imágenes radiológicas se observa que el tamaño del corazón aumenta hasta la cardiomegalia, por dilatación e hipertrofia, principalmente de las cavidades izquierdas.

Las anomalías electrocardiográficas más frecuentes corresponden a trastornos en la conducción del impulso eléctrico y en el ritmo cardíaco (Rosembaum M.B.,1964).

El Chagas crónico presenta características peculiares y la parasitemia es subpatente, los tripomastigotes sanguíneos, cuando los hay, sólo se detectan por métodos parasitológicos indirectos como el xenodiagnóstico y hemocultivo (Brenner Z.,1994)

La fase crónica se caracteriza por una continua producción de lesiones tisulares, las cuales son independientes de la presencia del parásito. Durante la enfermedad crónica el daño tisular se atribuye a mecanismos de tipo inmunológico (Gazinelli G. y Brenner Z.,1991).

Estudios llevados a cabo en autopsias de pacientes chagásicos, revelan que el número de parásitos encontrados en tejidos, suele ser muy bajo y esto lleva a suponer que son más los factores que participan en la patogénesis de la enfermedad de Chagas que la sola presencia del parásito.

Actualmente se conoce que la respuesta inmune humoral y celular del hospedador inducen a una ruptura de la autotolerancia, debido a factores muy complejos en la interacción parasitaria (Brenner Z., 1994).

Se han mencionado algunos factores que perturban la autotolerancia en el hospedador, tales como secuencias de péptidos compartidas por autoantígenos, y la posible inserción de ADN del parásito en el ADN de la célula.

También se ha considerado la existencia del mimetismo molecular entre antígenos de *T. cruzi* y tejidos del hospedador, lo que explicaría el daño tisular autoinmune en la enfermedad de Chagas (Avila J.,1992; Mesri E.A., et al.,1990; Levitus G., et al., 1991).

En la actualidad y según resultados de muchos estudios, se cree que la patología del Chagas crónico es producida por reacciones autoinmunes, dirigidas en contra de células musculares y nerviosas principalmente como también en menor grado por directa destrucción celular por parte del parásito.

1. 8. INMUNOLOGIA EN LA INFECCION CHAGASICA

Las múltiples investigaciones llevadas a cabo para dilucidar los mecanismos de la interacción hospedador-parásito, tanto en modelos experimentales de infección con *T. cruzi*, como en individuos con enfermedad de chagas, han evidenciado una serie de conocimientos relacionados con la respuesta inmune del hospedador mamífero.

Existe una extensa y completa revisión de la inmunología en las infecciones con *Trypanosoma cruzi*, entre ellos Scoot M.T., y Snary D.,1982, y Teixeira A.R.,1987, las cuales permiten mayor claridad conceptual de numerosos mecanismos involucrados.

Son muchos los factores que parecen ser importantes en la regulación de la infección con *T. cruzi*, tales como la activación de macrófagos, anticuerpos y complemento, citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos, y citotoxicidad de células T, entre otros. Estos mecanismos dependen de la composición genética del hospedador.

Se postula que ni los receptores C3b ni Fc en macrófagos, están involucrados en la fagocitosis de *T. cruzi*, pero aparentemente las moléculas pronasa sensitivas del macrófago, junto con glicoproteínas de superficie del parásito son las implicadas.

Cuando el macrófago se activa, probablemente por la acción del interferón gama, el cual a su vez se ha incrementado por la infección, el fagosoma se une con los lisosomas y el parásito es destruido por acción lítica y metabolitos de oxígeno.

Hay evidencias en ratón, que el interferon alfa y beta inducen la producción de células NK, las cuales juegan papel importante, pero poco conocido.

El parásito por su parte, ha desarrollado mecanismos muy importantes para la evasión de la respuesta inmune del hospedador.

Los tripomastigotes sanguíneos deben evadir la acción de los anticuerpos y la lisis del complemento, como también la citotoxicidad.

Se sugiere que hay varios mecanismos mediante los cuales esto es posible:

- a. inmunosupresión no específica inducida por sustancias derivadas del parásito.
- b. naturaleza protectora de la superficie del parásito, moléculas de acción antifagocíticas, y anti actividad de C3.
- c. la habilidad enzimática del parásito para romper las inmunoglobulinas liberando únicamente el segmento Fab para unir al antígeno separándolo del Fc que activa el complemento evitando así, la lisis del parásito.
- d. cubrimiento y desalojo de los complejos antígeno-anticuerpo que se forman en la superficie celular.
- e. compartiendo antígeno parásito-hospedador. (Clark I A. y Howell M.J.,1990).

Una de las mayores actividades en inmunoparasitología, es la identificación de antígenos de parásitos que tengan diferentes efectos inmunológicos bajo circunstancias de infección, para ser utilizados posteriormente como antígenos de protección (Gea S. et al, 1992)

Ratones inmunizados con antígenos ácidos y parcialmente purificados del citosol de *T. cruzi*, inducen parcialmente respuesta inmune protectora. La respuesta humoral en contra del parásito, depende de la presencia de epítopes antigénicos los cuales unen isotipos de anticuerpos capaces de mediar la muerte del parásito.

Se sugiere que la patología en la fase crónica de la enfermedad de Chagas es de naturaleza autoinmune.

Existen dos mecanismos propuestos los cuales podrían producir autoinmunidad:

1. La infección parasitaria produciría una alteración de la inmunoregulación, lo cual conduciría a una pérdida de tolerancia hacia antígenos propios.

2. Reconocimiento inmune de algunos antígenos de *Trypanosoma cruzi*, los cuales darían reacción cruzada con ciertos antígenos del mamífero hospedador, lo que produciría autoinmunidad por mimetismo molecular (Avila J.L.,1992).

Infecciones con *T. cruzi* inducen la división de macrófagos peritoneales en ratones Balb/c. Se ha demostrado por análisis citogenético que fragmentos de ADN de minicirculos del kinetoplasto del parásito, se insertan dentro del ADN de la célula de macrófagos y de fibroblastos (Teixeira AR. et al, 1994).

Se han encontrado antígenos del parásito en órganos y tejidos de ratones durante la infección con *T. cruzi*. Los amastigotes pueden ser observados en los tejidos durante la fase aguda y en fase crónica con progresiva disminución conforme pasa el tiempo.

Sin embargo los antígenos del parásito son detectados en infiltrados inflamatorios durante la fase crónica de la infección, quizás como una consecuencia de la lisis de células infectadas (Younes A. et al, 1988).

Probablemente el ADN del parásito insertado en el ADN de la célula actúa como un antígeno que sostiene la reacción autoinmune que acontece en la patología del Chagas crónico.

Desde hace varios años se viene investigando acerca de la infección parasitaria con *T. cruzi*. La resistencia en contra de la infección involucra mecanismos de respuesta inmune y/o no inmune.

Fué revelado en su momento, que los genes de la respuesta inmune en ratón estan unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), sistema genético involucrado en la inducción y regulación de la respuesta humoral y celular en contra de antígenos presentes en el organismo patógeno (Pizzi T. y Prager R.,1952; Trishman T.M. y Bloom B.R.,1982).

En la actualidad se sabe que son muchos más los factores involucrados modulando la acción del parásito y la respuesta del hospedador.

Algunos estudios revelan que la ausencia de receptores determinados genéticamente y requeridos por el parásito para entrar a la célula y la ausencia de factores de diferenciación del hospedero requeridos por el parásito para su multiplicación, son otros factores que evitarían el establecimiento del parásito dentro del hospedador (Scott M.T. y Snary D.,1985).

1. 9. PROTECCION Y PERSPECTIVAS

Se han llevado a cabo innumerables estudios en diversos campos de la investigación, con miras al mayor conocimiento de la interacción hospedador y parásito en la patología de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas.

Todas las investigaciones son con miras de búsqueda a una posible solución de control en esta patología.

Debido a la estructura clonal de las poblaciones de *T. cruzi* y su diversidad genética, se hace absolutamente necesario un conocimiento muy amplio de factores biológicos y médicos para el control y protección contra esta parasitosis.

De gran importancia en los estudios con *T. cruzi* son los conceptos de diversidad genética distinguiéndolo de variación genética.

La diversidad antigénica implica diferencias en la expresión de los antígenos a diferencia de la variación antigénica donde lo que acontece es una expresión de versiones alternantes de un mismo antígeno, que es lo que ocurre en tripanosomas africanos.

Teniendo claridad en esto, se hace particularmente relevante el entendimiento de las bases moleculares estrechamente relacionadas con los cambios en las propiedades patofisiológicas y el análisis epidemiológico de la infección, lo cual conduce al hallazgo de una posible vacuna (Myler P.J.,1993).

Retos antigénicos administrados con intervalos estrechos de tiempo, pueden abolir la inmunosupresión presente en ratones infectados experimentalmente con *T. cruzi* de manera específica.

Durante la infección se encuentran subgrupos de macrófagos supresores y subgrupos de macrófagos ayudadores y beneficiosos (Cerrone M.C. y Kuhn R.,1991).

Estos retos se hacen con la posibilidad de crear una competición entre la producción de estas dos poblaciones celulares y del número relativo de los dos tipos se dará una modulación que en última instancia permita resolver la infección por parte del hospedador.

Los resultados de las investigaciones de González J. et al,1991, revelan que los sueros de ratones inmunizados con antígeno 90 Kda, muestran actividad tripanolítica complemento dependiente y también imposibilidad de que formas metacíclicas de la cepa Tulahuen invadan células VERO in vitro.

Trabajos en el campo de la biología molecular han reportado identificación y caracterización de diferentes moléculas con capacidad protectora en animales de experimentación.

Se ha elaborado un péptido sintético de 19 aminoácidos (SP4), que muestra actividad de protección cuando se administra a ratones. Este péptido induce las respuestas humoral y celular, lo que indica que efectivamente asemeja la conformación del antígeno del parásito *T. cruzi* pudiendo desencadenar protección inmune en ratones en contra de la infección (Bua J. et al.,1991).

Es necesario continuar en las pruebas, utilizando otros modelos experimentales con miras a determinar si los antígenos sintéticos y éste en particular asemejan antígenos de todos los clones naturales conocidos.

Otros estudios revelan que péptidos con secuencia Arg-Gly-Asp-Ser son reconocidos por los tripomastigotes de *T. cruzi*, siendo una posibilidad para ser explorada con miras a estudios inmunoproliféricos (Ouaisi M.A. et al., 1986; Peyrol S. et al, 1987).

Posteriores estudios de inmunización de ratones, muestran que pequeñas concentraciones de antígenos del parásito purificados, e incorporados en un sistema propio de antígeno de rescate, confiere protección de 100% a los ratones, evitando su muerte cuando fueron inoculados con dosis letales de tripomastigotes (Araujo F.C. y Morein B.,1991).

Resultados de estudios, con ratones inmunizados con la glicoproteína de 56 kilodalton de *T. cruzi*, muestran evidencias significativas de protección como un antígeno candidato de primera línea, para una vacuna multisubunitaria en contra del parásito (Harth G. et al., 1994).

Existen numerosas discusiones a cerca de cómo abordar el problema, se mencionan dos alternativas aprovechables para una posible vacuna:

Una, sería la vacuna antiparásito, principalmente para controlar la parasitemia en fase aguda y otra, sería la vacuna antienfermedad con el fin de controlar el desarrollo de la patología crónica.

La expectativa es que controlando la parasitemia se podría ayudar a disminuir la incidencia y/o la severidad de la patología crónica en la enfermedad de Chagas (Moncayo A.,1994).

En la actualidad la infección humana con *T. cruzi* se combate con medicamentos, tales como el Nifurtimox (Lampit), y el Benznidazol, los cuales son de primera elección en el Chagas agudo.

El modo de acción consiste en la reducción metabólica de grupos nitro. lo que permite la producción de radicales nitroaniónicos y una directa interferencia en la síntesis de macromoléculas y componentes celulares como el ADN, lípidos y proteínas.

La Actinomicina D, la Anfotericina B, y las Aminoquinolonas, el Allopurinol y compuestos Imidazólicos y Ketoconazol son otros medicamentos también utilizados (Castro de S.,1993).

Sin embargo todas estas sustancias implican para el paciente, un problema de toxicidad y de importantes reacciones secundarias. Ningún medicamento ha sido señalado como totalmente efectivo frente a la enfermedad de Chagas.

Regularmente se llevan a cabo pruebas en el laboratorio, buscando medicamentos y dosis adecuadas, para encontrar la mejor elección en el tratamiento.

Las formas metacíclicas de *T. cruzi*, cepa Y, tratadas con Actinomicina D/50 µg /ml a una población de 10^7 parásitos/ml, muestran que continúan viables pero pierden propiedades para entrar a las células VERO y no se replican dentro de los macrófagos normales, ni inducen lesiones histológicas (Da-Cruz M.Q, et al, 1991).

La enfermedad de Chagas es un problema de salud pública en muchos países de América, constituyéndose en una de las patologías de declaración obligatoria recomendado por la Organización Mundial de la Salud.

Muchos esfuerzos se llevan a cabo en la actualidad para su control, se hacen numerosas campañas a nivel de las comunidades afectadas, dando educación acerca de como erradicar los vectores del domicilio en las zonas endémicas.

También a nivel de bancos de sangre se lleva un riguroso control de análisis para evitar la transmisión transfusional.

Diferentes grupos de trabajo tanto en países endémicos como en los que no lo son, continúan en las investigaciones para abonar al conocimiento de esta parasitosis.

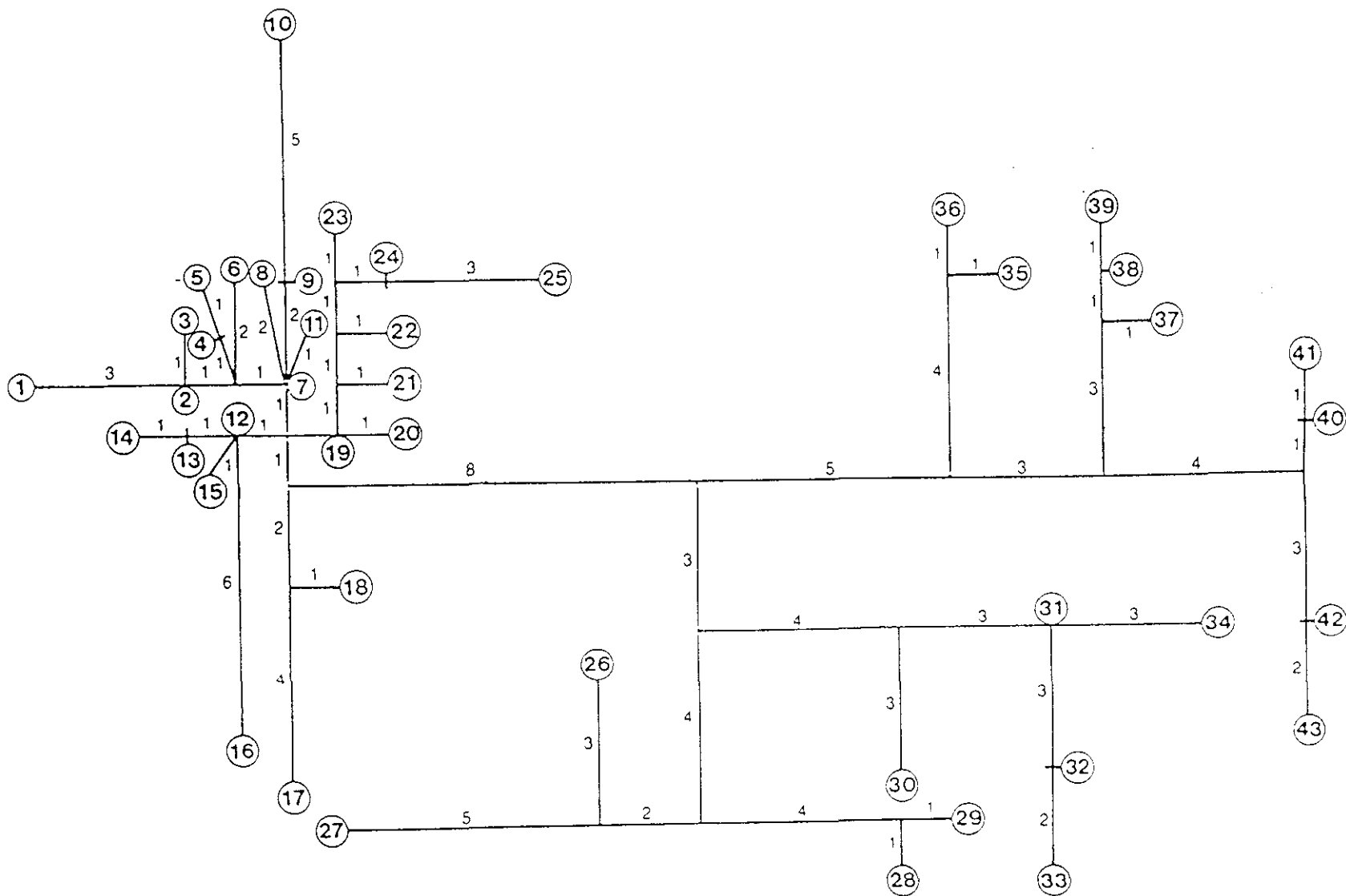


Diagrama representativo de los 43 clones Mayores de *Trypanosoma cruzi* caracterizados por isoenzimas. Clones del presente estudio pertenecen a los clones mayores 19, 20 39. Números a lo largo de las líneas indican distancias evolutivas. (Programa de computador MIX- Algorismo-Wagner). Tibayrenc M. et al, 1986.

OBJETIVOS

2.1 GENERALES

El presente trabajo propone el estudio del comportamiento de doce clones de *Trypanosoma cruzi* en condiciones *in vitro*, mediante el seguimiento de los parásitos en cultivos axénico e infección celular y un seguimiento *in vivo* mediante la infección experimental en modelo murino.

Se pretende hacer un estudio representativo tomando en consideración muestras de clones con perfiles isoenzimáticos o zimodemas similares y diferentes, aislados de varios tipos de hospedadores y vectores, para dilucidar como incide la estructura clonal de las poblaciones de *T. cruzi* y correlacionar propiedades médico-biológicas, con el fin de contribuir a clarificar un poco más la patogenicidad de la enfermedad de Chagas.

Los clones del parásito *T. cruzi*, pertenecen a su vez a tres grupos de clasificación llamados clones Mayores o genotipos dominantes 19, 20 y 39, los cuales se eligieron para el estudio, porque son los que se encuentran más frecuentemente como clones naturales, en la extensa zona geográfica de Sur América.

Los clones que pertenecen al mismo clon Mayor, tienen perfiles isoenzimáticos iguales. A su vez los clones Mayores entre sí, tienen características isoenzimáticas diferentes.

Se pretende con este trabajo, conocer similitudes y diferencias entre los clones y mirar posibles correlaciones entre sus características. Debido a la variabilidad genética del parásito y su heterogeneidad, es necesario estudiar de manera individual los clones en sus propiedades biológicas y médicas.

Analizar los resultados obtenidos, distinguiendo sus características como clones particulares y relacionarlos entre sí de acuerdo a su comportamiento.

Dilucidar si las similitudes isoenzimáticas o sus diferencias definen su comportamiento.

Exclarecer si existe alguna relación de sus comportamientos como clones, con respecto al área geográfica, vector y hospedador de los cuales fueron aislados.

2.2 PARTICULARES

Con el fin de obtener conocimientos del comportamiento de los clones, se propone un estudio detallado, mediante metodologías específicas.

Los parámetros a desarrollar son:

2.2.1 Estudio del comportamiento de cada uno de los clones en tres medios de cultivo específicos (LIT-GRACE-TAUP).

Analizando su multiplicación y transformación (Metaciclologénesis).

2.2.2 Análisis de la evolución de la infección *in vitro*, de cada uno de los doce clones, en dos líneas celulares (VERO, Macrófagos).

2.2.3 Estudio de los metabolitos del parásito en cultivo axénico, considerándose la fase de crecimiento, por medio de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN H^1).

2.2.4 Evaluación de la infección *in vivo*, mediante un modelo experimental murino, en el cual se establece la infección y enfermedad, de manera semejante a lo que acontece en el hospedador humano.

2.2.4.1 Seguimiento de la parasitemia en los ratones infectados, en la fase aguda de la infección.

2.2.4.2 Observación macroscópica de los órganos considerados relevantes en el estudio de la enfermedad.

2.2.4.3 Estudio histopatológico de los tejidos de cada ratón, en diferentes momentos de la infección-enfermedad.

La mayor información que se pueda obtener acerca del comportamiento de estos clones de *T. cruzi*, puede contribuir al entendimiento de su relación con el hospedador en la infección y enfermedad humana.

MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1. EL PARASITO *Trypanosoma cruzi*

En este estudio se utilizan 12 clones naturales del parásito *T. cruzi* los cuales han sido caracterizados previamente por estudio de isoenzimas (Tibayrenc M., 1988).

Los 12 clones pertenecen a su vez a 3 grupos de zimodemas o variantes isoenzimáticas denominadas clones mayores 19, 20 y 39 aislados de diferentes áreas geográficas (Tibayrenc M., y Breniere S. F., 1988 ; Veas F., et al., 1990; Tibayrenc M., y Ayala F. J. 1991).

A continuación se relaciona cada clon, indicando el respectivo clon Mayor al que pertenece, localización geográfica de su aislamiento y hospedador del que fué aislado inicialmente:

Clones de estudio <i>T. cruzi</i>	Clon Mayor (Zymodema)	Aislamiento	
		País	Hospedador
OPS21	19	Venezuela	Humano
SP104	19	Chile	<i>T. spinolai</i>
13379	19	Bolivia	Humano
CUTIA	19	Brasil	<i>D. agudi</i>
P11	20	Bolivia	Humano
ESQUILO	20	Brasil	<i>S. aestuans</i>
CUICA	20	Brasil	<i>O. cuica ph.</i>
SO3	39	Bolivia	<i>T. infestans</i>
NR	39	Chile	Humano
BUG2148	39	Brasil	<i>T. infestans</i>
BUG2149	39	Brasil	<i>T. infestans</i>
MN	39	Chile	Humano

3.1.2. MODELO EXPERIMENTAL MURINO

Se han utilizado ratones machos de la cepa Swiss ICO NMRI (IOPS), de 30 días de edad y mantenidos en condiciones estables de temperatura (21°C) y humedad (55±10%), renovación de aire y fotoperíodo de 12 horas. Animalario de servicio, de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

3.1.3 CELULAS VERO Y MACROFAGOS

Línea VERO: Establecida en 1962 a partir de células de riñon de mono verde africano (*Cercophitecos aetiops*). Las células VERO utilizadas en este estudio fueron cedidas al laboratorio de Parasitología y Medicina Tropical de la Facultad de Medicina de la UAM, por el Dr. E. Tabares de La Unidad de Virología, de la misma Facultad, en el año 1994.

Línea J774: Aisladas de sarcoma de células reticulares de ratón Balb/c, en 1968, con propiedades morfológicas, de adherencia y fagocitosis como los macrófagos (Ralph P., et al.1975). Los macrófagos J774 fueron traídos del laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud, Bogotá-Colombia y cedidos al laboratorio de Parasitología y Medicina Tropical-Madrid en 1994.

3.1.4. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

3.1.4.1. Para cultivo axénico de los clones *T. cruzi*

LIT (Liver Infusion Tryptose)

NaCl	4.0 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄	8.0 g
Glucosa	2.0 g
SFBI +	100 ml
Hemina*	25 mg
Infusión de hígado	5 g
Triptosa	5 g
Penicilina	14 mg
Estreptomicina	25 mg
Agua destilada completar a	1000 ml

Ajustar pH 7.3

+ Suero Fetal Bovino Inactivado

* 25 mg de Hemina se disuelven en 1 ml de NaOH(1N)

El medio de cultivo LIT para Tripanosomas fué diseñado inicialmente por Camargo E. P.,1964 y modificado posteriormente por varios autores.

GRACE (Grace's Insect Medium)

Grace's Insect Medium * en	900 ml de H ₂ O destilada
SFBI	100 ml
Solución de antibiótico y antimicótico	2 ml
Ajustar pH 5.8	

* Suplementado con L-Glutamina y con 0.7 g/L de Glucosa (SIGMA)

Este medio GRACE es el modificado por Osuna A., et al.,1979.

TAU (Triatomine Artificial Urine)

NaCl	5.51 g
KCl	0.63 g
CaCl	0.11 g
MgCl ₂	0.20 g

TAUP

En tampon fosfato pH 6.0

NaH ₂ PO ₄	0.96 g
Na ₂ HPO ₄	1.13 g
Completar con H ₂ O destilada	500 ml

L-Prolina	0.57 g
L-Na Glutamato	4.22 g
L-Aspártico	0.13 g
D-Glucosa	0.90 g
SFBI	25 ml
Estreptomina	12.5 mg
Penicilina	7.0 mg

Los componentes del TAU son integrantes del TAUP.

Han sido reportados varios factores que actúan en el proceso de transformación, tales como el tamaño de la población de la siembra, los componentes del medio de cultivo y la reducción de la tensión de oxígeno entre otros. (Contreras V.T., et al 1985).

El medio TAU, es especialmente usado para cultivo de *T. cruzi* induciendo transformación, porque no ocurre replicación concomitante.

En el medio TAUP suplementado con L-Prolina, la cepa Perú de *Trypanosoma cruzi*, transforma epimastigotes a formas metacíclicas en 48 horas. (Homsy J. J., et. al., 1989).

3.1.4.2. Medio de cultivo para líneas celulares (VERO y Macrófagos)

DMEM (Dulbeco Modificado EAGLE'S MEDIUM)

DME *	9.9 g
SFBI	50 ml
Bicarbonato sódico	2.0 g
HEPES	6 ml
Penicilina	14 mg
Estreptomicina	25 mg
Gentamicina	125ul
H ₂ O destilada completar a	1 lt

Ajustar pH 7.2

* Suplementado con L- Glutamina y 1.0 g/L de Glucosa (SIGMA)

SOLUCIONES Y COLORANTES

Suero Fisiológico:

Cloruro Sódico	0.9 g
Agua estéril	100 ml

Solucion Salina Tamponada PBS:

NaCl	8.0 g
KHPO ₄	1.2 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
H ₂ O destilada	1000 ml

pH 7.3

GIEMSA

Solución de Azur- Eosina- Methylen Blue (MERCK)

Solución Stock	10 ml
Agua tamponada pH 7.2	90 ml

HEMATOXILINA - EOSINA

Los medios de cultivo fueron filtrados con membranas de 0.22 micras y guardados a 4°C.

Todos los materiales de laboratorio utilizados para cultivos, fueron esterilizados mediante calor húmedo 120°C/30 minutos, o mediante calor seco 180 °C.

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. CLONES DE *T. cruzi* EN MEDIOS DE CULTIVO LIT-GRACE-TAUP- MANTENIMIENTO

Los clones *T. cruzi* del presente estudio, provienen del laboratorio de Genética de Parásitos, ORSTOM, Montpellier-Francia.

Una vez se recibió la muestra de los viales con cada clon, se procedió a sembrar cada uno por separado, en cajas de cultivo con 10 ml de los tres diferentes medios.

Los parásitos inician su multiplicación con aumento exponencial de la población, considerándose ésta la fase de crecimiento, luego disminuye la tasa de división celular correspondiendo a la fase estacionaria.

Observando diariamente a través de microscopio invertido, se pudo dilucidar cuál medio era el más apropiado para la multiplicación de la población parasitaria.

Cuando la población oscila entre 10^6 y 10^7 comprobado por recuento con cámara de Neubauer, se procedió a hacer pases consecutivos correspondiendo a períodos de tiempo de 10 a 20 días, dependiendo del cultivo.

Todos los cultivos fueron mantenidas en incubación a temperatura de 28°C.

3.2.2. SEGUIMIENTO DE LA METACICLOGENESIS DE LOS CLONES *T. cruzi*

Existen algunos estudios realizados con el fin de saber cuáles son los factores determinantes e inductores de la transformación en cultivos de *T. cruzi* de tal manera que haciendo modificaciones del medio, como el aumento de la concentración de hemina en el LIT (Arévalo J., et.al 1985), o incubando las formas epimastigotas con componentes de orina artificial de triatomo, agregando 10mM de L-prolina o L-Glutamina, se pudo encontrar mayor número de formas metacíclicas.

La transformación es gradual y está precedida por la expresión de polipéptidos específicos. (Contreras V.T. et al 1985; Homsy J., et al. 1989).

El medio de cultivo más adecuado para utilizar, dependerá de lo que se pretende hacer, si se trata de aumentar la población con multiplicación de las formas epimastigotas generalmente se utiliza el medio LIT o GRACE, y si lo que se pretende es inducir la transformación, es necesario conocer el comportamiento de la cepa o clon del parásito en diferentes medios por períodos de tiempo consecutivo.

Para el estudio de la transformación de epimastigotes a formas metacíclicas en los clones, se ha elegido utilizar tres medios disponibles LIT, GRACE y TAUP.

Se cosechan los parásitos a partir de un cultivo en fase exponencial con mayoría de formas epimastigotas y se lavan con solución fosfato tamponada (PBS).

Posteriormente se hace una siembra de 10^4 como población inicial de cada uno de los clones del parásito, en un volumen de 10 ml de cada medio de cultivo, en tres cajas separadas. (Metodología adaptada de Krassner S. M., et al 1990).

La concentración de los parásitos fué determinada con un hemocitómetro.

Durante 35 días, a intervalos de cinco días, se compara el comportamiento de cada uno de los clones en cada medio de cultivo. De esta manera se puede dilucidar cuál es el medio más apropiado para cada uno de los clones individualmente, y cuál es el momento cuando ocurre el mayor porcentaje de transformación.

El seguimiento se lleva a cabo en esterilidad, tomando una gota de cada medio de cultivo de los clones, la cual se coloca sobre un portaobjetos, de tal manera que las tres gotas de los cultivos de un clon, vayan en el mismo portaobjetos, el cual ha sido previamente marcado con nombre del clon, día de seguimiento y medio de cultivo correspondiente a cada muestra.

Las gotas se dejan secar al aire, deben ser pequeñas y medianamente expandidas. Luego se fijan con metanol, y una vez secas, se colorean con Giemsa durante 30 minutos y se lavan.

Finalmente las láminas se observan al microscopio con objetivo 100X y con éste, se hace recuento de 300 parásitos totales en cada gota y número de formas metacíclicas observadas, con el fin de hallar el porcentaje de transformación en cada intervalo de tiempo elegido.

3.2.3. ESTUDIO METABOLICO MEDIANTE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE PROTONES (RMN H¹)

Preparación de las muestras: Se utilizaron cultivos de 8 días de evolución en medio GRACE, de modo que la población parasitaria fuera de 10⁷ parásitos/ml y cuando la diferenciación aún permitía una cierta homogeneidad entre los clones, siendo en su gran mayoría formas epimastigotas.

Se tomaron 10 ml de medio de cada muestra, siendo centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C, tomándose el sobrenadante y almacenándose a -20°C hasta su posterior utilización en los estudios de espectroscopía de RMN H¹.

Establecimiento de la técnica de espectroscopía de RMN H¹

Los espectros se obtienen a 300 MHz en un aparato Bruker AM-300, operando con la técnica de pulsos y la transformada de Fourier.

La temperatura de la sonda se mantiene a 27°C siendo los parámetros de adquisición: pulsos de 90° de radio y anchura espectral de 3287.5 Hz, tiempo de reciclaje total de 8 segundos y 160 acumulaciones.

Los desplazamientos químicos se expresan como partes por millón (ppm) bajo un campo de tetrametil-xilano.

Los desplazamientos químicos utilizados para identificar los respectivos metabolitos están en concordancia con los descritos en la literatura (Gilroy F. V.,1988; Sánchez-M M., et al.,1992 y Thompson S. N.,1991).

Se llevaron a cabo una serie de controles con metabolitos puros adicionándose éstos al medio de cultivo y anotándose sus espectros.

3.2.4. CLONES DE *Trypanosoma cruzi* PARA INOCULACION A RATON E INFECCION CELULAR

Para obtener una población del parásito adecuada tanto para el inóculo a ratón como para la infección celular, se cosechan los *T. cruzi* a partir del cultivo y del día con más porcentaje de transformación metacíclica.

Para estos fines, se tiene cada clon en un cultivo en medio óptimo, previamente conocido por el estudio de metaciclogénesis.

Los parásitos se centrifugan con el fin de eliminar detritus antes de ser utilizados.

Es necesario hacer recuento poblacional y de formas metacíclicas para conocer como es la población del inóculo inicial para ratones de estabilización y para la infección celular.

3.2.5. MANTENIMIENTO DE LINEAS CELULARES VERO Y MACROFAGOS (J774)

Las células VERO y macrófagos se mantienen en medio de cultivo DMEM modificado pH 7.2, suplementado con 10% de SFBI (Dulbecco and Freeman 1959), a temperatura de 37 °C en cajas de cultivo celular de 25 cm², con un volúmen de medio de 5 ml en cada una.

Diariamente se observan a través del microscopio invertido, para evaluar el comportamiento de multiplicación celular, haciendo cambio del medio cada 48 horas.

Semanalmente, cuando la monocapa está saturada, se realizan los pases.

Para hacer la réplica o pase, se elimina el medio y se agrega 5 ml de medio nuevo, luego se raspa suavemente la monocapa con una varilla fina de vidrio doblada, manteniendo la misma dirección de movimiento y cuidando de no hacer daño a las células, las cuales deben permanecer embebidas con el líquido del medio.

No se utiliza tripsina para despegar la monocapa porque se ha encontrado que ésta puede afectar la superficie del parásito, cuando son utilizadas para las infecciones (Ulisses T.,1983).

Una vez se sueltan las células VERO y macrófagos, suspendidas en el medio, se toman los 5ml con una pipeta y se distribuyen en dos cajas de cultivo las cuales deben tener 2.5ml de medio Dulbecco nuevo.

Se llevan a incubación y se dejan quietas esperando que las células se peguen nuevamente. Este procedimiento se hace de manera indefinida mientras se necesita población celular.

3.2.6. INFECCION DE VERO Y MACROFAGOS CON LOS CLONES DE *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi es virtualmente capaz de infectar cualquier tipo de cultivo celular y luego escaparse de la vacuola al citoplasma (Hall B.F.,1993).

La infección *in vitro* con cada uno de los clones del estudio, se ha llevado a cabo en líneas celulares establecidas VERO y macrófagos.

Se toman cajas de cultivo corning de 25 cm², herméticamente cerradas y a las que previamente se les ha colocado ocho laminillas redondas de 12 mm, sobre las cuales se adhieren las células en el momento de la réplica.

A las células del pase para realizar la infección, se les hace recuento de siembra, evitando que su número sature el área de adhesión, procurando que queden aproximadamente diez mil células por laminilla.

Pasadas 24 horas, se procede a agregar cerca de cien mil parásitos, provenientes de un cultivo con porcentaje de formas metacíclicas conocido, el cual varía, dependiendo del clon y su respectiva metaciclogénesis.

Para una buena infección se pretende que haya de 5 a 10 parásitos por célula, recordando que el cultivo está mezclado con formas epimastigotas y tripomastigotas metacíclicas y que sólo éstas se establecen y sobreviven dentro de la célula.

Cumplidas las 24 horas postinfección, se procede a cambiar el medio, lo que permite eliminar las formas no interiorizadas del parásito. Se espera la evolución de la infección, observando diariamente al microscopio invertido y haciendo cambio de medio cada dos días.

Pasados los primeros cinco días postinfección, se retiran cuatro laminillas, con la ayuda de una pinza muy fina, se lava cada una con suero fisiológico, y se dejan secar al aire sobre toalla de papel, se fijan con metanol y una vez secas, se colorean con Giemsa.

Luego que las laminillas se han secado completamente, se colocan sobre láminas con entellan, como preparación permanente.

Las láminas o cubreobjetos deben estar previamente marcados con el nombre del clon, línea celular y día post infección.

Se continúa la observación de los cultivos infectados y al día diez se procede a retirar las otras laminillas, repitiendo el esquema anterior.

Fueron elegidos los días cinco y diez para el análisis del índice de infección, porque son los más significativos, en el caso concreto de estos clones, ya que revelan claramente el mejor momento para la visualización y hallazgo lo que permite el recuento de las formas amastigotas y tripomastigotas intracelulares respectivamente.

El posterior análisis cuantitativo de la infección en los días elegidos, en cada línea celular y de cada clon de *T. cruzi*, se lleva a cabo mediante el recuento en la laminilla de 200 células tomadas al azar. Se anota el número de células infectadas, y cuales son las formas del parásito que están presentes y el número de ellas dentro de cada célula.

Luego se calcula el índice de infección para cada uno de los clones. (Metodología adaptada de Contreras V.T et al. 1988).

3.2.7. ESTABILIZACION DE LOS CLONES EN RATON

Para la adaptación inicial de los parásitos en el hospedador vertebrado, se toma población de cultivo axénico de los parásitos que se encuentran en cualquiera de los tres medios de cultivo utilizados para *T. cruzi* (LIT, GRACE o TAUP), dependiendo del clon y del mayor porcentaje de metacíclicas, se procede a elaborar el inóculo correspondiente.

Se toman 15 ml del cultivo, se centrifuga a 3000 rpm y de inmediato se descarta el sobrenadante, luego los parásitos se mezclan con solución salina tamponada al volumen que permita la concentración del parásito elegida.

Se procede a inocular intraperitoneal, 4 ratones machos de 30 días de edad.

La dosis de inóculo elegida para estabilización en ratón a partir de cultivo axénico fué de 10^6 parásitos /ml. El inóculo es una mezcla de formas epimastigotas y metacíclicas, siendo las metacíclicas las que infectan al raton ya que las epimastigotas son lisadas por el complemento (Sánchez G., et al.,1990).

A los 7 días se hace la primera toma de una gota de sangre, mediante una pequeña incisión del extremo de la cola, se coloca sobre un portobjetos extendiendo ligeramente de manera circular, se deja secar y se colorea con Giemsa.

Simultáneamente se hace observación de otra gota en fresco colocandola entre lámina y laminilla, con objetivo de 40X y recorriendo toda la preparación.

Si la parasitemia en los ratones es negativa en ambas observaciones fresco y gota gruesa, se procede a inocularlos con Ciclofosfamida de manera intraperitoneal, 0.2 ml que corresponde a 1 mg. de compuesto activo y se dejan en espera continuando su observación.

Algunos estudios indican que la infección con *T. cruzi* está acompañada de inmunosupresión, mediada en parte por macrófagos supresores (Turk J.L., et al, 1972; Brener Z.,1994).

Con el suministro de la Ciclofosfamida se pretende intervenir temporalmente en la red de respuesta inmune, de tal manera que se facilite la infección, ya que la ciclofosfamida y otros agentes químicos interfieren con la red de respuesta inmune y regularmente incrementan la parasitemia.

Para el seguimiento de la adaptación y estabilización del parásito en los ratones se toma muestra de sangre cada cinco días, con el mismo esquema descrito anteriormente.

Una vez se encuentra parasitemia en los ratones, se controlan cada dos días haciendo recuento y cuando se observan más de 20 parásitos/100 campos microscópicos, se procede a hacer pases a otros 4 ratones con el fin de aumentar la población y estabilizarla, buscando la adaptación del parásito en su hospedador mamífero. Se suspenden los inóculos de ciclofosfamida.

Se hacen cerca de 6 a 8 pases para la adaptación y estabilización en ratón, de cada uno de los clones del presente trabajo, antes del inicio del estudio de infección experimental en los dos lotes de ratones que se utilizan para el seguimiento de la evolución de la parasitemia y el estudio de la histopatología respectivamente.

3.2.8. INFECCION EXPERIMENTAL EN MODELO MURINO

El desarrollo de un modelo murino que simula las manifestaciones de la enfermedad humana, facilita el estudio de los mecanismos de la patología de la infección chagásica, haciendo posible el análisis de diferentes aspectos como la respuesta inmune y los daños tisulares. (Moncayo A. 1994).

En este estudio se lleva a cabo un seguimiento en fase aguda de la infección-enfermedad, teniendo en cuenta la elaboración de curvas de parasitemia, análisis de los órganos elegidos y estudio histopatológico.

3.2.8.1. ESTUDIO DE LA EVOLUCION DE LA PARASITEMIA

Una vez que se han estabilizado los parásitos en ratón, por medio de pases consecutivos, considerándose la estabilización de *T. cruzi* como una adaptación a la presión selectiva inmune por parte del hospedador murino, se procede a inocular los ratones con sangre que contiene tripomastigotes.

Para llevar a cabo el estudio de la parasitemia, para cada uno de los clones, se toman lotes de 12 ratones machos, de 30 días de edad correspondiendo a un peso aproximado de 24 g.

Se inoculan con una dosis elegida de 10^5 tripomastigotes sanguíneos/por ratón.

El volúmen del inóculo fué de 0.3 ml por vía intraperitoneal.

El seguimiento se inicia a partir de la primera semana y durante las siguientes semanas del período de tiempo de la fase aguda, considerada de cincuenta días.

Las parasitemias se analizan mediante toma de sangre de la cola en cada raton como se describió anteriormente, muestras de gota gruesa leídas en 100 campos x 1000.

Se calcula la media y desviación estandar.

Cada uno de los ratones de cada clon fué marcado y su seguimiento fué individualizado a lo largo del estudio.

Se hizo promedio de los resultados de las parasitemias de los doce ratones de cada clon, con sus respectivas desviaciones estandar en cada intervalo semanal.

3.2.8.2. ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO

Se inoculan lotes de 24 ratones para cada uno de los clones, con 10^5 tripomastigotes sanguíneos/raton, provenientes de ratones donde el parásito se ha estabilizado.

El seguimiento se llevó a cabo a partir del día 7 post inoculación y durante los siguientes días de la fase aguda, se eligieron ocho intervalos de estudio, en períodos de siete días entre ellos.

Seguimiento Macroscópico y estudio histopatológico:

Se toman lotes de tres ratones en períodos de tiempo consecutivos cada 7 días, a partir del día 7 al 53 tiempo que cubre la fase aguda de la enfermedad en ratón.

A estos ratones se les mide la parasitemia por gota gruesa y se procede a sacrificarlos en cámara cerrada con eter, previamente pesados en una balanza.

A cada uno se le extrae los órganos elegidos, corazón, hígado, bazo, intestino (colon descendente), músculo esquelético, vejiga urinaria, riñon, pulmón, médula y cerebro (Andrade S. G.,1974).

Luego se pesan los corazones, se miden los bazos y se observa cuidadosamente cada órgano con el fin de detectar alguna anomalía macroscópica. (Morales M. C., et al, 1987).

Se tiene una jaula con ratones de control no infectados, durante los 53 días para tener las mismas condiciones de los ratones de experimento con su respectiva edad y comparar los órganos en cada intervalo de sacrificio.

Los órganos se llevan a frascos marcados que contienen formol salino tamponado al 10%, cubriéndolos totalmente.

Se anotan los datos de pesos y medidas y se calcula el índice cardíaco de cada ratón mediante la fórmula siguiente:

$IC = PC / PR \times 100$ (IC: Índice cardíaco. PC: Peso del corazón. PR: Peso del ratón). Considerandose un IC normal menor e igual a uno.

Se comparan los pesos y medidas en cada intervalo, con los correspondientes al raton normal de la misma edad.

Transcurrida una semana de los órganos embebidos en formol salino tamponado al 10%, se llevan a tallar colocándolos en la misma disposición dentro de las rejillas.

Se incluyen en parafina separadamente y en doble bloque, haciendo los cortes con espesor de 6-8 micras, colocando en cada portaobjetos las muestras por duplicado.

Se colorean con la técnica hematoxilina-eosina (H/E) y se procede a su observación microscópica con objetivo de 4x recorriendo toda la preparación, analizando cuidadosamente los tejidos en busca de posibles pseudoquistes y reconociendo la inflamación.

Se observan un total de 60 cortes por intervalo, lo que equivale a 480 cortes por cada clon, en los once clones estudiados por histopatología.

Luego se analiza el estado del tejido distinguiendo el compromiso inflamatorio por cruces, correspondiendo: (+) a 25% o menos de la superficie tisular afectada, (++) 25%- 50% y (+++) al 50% o más de superficie tisular afectada

Se cuantifica igualmente el hallazgo de pseudoquistes del parásito en el tejido observado, de la misma manera que para la inflamación, poniendo el resultado entre paréntesis a la derecha de la valoración por cruces.

RESULTADOS

4.1. CULTIVO AXENICO DE *Trypanosoma cruzi*

El mantenimiento de los doce clones de estudio en condiciones de cultivo en laboratorio, muestra que el parásito se comporta de manera diferente dependiendo del medio.

De los tres medios de cultivo utilizados (LIT-GRACE-TAUP), los medios LIT y GRACE permitieron una mayor replicación de los epimastigotes, con un crecimiento poblacional entre 10^6 - 10^7 parásitos/ml.

Se observa que en el medio LIT las formas del parásito son más diversas, se encuentran epimastigotas cortas, epimastigotas largas y formas redondeadas "como amastigotas". Además los parásitos tienden a mantenerse agregados a manera de rosetas. (Fig 33).

En el medio GRACE, los parásitos se mantienen sueltos y con morfología de epimastigote largo. Los clones 13379, CUICA, SO3, NR y MN son los que mejor crecen en GRACE, los demás se desarrollan mejor en LIT.

El crecimiento de los cultivos de los clones es exponencial, con inicio de fase estacionaria aproximadamente al día 15, en condiciones de temperatura de 28°C.

Algunos clones tardan un poco más en su multiplicación, como es el caso de los clones OPS21 y 13379 pertenecientes al clon Mayor 19 y el clon CUICA del clon Mayor 20.

Los clones que mejor se comportaron en cultivo y cuya población fué más abundante fueron, ESQUILO y P11 del clon Mayor 20 y BUG2148, BUG2149, y MN del clon Mayor 39.

El medio de cultivo TAUP no es adecuado para el crecimiento poblacional de estos clones y las máximas tasas obtenidas no sobrepasaron los 10^5 parásitos/ml.

4.2. METACICLOGENESIS DE *T. cruzi* EN CULTIVO

Los resultados comparativos obtenidos de la transformación o diferenciación metacíclica, utilizando los tres medios de cultivo se muestran en las Figuras 1 a 12.

Se observó que los clones pertenecientes al clon Mayor 19, fueron los que presentaron menor porcentaje de metaciclogénesis en comparación a los clones Mayores 20 y 39.

A su vez, el clon OPS21 y el clon13379 transformaron mejor en medio TAUP, con un porcentaje de tripomastigotes metacíclicos de 29% y 28% respectivamente.

En cuanto al clon SP104 presentó un 37% de diferenciación en medio LIT al día 25, seguido por el 29% en TAUP pero al día 15, diez días antes del máximo logrado en LIT.

El clon CUTIA es el que presentó menor porcentaje de diferenciación metacíclica y con el que no fué posible llevar a cabo la infección celular ni la infección en ratón a pesar de múltiples intentos.

El máximo porcentaje de diferenciación ocurrió para el clon P11 con un 95% en medio TAUP al día 15, seguido por el clon MN con 91% en medio LIT al día 25.

Se observa que en los tres medios ocurre la diferenciación.

En el medio LIT, que se supone es para crecimiento fundamentalmente, ocurrió el mayor porcentaje de transformación para los clones pertenecientes al clon Mayor 39.

Es de anotar que estos clones de *T. cruzi* se multiplicaron de manera favorable en los medios LIT y GRACE y menos en TAUP.

Los clones del clon Mayor 20 y los clones MN, BUG2148 y BUG2149 del clon Mayor 39, son los que presentaron una tasa de crecimiento poblacional mayor, cerca de 10^7 parásitos/ml.

En las figuras 33, 34 y 35 se visualiza, mediante microfotografías, el parásito (Clon P11) en cultivo en los tres medios, tomadas al día 20 en el seguimiento de la metaciclogénesis.

4.3. ESTUDIO METABOLICO MEDIANTE RMN H¹

Tanto en la muestra de control como en las muestras del estudio, se analizaron resonancias correspondientes a metabolitos bien conocidos por sus desplazamientos químicos en el patrón de RMN de protones.

Los metabolitos más importantes, tenidos en cuenta fueron: glicerol(1), L-malato (2), succinato (3), piruvato (4), acetato (5), alanina (6), y etanol (7). Figs. 20 a 32 y Tabla XXXIV donde se consignan los valores máximos a partir de los espectros originales, para los siete metabolitos estudiados

Los cuatro clones pertenecientes al clon Mayor 19 presentaron diferencias no sólo cuantitativas entre los metabolitos excretados sino también diferencias cualitativas.

Todos ellos excretaron acetato y succinato como metabolitos mayoritarios y en menor cantidad alanina, sin embargo los clones OPS21 y 13379 producen además y como metabolito también mayoritario L-malato, que en el caso de OPS21 es el metabolito que se excreta en mayor cantidad.

También estos dos clones producen trazas de etanol y piruvato que no producen los otros dos clones del clon Mayor 19.

Los tres clones pertenecientes al clon Mayor 20 produjeron acetato, succinato y alanina como metabolitos mayoritarios.

Los cinco clones pertenecientes al clon Mayor 39 produjeron como metabolitos mayoritarios, acetato, succinato y alanina.

De modo minoritario producen trazas de etanol.

Se observaron diferencias cuantitativas y cualitativas en la producción de metabolitos entre los diferentes clones.

4.4. INFECCION CELULAR EN VERO Y MACROFAGOS

En las tablas I a XI se resumen los resultados de la infección celular en ambas líneas celulares.

Para este estudio cuantitativo de índice de infección, se hizo el recuento de las células infectadas de las doscientas células tomadas al azar, contabilizando el número de parásitos intracelulares y distinguiendo tanto amastigotes como tripomastigotes en cada célula.

Se reportó el promedio del número de parásitos amastigotes y tripomastigotes dentro de las células infectadas.

Además del recuento obtenido en los dos tiempos elegidos, se hizo observación diaria de las células a través del microscopio y se pudo visualizar claramente que, en los tiempos intermedios (días 6 a 9) los amastigotes sufrían las transformaciones a tripomastigotes, pasando por los estadios intermedios de epimastigotes.

Es de anotar que en general para todos los clones, las células VERO presentaron mayor porcentaje de infección que los macrófagos y a su vez mayor número de parásitos intracelulares.

Esporadicamente se observó formas amastigotas y epimastigotas liberadas al medio por ruptura celular, principalmente provenientes de macrófagos.

La infección se llevó a cabo con parásitos a partir de cultivo axénico, tomados en el momento de su máximo porcentaje de transformación, las formas no interiorizadas en las primeras 24 horas fueron eliminadas por lavados y cambios del medio.

El desarrollo de la infección con estos clones de *T. cruzi* y su ciclo intracelular completo, en las condiciones utilizadas, fué más lento a diferencia de lo que acontece con cepas.

El ciclo intracelular para los clones tuvo una duración entre 12 y 14 días, momento en el cual, los tripomastigotes se empezaron a liberar en el medio de cultivo.

El clon SO3 fué el que mayor porcentaje de células infectó, 84% en VERO al día 10, sin embargo el número de tripomastigotes no fué tan alto (promedio de 73 parásitos/células) como otros clones, donde el porcentaje de células VERO infectadas fué menor, tal es el caso del clon BUG2148 con 52%, pero el número de parásitos tripomastigotes fué significativamente mayor (promedio de 758 parásitos/células).

De igual manera el clon BUG2149, presentó menor índice de infección celular pero con alto promedio de parásitos intracelulares.

El clon SP104, presentó alto índice de infección en VERO y un poco menor en macrófagos, pero fué el que menos parásitos intracelulares presentó, tanto en VERO como en macrófagos.

Como observación interesante cabe anotar, que los tripomastigotes provenientes de las células infectadas presentaron una morfología particular y diferente a aquéllos sanguíneos.

Estos tripomastigotes son pequeños, delgados y se disponen a manera de "coma" con movimientos muy rápidos y característicos a todos los clones del estudio (Fig. 39).

En las figuras 40 a 47 se visualiza a través de microfotografías la infección en células VERO y macrófagos como ejemplo de lo acontecido para los clones del estudio.

4.5. ADAPTACION Y ESTABILIZACION DE CLONES DE *T. CRUZI* EN RATON

La estabilizacion de los clones se hizo mediante pases en lotes de cuatro ratones.

Los clones pertenecientes al clon Mayor 19 presentaron mayor dificultad para su estabilización.

Para los clones OPS21 y SP104 fué necesario hacer siete pases por ratón para lograr su adaptación y estabilización.

Se consideró una estabilización adecuada, cuando las parasitemias permitieron obtener la población de inóculo elegido de cien mil parásitos por ratón, para los experimentos de evolución de parasitemia y estudio histopatológico.

El clon 13379 requirió cuatro pases antes del estudio experimental. El clon CUTIA no fué posible estabilizarlo en ratón a pesar de múltiples intentos, ya que solamente se pudo lograr que dos ratones presentaran parasitemias, siendo éstas extremadamente bajas y con tendencia a negativizarse rápidamente.

En cuanto a los clones ESQUILO, CUICA, y P11 se estabilizaron sin mayor dificultad y sólo fué necesario hacer tres pases por ratón para obtener parasitemias adecuadas para la experimentación controlada.

El clon MN perteneciente al clon Mayor 39 presentó una estabilización muy rápida, ya que previamente en Chile, y de manera reciente, había sido mantenida en ratón antes de su envío a nuestro laboratorio donde estuvo escaso tiempo en cultivo axénico, fué necesario únicamente dos pases por ratón.

Para los clones SO3 y NR del clon Mayor 39 se necesitaron cuatro pases de estabilización.

En cuanto a los clones BUG2148 y BUG2149 presentaron mucha dificultad en su adaptación en ratón y su estabilización fué lenta. Se necesitó hacer seis pases para obtener parasitemias adecuadas de estos clones que permitieran el estudio en modelo experimental.

Se hicieron pruebas adicionales para los clones BUG2148 y BUG2149 tratando de dilucidar si su dificultad para infectar ratón con tripomastigotes metacíclicos de cultivo, era por atenuación de infectividad y por tanto se tomaron tripomastigotes provenientes de VERO y se inocularon 3 ratones para cada clon, observandose una adaptación más rápida.

La morfología de los tripomastigotes sanguíneos correspondientes a los clones Mayores 19 y 20 fué intermedia, con presencia de kinetoplasto terminal y el clon Mayor 39 presentó formas gruesas y grandes con kinetoplasto grande terminal y núcleo en posición media.

En los clones de estudio, ninguna forma de tripomastigotes sanguíneos correspondió a las denominadas delgadas.

4.6. EVOLUCION DE LA PARASITEMIA EN RATON

Los resultados de la evolución de las parasitemias se muestran en las Figuras 13 a 15, de manera comparativa entre los clones pertenecientes al mismo clon Mayor.

Los períodos de prepatencia fueron cortos, al día 7 post inoculación los ratones presentaban parásitos en sangre.

Las máximas parasitemias para los clones OPS21, 13379, y SP104, se encontraron al día 14 post-infección con un promedio de recuento de 89 parásitos/100 campos para OPS21 y máxima para 13379 con promedio de 952 parásitos/100 campos.

En cuanto a los clones ESQUILO, CUICA, y P11, mostraron máximas parasitemias al día 21 para los dos primeros y al día 35 para P11. Siendo el clon CUICA el que presentó un promedio máximo de parasitemia de 439 parásitos/100 campos.

Para los clones pertenecientes al clon Mayor 39, vemos máximas parasitemias en BUG2148, BUG2149 y MN y más bajas para los clones SO3 y NR.

Como resultado interesante se encontró, en cuatro ratones inoculados con el clon BUG2149, tripomastigotes en líquido ascítico. (Fig.38).

El estudio de la evolución de las parasitemias se llevó a cabo a lo largo del tiempo considerado de fase aguda de la infección, con recuentos cada dos días los cuales se promediaron semanalmente. Los doce ratones de cada clon para el seguimiento, se comportaron de manera muy semejante en la manifestación de sus parasitemias.

Todos los grupos de ratones inoculados con los clones del estudio, presentaron un estado general satisfactorio y sobrevivieron a la infección.

Lo anterior indica que, para los ratones Swiss de 30 días de edad inoculados con una dosis de 10^5 trypomastigotes/ratón, estos clones no producen mortalidad en fase aguda.

En las figuras 36 y 37 se visualiza el parásito en sangre.

4.7. OBSERVACION MACROSCOPICA DE ORGANOS

El peso promedio de los ratones correspondientes a los lotes de experimentación, osciló entre 24 g. (inicio del experimento, 30 días de edad) a 38 g. (finalizando el experimento en fase aguda).

Los pesos y medidas de los órganos de los ratones control se tomaron en cada día del sacrificio de los ratones de experimentación, con el fin de hacer el análisis macroscópico comparativo de los órganos de ratones infectados, según la edad correspondiente.

Como se refleja en la Fig.16, se encontró esplenomegalia en todos los ratones de los diferentes lotes inoculados con los once clones estudiados en ratón.

Otras anomalías macroscópicas se pudieron detectar, tales como reblandecimiento en la consistencia de la masa cerebral, para todos los clones pertenecientes al clon Mayor 20, ESQUILO, CUICA y P11. De igual manera para los clones NR y SO3 pertenecientes al clon Mayor 39.

En la Fig.17 se reporta el índice cardíaco, cuyo cálculo se estableció según la fórmula adecuada y el cual fué normal para todos los ratones inoculados con los diferentes clones.

4.8. ESTUDIO HISTOPATOLOGICO EN LOS RATONES INFECTADOS

En las tablas XII a XXII inclusive, se muestran los resultados del estudio histopatológico realizado en fase aguda de la infección-enfermedad de cada uno de los clones en todos los órganos elegidos.

Se indica la inflamación y los pseudoquistes, encontrados en la observación de las preparaciones de los tejidos en los diferentes días postinfección.

Las parasitemias anotadas en las tablas, corresponden al promedio de los tres ratones sacrificados en el día indicado.

En las tablas XXIII a XXXIII se muestra el porcentaje de inflamación y pseudoquistes en los órganos, indicándose por cruces la inflamación del área tisular afectada y el número de pseudoquistes encontrados en cada órgano afectado.

En las observaciones histológicas se encuentra que estos clones del estudio son fundamentalmente miotrópicos, como una característica común a todos, con hallazgos de pseudoquistes en músculo esquelético y en fibras del miocardio.

Como resultado significativo, se encuentra que los clones ESQUILO, CUICA, y P11 pertenecientes al clon Mayor 20, no presentaron pseudoquistes en músculo cardíaco.

Como hallazgo interesante, se reporta presencia de pseudoquistes en hígado y bazo, al día 28 en ratones infectados con el clon SO3.

En cuanto a la inflamación, se observa que los órganos que la sufren son el cerebro, corazón, hígado, colon, músculo esquelético y poco frecuente en bazo.

En los demás tejidos no se observa ni inflamación ni pseudoquistes.

En las Fig. 18 y 19 se muestra la inflamación y pseudoquistes en corazón, como órgano fundamental y más frecuentemente afectado en la enfermedad de Chagas. Se hace el análisis diferencial por cavidades cardíacas.

En las fig. 48 a 65, se visualizan por microfotografías los resultados más relevantes como ejemplo de los hallazgos histopatológicos.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Infección de células VERO y Macrófagos con el Clon OPS21 (Clon Mayor 19)

Dias post infección	% de células infectadas	% células con amastigotes	Nº amastigotes /células *	% células con tripomastigotes	Nº tripomastigotes /células*
VERO					
5	52	100	19	-	-
10	69	22	31	78	79
MACROFAGOS					
5	36	100	6	-	-
10	30	70	12	30	58

* Valor promedio de parásitos en células infectadas

Tabla II. Infección de células VERO y Macrófagos con el Clon 13379 (Clon Mayor 19)

Dias post infección	% de células infectadas	% células con amastigotes	Nº amastigotes /células *	% células con tripomastigotes	Nº tripomastigotes /células*
VERO					
5	35	100	47	-	-
10	54	35	17	65	97
MACROFAGOS					
5	32	100	7	-	-
10	46	36	5	64	28

* Valor promedio de parásitos en células infectadas

Tabla III. Infección de células VERO y Macrófagos con el Clon SP104 (Clon Mayor 19)

Dias post infección	% de células infectadas	% células con amastigotes	Nº amastigotes /células *	% células con tripomastigotes	Nº tripomastigotes /células*
VERO					
5	72	100	28	-	-
10	71	37	9	63	30
MACROFAGOS					
5	35	100	24	-	-
10	44	44	21	56	34

* Valor promedio de parásitos en células infectadas

Tabla IV. Infección de células VERO y Macrófagos con el Clon ESQUILO (Clon Mayor 20)

Dias post infección	% de células infectadas	% células con amastigotes	Nº amastigotes /células *	% células con tripomastigotes	Nº tripomastigotes /células*
VERO					
5	43	100	55	-	-
10	62	38	34	62	109
MACROFAGOS					
5	30	100	10	-	-
10	60	42	12	58	54

* Valor promedio de parásitos en células infectadas

Tabla V. Infección de células VERO y Macrófagos con el **Clon P11** (Clon Mayor 20)

Días post infección	% de células infectadas	% células con amastigotes	Nº amastigotes /células *	% células con tripomastigotes	Nº tripomastigotes /células*
VERO					
5	38	100	12	-	-
10	73	34	23	66	101
MACROFAGOS					
5	30	100	9	-	-
10	60	25	4	75	67

* Valor promedio de parásitos en células infectadas

Tabla VI. Infección de células VERO y Macrófagos con el Clon CUICA (Clon Mayor20)

Días post infección	% de células infectadas	% células con amastigotes	Nº amastigotes /células *	% células con tripomastigotes	Nº tripomastigotes /células*
VERO					
5	65	100	13	-	-
10	67	47	10	53	76
MACROFAGOS					
5	35	100	5	-	-
10	36	48	5	52	44

* Valor promedio de parásitos en células infectadas

Tabla VII. Infección de células VERO y Macrófagos con el Clon BUG2148 (Clon Mayor 39)

Días post infección	% de células infectadas	% células con amastigotes	Nº amastigotes /células *	% células con tripomastigotes	Nº tripomastigotes /células*
VERO					
5	60	100	14	-	-
10	52	27	18	73	758
MACROFAGOS					
5	35	100	5	-	-
10	57	35	6	65	25

* Valor promedio de parásitos en células infectadas

Tabla VIII. Infección de células VERO y Macrófagos con el Clon BUG2149 (Clon Mayor 39)

Días post infección	% de células infectadas	% células con amastigotes	Nº amastigotes /células *	% células con tripomastigotes	Nº tripomastigotes /células*
VERO					
5	28	100	81	-	-
10	46	22	34	78	159
MACROFAGOS					
5	25	100	20	-	-
10	31	83	13	17	19

* Valor promedio de parásitos en células infectadas

Tabla IX. Infección de células VERO y Macrófagos con el Clon NR (Clon Mayor 39)

Días post infección	% de células infectadas	% células con amastigotes	Nº amastigotes /células *	% células con tripomastigotes	Nº tripomastigotes /células*
VERO					
5	14	97	80	3	47
10	58	19	22	81	164
MACROFAGOS					
5	16	100	4	-	-
10	67	24	8	76	49

* Valor promedio de parásitos en células infectadas

Tabla X. Infección de células VERO y Macrófagos con el Clon SO3 (Clon Mayor 39)

Días post infección	% de células infectadas	% células con amastigotes	Nº amastigotes /células *	% células con tripomastigotes	Nº tripomastigotes /células*
VERO					
5	33	100	13	-	-
10	84	20	13	80	73
MACROFAGOS					
5	24	100	10	-	-
10	58	40	7	59	28

* Valor promedio de parásitos en células infectadas

Tabla XI. Infección de Células VERO y Macrófagos con el Clon MN (Clon Mayor 39)

Días post infección	% de células infectadas	% células con amastigotes	Nº amastigotes /células *	% células con tripomastigotes	Nº tripomastigotes /células*
VERO					
5	72	100	93	-	-
10	77	25	124	75	74
MACROFAGOS					
5	27	100	27	-	-
10	53	28	5	72	44

* Valor promedio de parásitos en células infectadas

TABLA XII.- T. CRUZI: ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL CLON OPS21 (CLON MAYOR 19)

Días postinfección	7	14	21	28	35	42	49	56
Parasitemia * \bar{X}	35	80	61	42	30	15	-	-
D.T.	42	85	50	45	36	18	-	-
Cerebro								
Inflamación	-	-	+(5)	+(10)	+(10)	+(3)	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Corazón								
Inflamación	+(2)	++(20)	+++ (50)	+++ (120)	+(10)	+(10)	+(3)	+(2)
Pseudoquistes	+(2)	+(5)	++(125)	++(115)	++(40)	+(7)	+(4)	+(2)
Hígado								
Inflamación	+(2)	+(3)	+(6)	+(10)	+(10)	+(5)	+(4)	+(1)
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Bazo								
Inflamación	-	-	-	+(2)	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmón								
Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Riñón								
Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon								
Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo esquelético								
Inflamación	-	++(2)	++(6)	++(7)	++(35)	++(22)	+(7)	+(5)
Pseudoquistes	-	+(1)	+(2)	+(3)	+(2)	+(2)	+(1)	+(1)
Vejiga urinaria								
Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Médula ósea								
Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-

*Parasitemia medida en 100 campos microscópicos X1000; + <25% del área tisular afectada; ++: 25%-50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada. (): número total de focos de inflamación ó de pseudoquistes.

TABLA XIII.- T. CRUZI: ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL CLON 13379 (CLON MAYOR 19)

Días postinfección	7	14	21	28	35	42	49	56	
Parasitemia *	\bar{X}	21	53	401	950	900	200	115	40
	D.T.	20	10	20	90	41	19	45	49
Cerebro	Inflamación	+(4)	+(3)	-	+(5)	-	-	+(5)	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Corazón	Inflamación	+(5)	+(3)	++(15)	-	+(5)	+(5)	+(5)	++(10)
	Pseudoquistes	-	+(2)	-	-	-	-	+(2)	-
Hígado	Inflamación	+(4)	+(4)	+(4)	-	-	+(4)	+(7)	+(4)
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Bazo	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmón	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Riñón	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon	Inflamación	-	-	+(4)	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo esquelético	Inflamación	+(6)	+(3)	++(12)	-	++(18)	+(5)	++(5)	++(20)
	Pseudoquistes	-	+(1)	-	-	-	-	+(1)	+(1)
Vejiga urinaria	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Médula ósea	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-

*Parasitemia medida en 100 campos microscópicos X1000; + <25% del área tisular afectada; ++: 25%-50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada. (): número total de focos de inflamación ó de pseudoquistes.

TABLA XIV.- T. CRUZI: ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL CLON SP104 (CLON MAYOR 19)

Días postinfección	7	14	21	28	35	42	49	56
Parasitemia * \bar{X}	29	48	124	200	102	73	25	5
D.T.	14	20	30	32	15	35	40	12
Cerebro Inflamación	-	-	-	-	+(2)	+(12)	+(3)	+(3)
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Corazón Inflamación	-	-	-	-	++(7)	+(9)	++(15)	+(12)
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Hígado Inflamación	-	+(3)	+(10)	+(10)	+(50)	+(40)	+(50)	+(25)
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Bazo Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmón Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Riñón Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon Inflamación	-	-	-	-	+(3)	+(6)	+(16)	+(3)
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo esquelético Inflamación	-	-	+(45)	-	+(37)	++(18)	+(10)	++(34)
Pseudoquistes	-	-	++(25)	-	+(18)	-	-	+(1)
Vejiga urinaria Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Médula ósea Inflamación								
Pseudoquistes								

*Parasitemia medida en 100 campos microscópicos X1000; + <25% del área tisular afectada; ++: 25%-50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada. (): número total de focos de inflamación ó de pseudoquistes.

TABLA XV.- T. CRUZI: ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL CLON ESQUILO (CLON MAYOR 20)

Días postinfección	7	14	21	28	35	42	49	56
Parasitemia * \bar{X}	22	93	2.76	162	112	70	33	12
D.T.	34	60	2.94	174	102	100	24	6
Cerebro Inflamación	-	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Corazón Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Hígado Inflamación	-	+(2)	+(1)	+(1)	+(3)	+(4)	+(3)	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Bazo Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmón Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Riñón Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo esquelético Inflamación	-	+(16)	+++ (40)	++ (26)	++ (28)	+++ (45)	++ (16)	-
Pseudoquistes	-	-	-	+(1)	+(2)	+(1)	-	-
Vejiga urinaria Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Médula ósea Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-

*Parasitemia medida en 100 campos microscópicos X1000; + <25% del área tisular afectada; ++: 25%-50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada. (): número total de focos de inflamación ó de pseudoquistes.

TABLA XVI.- T.CRUI: ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL CLON P11 (CLON MAYOR 20)

Días postinfección		7	14	21	28	35	42	49	56
Parasitemia *	\bar{X}	3	20	46	92	246	87	56	16
	D.T.	2	34	74	16	194	83	65	8
Cerebro	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Corazón	Inflamación	-	-	-	-	+(4)	+(4)	+(6)	+(3)
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Hígado	Inflamación	-	-	-	+(3)	-	-	+(4)	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Bazo	Inflamación	-	-	-	-	-	-	+(2)	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmón	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Riñón	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo esquelético	Inflamación	-	-	-	++(10)	+++ (22)	++(34)	+++ (44)	++(30)
	Pseudoquistes	-	-	-	-	+(1)	-	+(12)	+(6)
Vejiga urinaria	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Médula ósea	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-

*Parasitemia medida en 100 campos microscópicos X1000; + <25% del área tisular afectada; ++: 25%-50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada. (): número total de focos de inflamación ó de pseudoquistes.

TABLA XVII.- T. CRUZI: ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL CLON CUICA (CLON MAYOR 20)

Días postinfección		7	14	21	28	35	42	49	56
Parasitemia *	\bar{X}	90	155	441	173	60	12	11	6
	D.T.	54	95	220	104	14	6	2	2
Cerebro	Inflamación	-	-	-	-	-	+(3)	+(2)	+(1)
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Corazón	Inflamación	-	-	-	+(3)	+(10)	+(3)	+(3)	+(1)
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Hígado	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Bazo	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmón	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Riñón	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo esquelético	Inflamación	-	+++ (40)	++ (4)	++ (20)	++ (30)	++ (10)	++ (25)	+(8)
	Pseudoquistes	-	+(2)	+(1)	+(1)	+(4)	-	-	-
Vejiga urinaria	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Médula ósea	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-

*Parasitemia medida en 100 campos microscópicos X1000; + <25% del área tisular afectada; ++: 25%-50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada. (): número total de focos de inflamación ó de pseudoquistes.

TABLA XVIII. - T. CRUZI: ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL CLON BUG2148 (CLON MAYOR 39)

Días postinfección		7	14	21	28	35	42	49	56
Parasitemia *	\bar{X}	6	700	1100	881	552	63	29	-
	D.T.	7	240	390	200	125	38	11	-
Cerebro	Inflamación	-	-	-	-	+(5)	+(2)	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Corazón	Inflamación	-	+(12)	+(18)	+(16)	+(5)	+(2)	+(2)	-
	Pseudoquistes	-	+(2)	+(18)	+(3)	-	-	-	-
Hígado	Inflamación	+(4)	+(6)	+(8)	+(6)	+(7)	+(3)	+(2)	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Bazo	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmón	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Riñón	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon	Inflamación	-	-	-	-	-	+(1)	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo esquelético	Inflamación	-	+(9)	++(46)	+++ (60)	++(14)	+(4)	+(1)	-
	Pseudoquistes	-	+(1)	++(45)	+(8)	-	-	-	-
Vejiga urinaria	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Médula ósea	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-

*Parasitemia medida en 100 campos microscópicos X1000; + <25% del área tisular afectada; ++: 25%-50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada. (): número total de focos de inflamación ó de pseudoquistes.

TABLA XIX.- T. CRUZI: ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL CLON BUG2149 (CLON MAYOR 39)

Días postinfección	7	14	21	28	35	42	49	56
Parasitemia * \bar{X}	21	800	1800	1700	543	147	35	3
D.T.	41	320	1180	840	404	124	45	2
Cerebro Inflamación	-	-	-	+(4)	+(5)	+(3)	+(9)	+(3)
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Corazón Inflamación	-	-	+(12)	+(8)	+(12)	+(11)	+(6)	+(4)
Pseudoquistes	-	-	+(8)	+(6)	+(23)	-	-	-
Hígado Inflamación	-	+(16)	+(10)	+(12)	+(2)	+(11)	+(6)	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Bazo Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmón Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Riñón Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon Inflamación	-	-	-	-	-	+(3)	+(4)	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo esquelético Inflamación	-	-	+++ (60)	+++ (50)	+++ (70)	+(25)	+(4)	+(5)
Pseudoquistes	-	-	+(5)	+(23)	+(10)	-	-	-
Vejiga urinaria Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Médula ósea Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-

*Parasitemia medida en 100 campos microscópicos X1000; + <25% del área tisular afectada; ++: 25%-50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada. (): número total de focos de inflamación ó de pseudoquistes.

TABLA XX.--T. CRUZI: ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL CLON NR (CLON MAYOR 39)

Días postinfección	7	14	21	28	35	42	49	56
Parasitemia * \bar{X}	20	46	3	3	-	-	-	-
D.T.	9	3	1	1	-	-	-	-
Cerebro Inflamación	-	-	-	-	+(5)	+(4)	+(4)	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Corazón Inflamación	-	-	+(34)	+(16)	+(7)	+(4)	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Hígado Inflamación	-	-	-	+(6)	+(6)	+(18)	+(8)	+(1)
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Bazo Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmón Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Riñón Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo esquelético Inflamación	-	-	-	++(54)	+(13)	+(15)	+(4)	+(2)
Pseudoquistes	-	-	-	+(3)	-	-	-	-
Vejiga urinaria Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Médula ósea Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-

*Parasitemia medida en 100 campos microscópicos X1000; + <25% del área tisular afectada; ++: 25%-50% del área tisular afectada; +++: >50% del área tisular afectada. A++ número total de focos de inflamación ó de pseudoquistes.

TABLA XXI.-T. CRUZI: ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL CLON SO3 (CLON MAYOR 39)

Días postinfección	7	14	21	28	35	42	49	56	
Parasitemia *	\bar{X}	16	40	6	4	4	3	2	1
	D.T.	12	32	4	3	3	2	6	-
Cerebro	Inflamación	-	-	-	+(3)	+(3)-	+(6)	+(7)	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Corazón	Inflamación	-	-	++(30)	+(2)	+(7)	+(6)	+(5)	+(2)
	Pseudoquistes	-	-	-	+(1)	-	-	-	-
Hígado	Inflamación	-	-	++(12)	+(6)	+(3)	+(4)	++(15)	-
	Pseudoquistes	-	-	-	++(8)	-	-	-	-
Bazo	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	+(1)	-	-	-	-
Pulmón	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Riñón	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo esquelético	Inflamación	-	+(6)	++(40)	+(9)	+(6)	+++ (50)	+++ (45)	+(6)
	Pseudoquistes	-	-	+(7)	+(1)	+(1)	+(1)	-	-
Vejiga urinaria	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Médula ósea	Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-

*Parasitemia medida en 100 campos microscópicos X1000; + <25% del área tisular afectada; ++: 25%-50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada. (): número total de focos de inflamación ó de pseudoquistes.

TABLA XXII.-T. CRUZI: ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL CLON MN (CLON MAYOR 39)

Días postinfección	7	14	21	28	35	42	49	56
Parasitemia * \bar{X}	165	1690	2118	1420	900	188	55	20
D.T.	194	1300	1250	930	300	16	32	10
Cerebro Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Corazón Inflamación	+(2)	+(3)	+(6)	+++ (14)	+(14)	+(4)	+(2)	+(1)
Pseudoquistes	+(6)	+(8)	+(3)	+(6)	-	-	-	-
Hígado Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Bazo Inflamación	+(4)	+(5)	+(4)	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmón Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Riñón Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo esquelético Inflamación	++(8)	+++ (25)	+++ (22)	+++ (50)	+++ (45)	+++ (40)	++(25)	++(15)
Pseudoquistes	+(2)	++(15)	++(16)	++(16)	+(9)	-	-	-
Vejiga urinaria Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Médula ósea Inflamación	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-

*Parasitemia medida en 100 campos microscópicos X1000; + <25% del área tisular afectada; ++: 25%-50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada. (): número total de focos de inflamación ó de pseudoquistes.

**TABLA XXIII. *TRYPANOSOMA CRUZI* (CLON OPS₂₁):
PORCENTAJE DE RATONES CON INFLAMACION Y
PSEUDOQUISTES EN RELACION AL AREA AFECTADA.**

TEJIDO	INFLAMACION			PSEUDOQUISTES		
	+	++	+++	+	++	+++
CEREBRO	50	-	-	-	-	-
CORAZON	40	10	40	60	20	-
HIGADO	100	-	-	-	-	-
BAZO	10	-	-	-	-	-
PULMON	-	-	-	-	-	-
RIÑON	-	-	-	-	-	-
COLON	-	-	-	-	-	-
M. ESQUELETICO	20	50	-	50	-	-
VEJIGA URINARIA	-	-	-	-	-	-
MEDULA OSEA	-	-	-	-	-	-

+ <25% del área tisular afectada; ++ entre 25 y 50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada.

**TABLA XXIV. *TRYPANOSOMA CRUZI* (CLON 13379):
PORCENTAJE DE RATONES CON INFLAMACION Y
PSEUDOQUISTES EN RELACION AL AREA AFECTADA.**

TEJIDO	INFLAMACION			PSEUDOQUISTES		
	+	++	+++	+	++	+++
CEREBRO	25	-	-	-	-	-
CORAZON	63	12	-	12	-	-
HIGADO	62	-	-	-	-	-
BAZO	-	-	-	-	-	-
PULMON	-	-	-	-	-	-
RIÑON	-	-	-	-	-	-
COLON	6	-	-	-	-	-
M. ESQUELETICO	44	32	-	31	-	-
VEJIGA URINARIA	-	-	-	-	-	-
MEDULA OSEA	-	-	-	-	-	-

+ <25% del área tisular afectada; ++ entre 25 y 50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada.

**TABLA XXV. *TRYPANOSOMA CRUZI* (CLON SP104):
PORCENTAJE DE RATONES CON INFLAMACION Y
PSEUDOQUISTES EN RELACION AL AREA AFECTADA.**

TEJIDO	INFLAMACION			PSEUDOQUISTES		
	+	++	+++	+	++	+++
CEREBRO	33	-	-	-	-	-
CORAZON	17	25	-	-	-	-
HIGADO	75	9	-	-	-	-
BAZO	-	-	-	-	-	-
PULMON	-	-	-	-	-	-
RIÑON	-	-	-	-	-	-
COLON	33	8	-	-	-	-
M. ESQUELETICO	25	34	-	17	8	-
VEJIGA URINARIA	-	-	-	-	-	-
MEDULA OSEA	-	-	-	-	-	-

+ <25% del área tisular afectada; ++ entre 25 y 50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada.

**TABLA XXVI. *TRYPANOSOMA CRUZI* (CLON ESQUILO):
PORCENTAJE DE RATONES CON INFLAMACION Y
PSEUDOQUISTES EN RELACION AL AREA AFECTADA.**

TEJIDO	INFLAMACION			PSEUDOQUISTES		
	+	++	+++	+	++	+++
CEREBRO	3	1	-	-	-	-
CORAZON	-	-	-	-	-	-
HIGADO	4	4	-	-	-	-
BAZO	-	-	-	-	-	-
PULMON	-	-	-	-	-	-
RIÑON	-	-	-	-	-	-
COLON	-	-	-	-	-	-
M. ESQUELETICO	-	4	4	1	9	-
VEJIGA URINARIA	-	-	-	-	-	-
MEDULA OSEA	-	-	-	-	-	-

+ <25% del área tisular afectada; ++ entre 25 y 50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada.

**TABLA XXVII. *TRYPANOSOMA CRUZI* (CLON P11):
PORCENTAJE DE RATONES CON INFLAMACION Y
PSEUDOQUISTES EN RELACION AL AREA AFECTADA.**

TEJIDO	INFLAMACION			PSEUDOQUISTES		
	+	++	+++	+	++	+++
CEREBRO	-	-	-	-	-	-
CORAZON	13	-	-	-	-	-
HIGADO	25	-	-	-	-	-
BAZO	6	-	-	-	-	-
PULMON	-	-	-	-	-	-
RIÑON	-	-	-	-	-	-
COLON	-	-	-	-	-	-
M. ESQUELETICO	13	25	13	13	-	-
VEJIGA URINARIA	-	-	-	-	-	-
MEDULA OSEA	-	-	-	-	-	-

+ <25% del área tisular afectada; ++ entre 25 y 50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada.

**TABLA XXVIII. *TRYPANOSOMA CRUZI* (CLON CUICA):
PORCENTAJE DE RATONES CON INFLAMACION Y
PSEUDOQUISTES EN RELACION AL AREA AFECTADA.**

TEJIDO	INFLAMACION			PSEUDOQUISTES		
	+	++	+++	+	++	+++
CEREBRO	25	-	-	-	-	-
CORAZON	44	-	-	-	-	-
HIGADO	19	-	-	-	-	-
BAZO	-	-	-	-	-	-
PULMON	-	-	-	-	-	-
RIÑON	-	-	-	-	-	-
COLON	-	-	-	-	-	-
M. ESQUELETICO	19	31	19	37	-	-
VEJIGA URINARIA	-	-	-	-	-	-
MEDULA OSEA	-	-	-	-	-	-

+ <25% del área tisular afectada; ++ entre 25 y 50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada.

**TABLA XXIX. *TRYPANOSOMA CRUZI* (CLON BUG 2148):
PORCENTAJE DE RATONES CON INFLAMACION Y
PSEUDOQUISTES EN RELACION AL AREA AFECTADA.**

TEJIDO	INFLAMACION			PSEUDOQUISTES		
	+	++	+++	+	++	+++
CEREBRO	17	-	-	-	-	-
CORAZON	58	-	-	33	-	-
HIGADO	-	-	-	-	-	-
BAZO	-	-	-	-	-	-
PULMON	-	-	-	-	-	-
RIÑON	-	-	-	-	-	-
COLON	8	-	-	-	-	-
M. ESQUELETICO	33	25	-	33	17	-
VEJIGA URINARIA	-	-	-	-	-	-
MEDULA OSEA	-	-	-	-	-	-

+ <25% del área tisular afectada; ++ entre 25 y 50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada.

**TABLA XXX. *TRYPANOSOMA CRUZI* (CLON BUG2149):
PORCENTAJE DE RATONES CON INFLAMACION Y
PSEUDOQUISTES EN RELACION AL AREA AFECTADA.**

TEJIDO	INFLAMACION			PSEUDOQUISTES		
	+	++	+++	+	++	+++
CEREBRO	56	-	-	-	-	-
CORAZON	75	-	-	31	-	-
HIGADO	69	-	-	-	-	-
BAZO	-	-	-	-	-	-
PULMON	-	-	-	-	-	-
RIÑON	-	-	-	-	-	-
COLON	25	-	-	-	-	-
M. ESQUELETICO	44	12	19	37	-	-
VEJIGA URINARIA	-	-	-	-	-	-
MEDULA OSEA	-	-	-	-	-	-

+ <25% del área tisular afectada; ++ entre 25 y 50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada.

**TABLA XXXI. *TRYPANOSOMA CRUZI* (CLON NR):
PORCENTAJE DE RATONES CON INFLAMACION Y
PSEUDOQUISTES EN RELACION AL AREA AFECTADA.**

TEJIDO	INFLAMACION			PSEUDOQUISTES		
	+	++	+++	+	++	+++
CEREBRO	35	-	-	-	-	-
CORAZON	57	-	-	-	-	-
HIGADO	50	-	-	-	-	-
BAZO	-	-	-	-	-	-
PULMON	-	-	-	-	-	-
RIÑON	-	-	-	-	-	-
COLON	-	-	-	-	-	-
M. ESQUELETICO	43	14	-	14	-	-
VEJIGA URINARIA	-	-	-	-	-	-
MEDULA OSEA	-	-	-	-	-	-

+ <25% del área tisular afectada; ++ entre 25 y 50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada.

**TABLA XXXII. *TRYPANOSOMA CRUZI* (CLON SO₃):
 PORCENTAJE DE RATONES CON INFLAMACION Y
 PSEUDOQUISTES EN RELACION AL AREA AFECTADA.**

TEJIDO	INFLAMACION			PSEUDOQUISTES		
	+	++	+++	+	++	+++
CEREBRO	19	-	-	-	-	-
CORAZON	62	12	-	6	-	-
HIGADO	50	19	-	-	6	-
BAZO	-	-	-	6	-	-
PULMON	-	-	-	-	-	-
RIÑON	-	-	-	-	-	-
COLON	-	-	-	-	-	-
M. ESQUELETICO	31	6	31	12	-	-
VEJIGA URINARIA	-	-	-	-	-	-
MEDULA OSEA	-	-	-	-	-	-

+ <25% del área tisular afectada; ++ entre 25 y 50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada.

**TABLA XXXIII. *TRYPANOSOMA CRUZI* (CLON MN):
 PORCENTAJE DE RATONES CON INFLAMACION Y
 PSEUDOQUISTES EN RELACION AL AREA AFECTADA.**

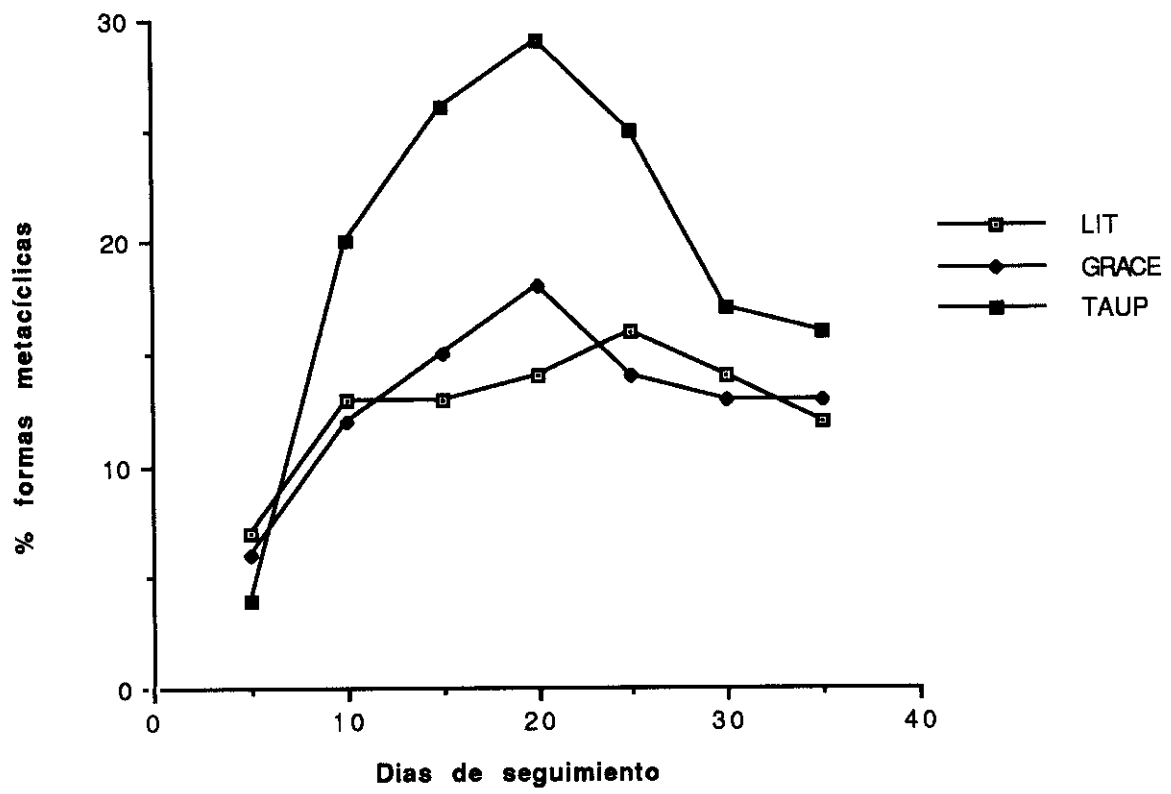
TEJIDO	INFLAMACION			PSEUDOQUISTES		
	+	++	+++	+	++	+++
CEREBRO	-	-	-	-	-	-
CORAZON	83	-	17	50	-	-
HIGADO	25	-	-	-	-	-
BAZO	33	-	-	-	-	-
PULMON	-	-	-	-	-	-
RIÑON	-	-	-	-	-	-
COLON	-	-	-	-	-	-
M. ESQUELETICO	-	25	75	25	42	-
VEJIGA URINARIA	-	-	-	-	-	-
MEDULA OSEA	-	-	-	-	-	-

+ <25% del área tisular afectada; ++ entre 25 y 50% del área tisular afectada; +++ >50% del área tisular afectada.

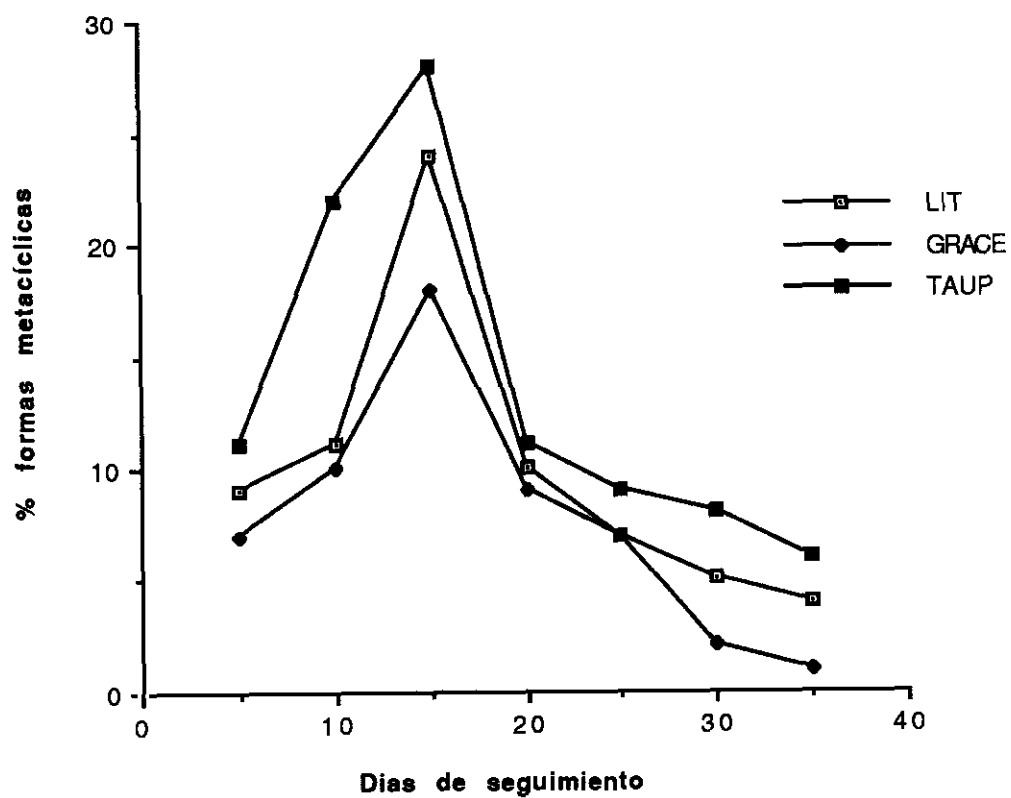
TABLA XXXIV . METABOLITOS EN LA ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR EN DOCE CLONES DE *TRYPANOSOMA CRUZI*.

Número	Metabolitos	Control	Clon mayor 19				Clon mayor 20			Clon mayor 39				
			SP104	Cutia	13379	OPS ₂₁	Esquilo	P11	Cuica	Bug ₂₁₄₈	Bug ₂₁₄₉	SO3	NR	MN
1	Glicerol	2.4	1	1.3	1.3	1.3	1.3	0.7	1.4	1.3	2.2	1.5	0.5	1.4
2	L-Malato	0.6	0.5	0.6	3.3	25	1	0.3	0.5	0.3	0.6	0.3	0.2	0.2
3	Succinato	1	7	3.2	3	4	2.2	5	6.5	9.5	11.4	9	15.5	7.5
4	Piruvato	-	-	-	0.4	0.2	0.2	0.1	-	0.2	0.6	-	0.4	0.5
5	Acetato	-	7	3	6	4.5	4	4	6	6	15	6	14	4.5
6	Alanina	1.5	2.3	3	3	2	1.8	3	2	3	8	2.5	6.5	2
7	Etanol	-	-	-	0.8	0.4	0.2	0.3	-	0.4	0.3	0.1	0.7	0.2

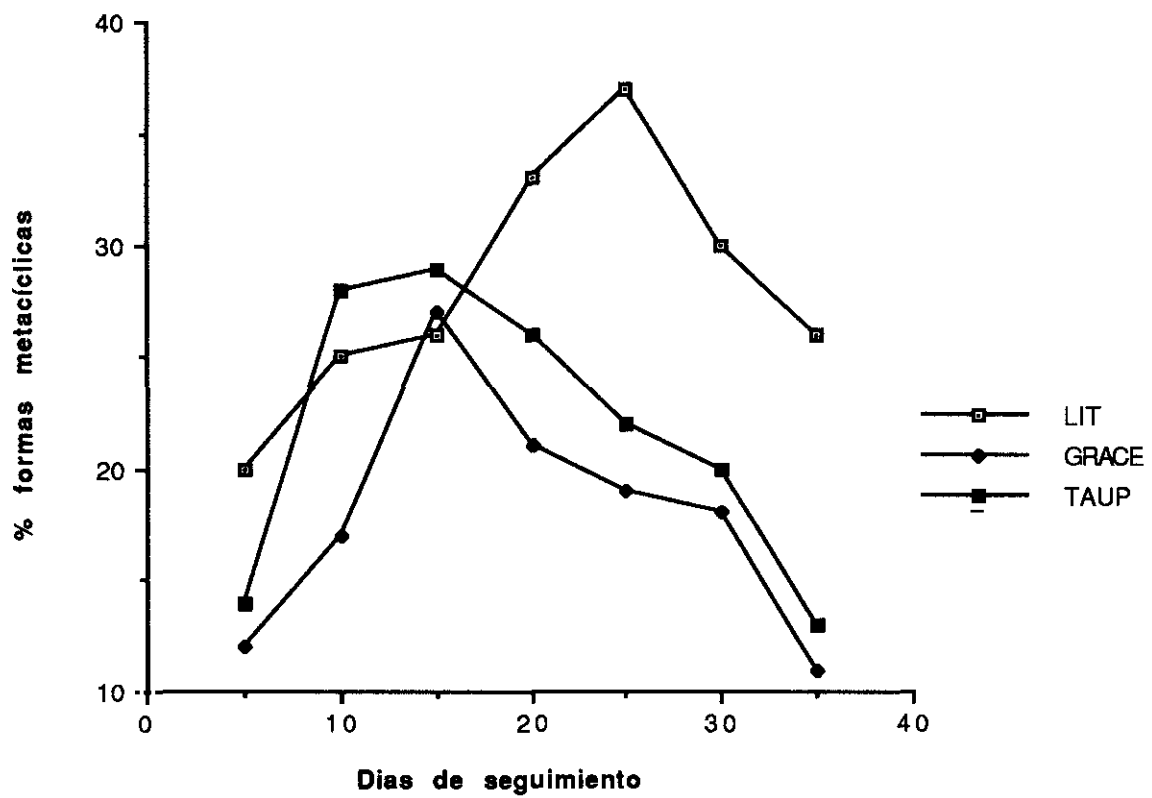
Valores de los picos de los espectros medidos en cm).



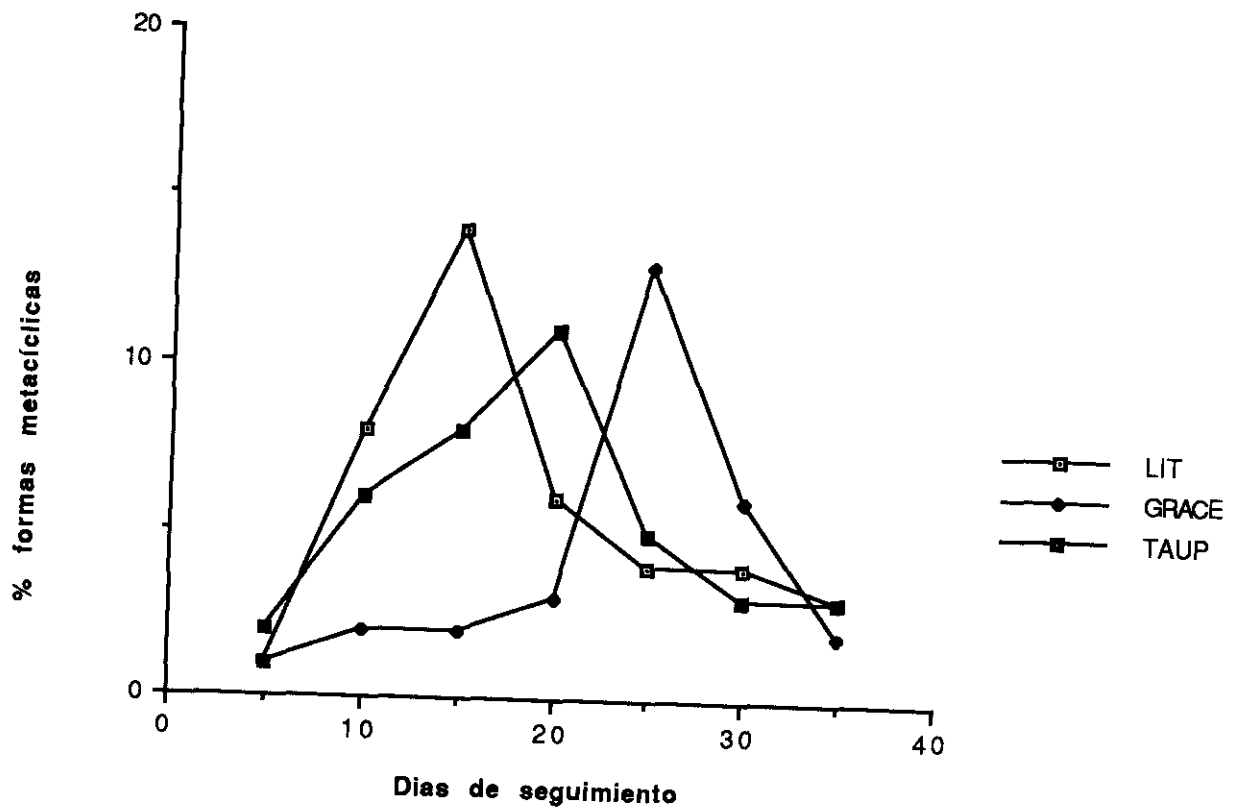
**Fig. 1: Metaciclogénesis comparativa
Clon OPS21 (Clon Mayor 19)**



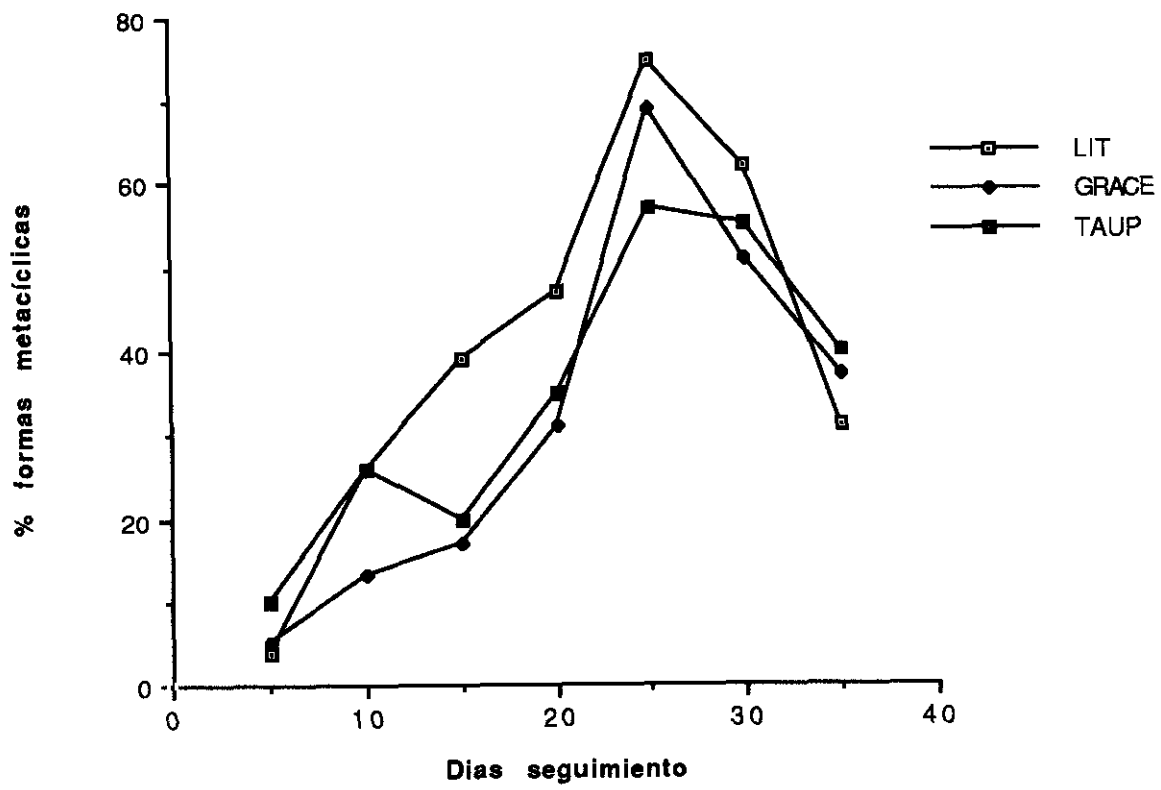
**Fig. 2: Metaciclogénesis comparativa
Clon 13379 (Clon Mayor 19)**



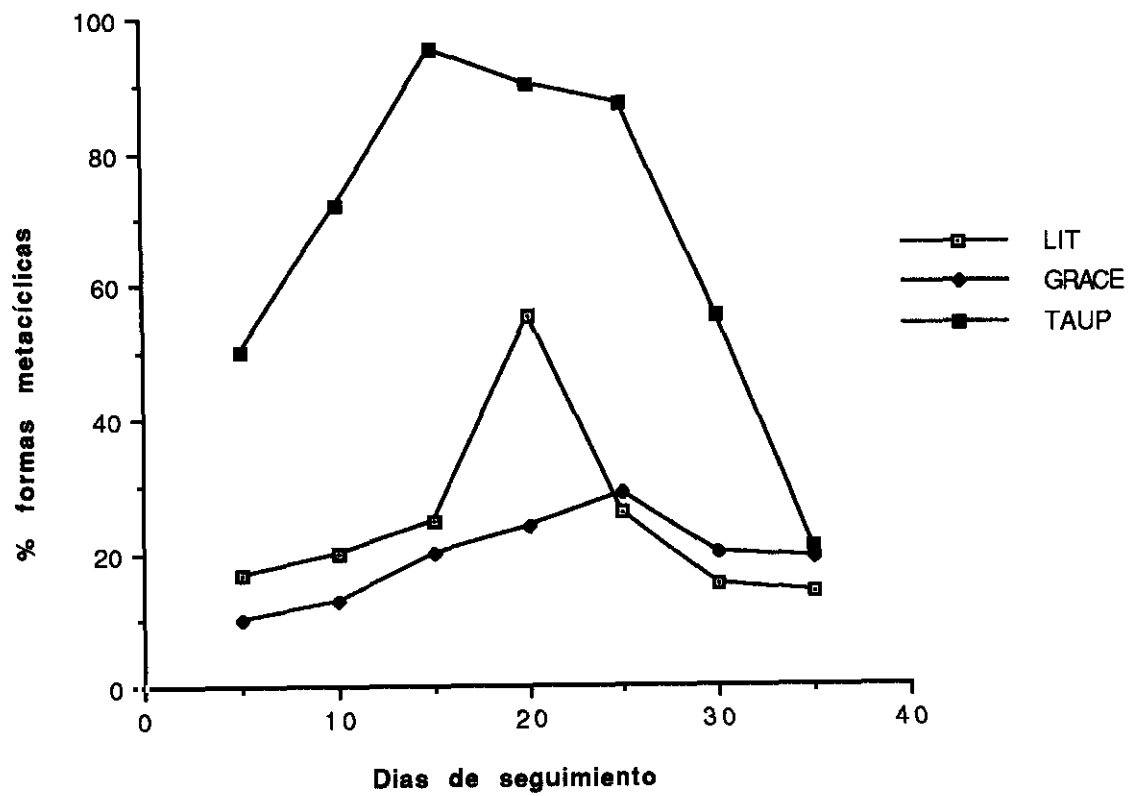
**Fig. 3: Metaciclogénesis comparativa
Clon SP104 (Clon Mayor 19)**



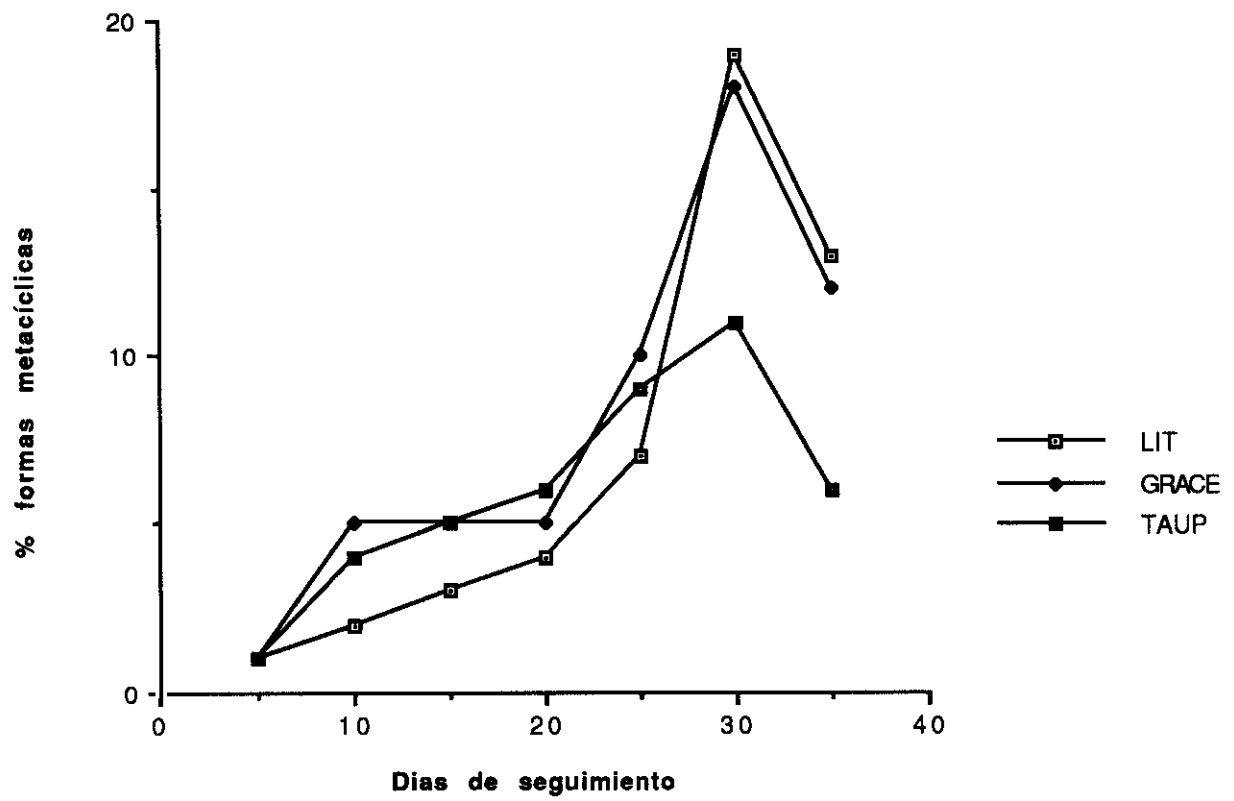
**Fig. 4: Metaciclogénesis comparativa
Clon CUTIA (Clon Mayor 19)**



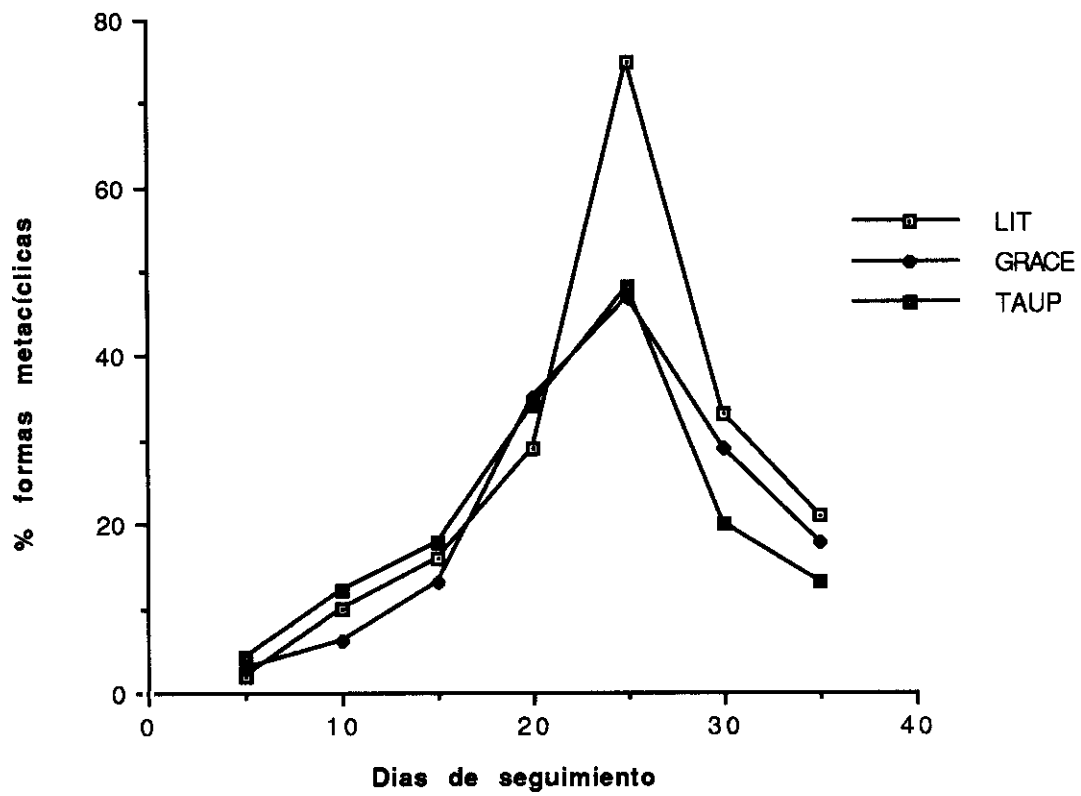
**Fig. 5: Metacicloogénesis comparativa
Clon ESQUILO (Clon Mayor 20)**



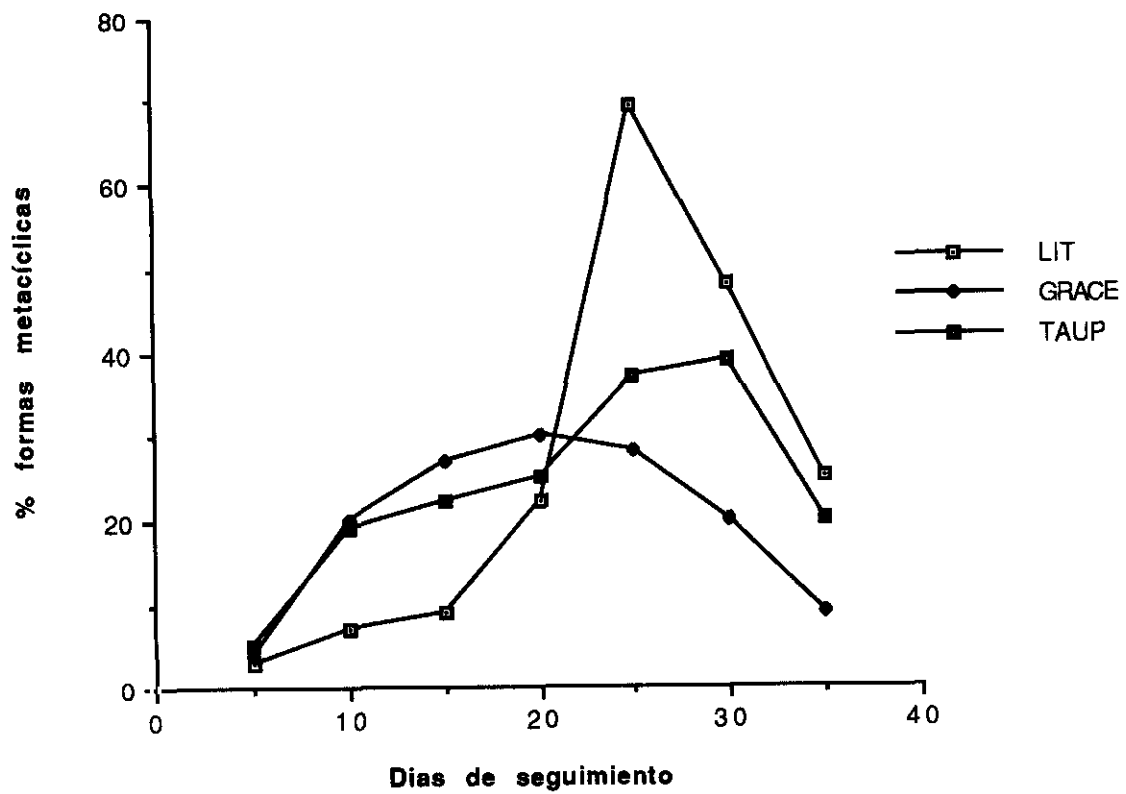
**Fig. 6: Metaciclogénesis comparativa
Clon P11 (Clon Mayor 20)**



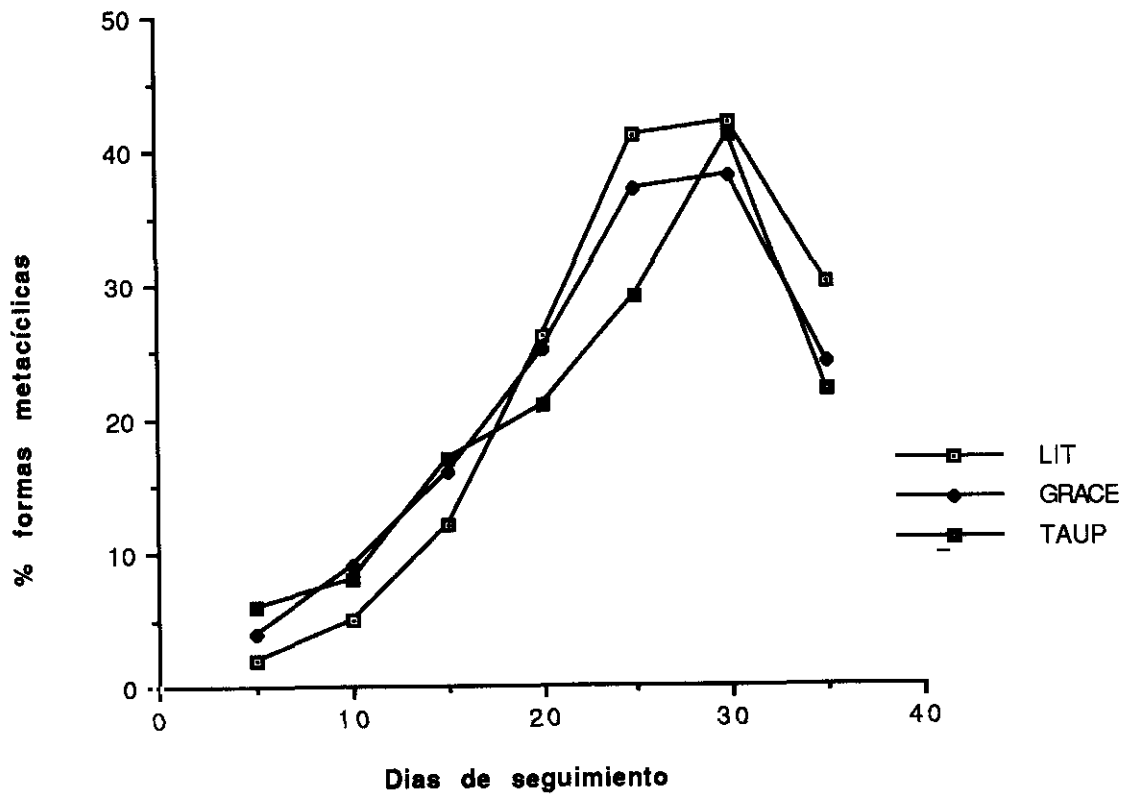
**Fig. 7: Metaciclogénesis comparativa
Clon CUICA (Clon Mayor 20)**



**Fig. 8: Metaciclogénesis comparativa
Clon BUG2148 (Clon Mayor 39)**



**Fig. 9: Metaciclogénesis comparativa
Clon BUG2149 (Clon Mayor 39)**



**Fig. 10: Metaciclogénesis comparativa
Clon NR (Clon Mayor 39)**

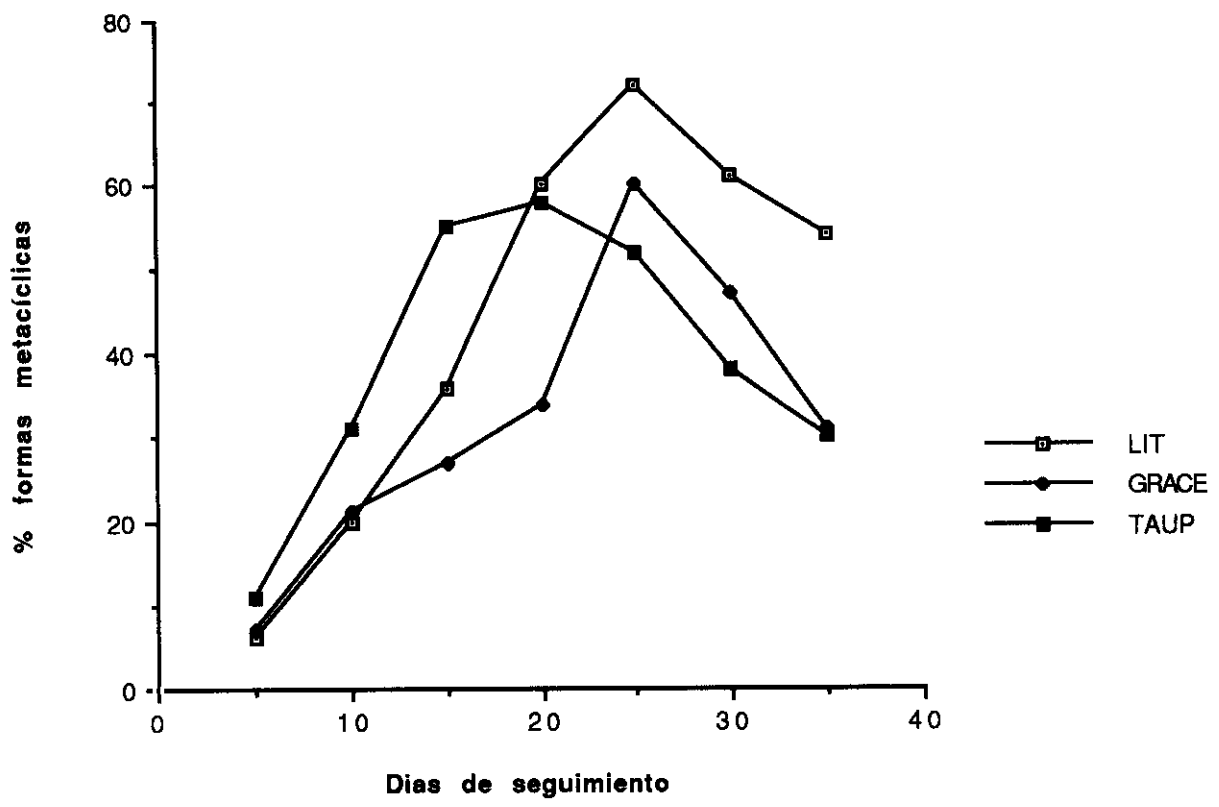
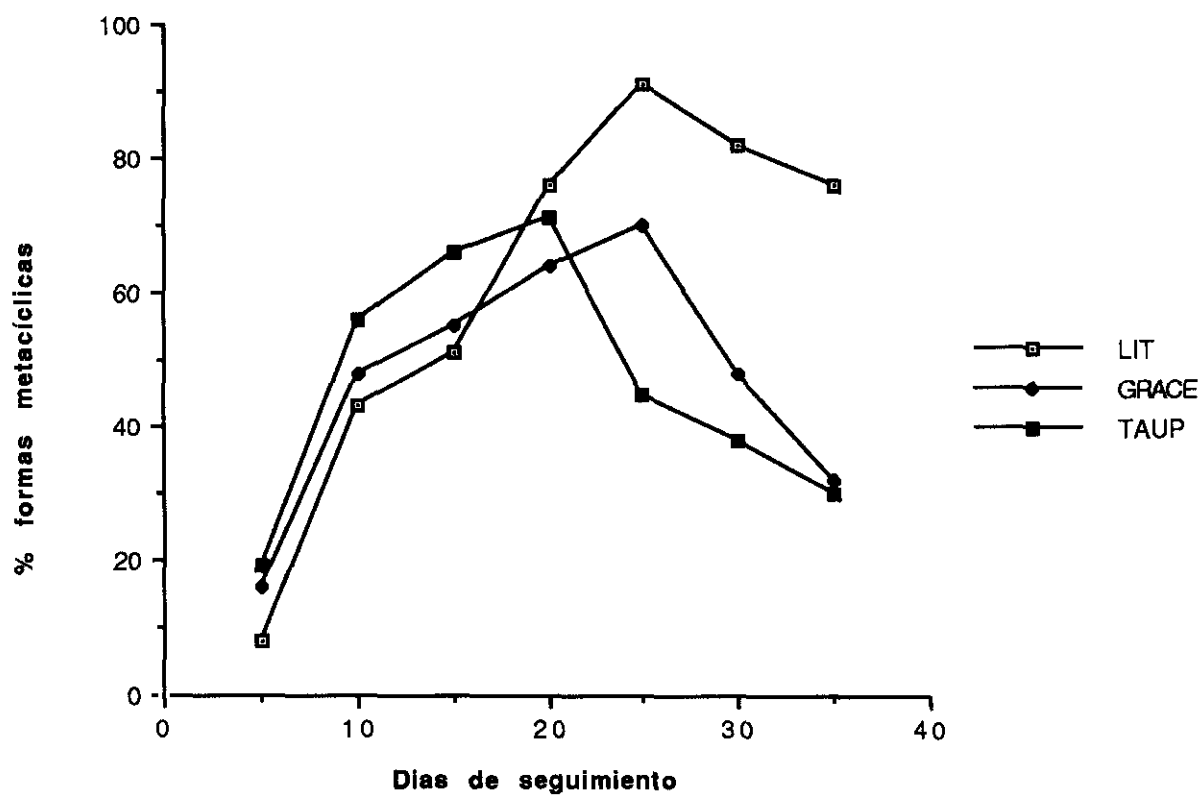


Fig. 11: Metaciclogénesis comparativa Clon SO3 (Clon Mayor 39)



**Fig. 12: Metaciclogénesis comparativa
Clon MN (Clon Mayor 39)**

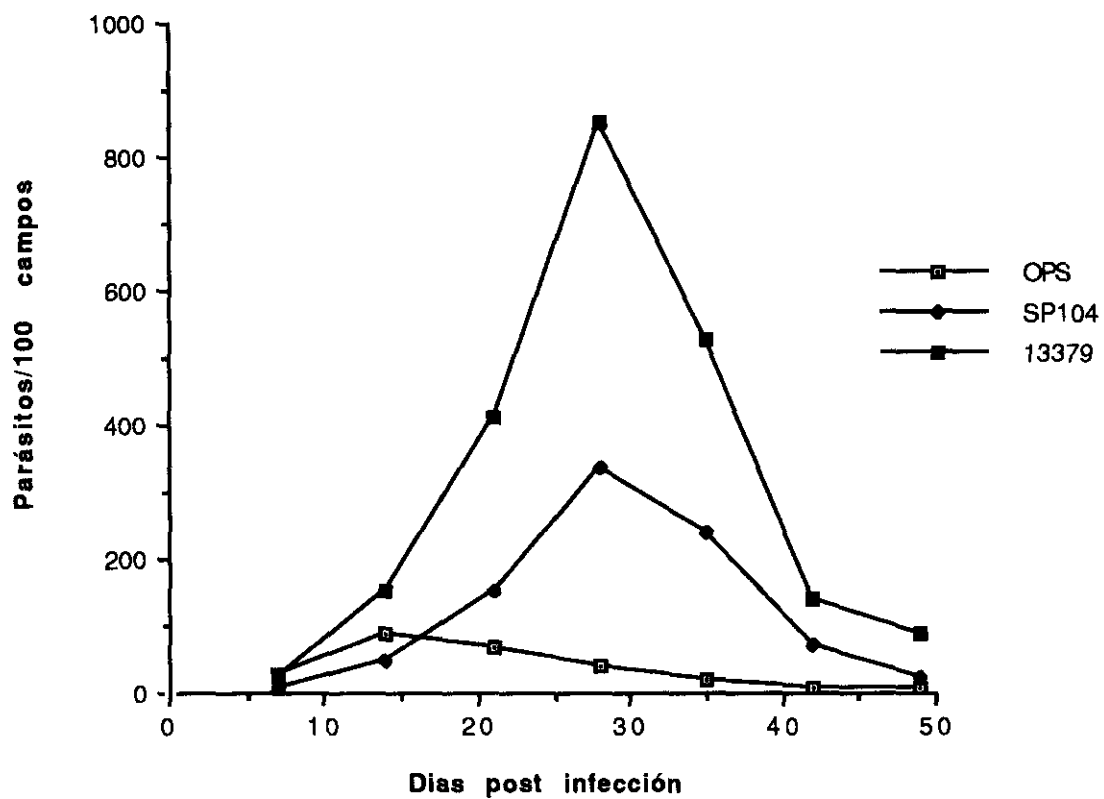


Fig. 13: Evolución de la parasitemia en ratones infectados con los clones OPS21, SP104, 13379 (Clon Mayor 19)

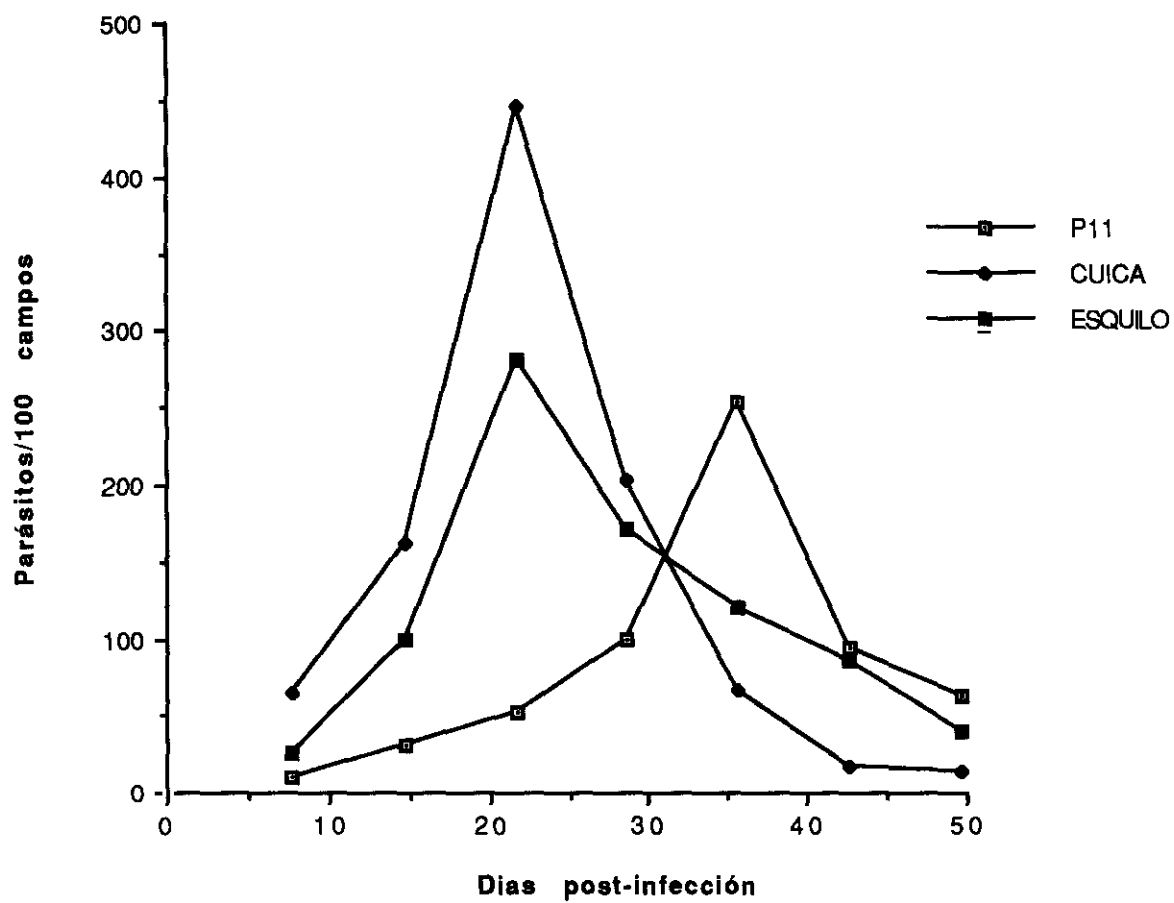


Fig. 14: Evolución de la parasitemia en ratones infectados con los clones P11, CUICA, ESQUILO (Clon Mayor 20)

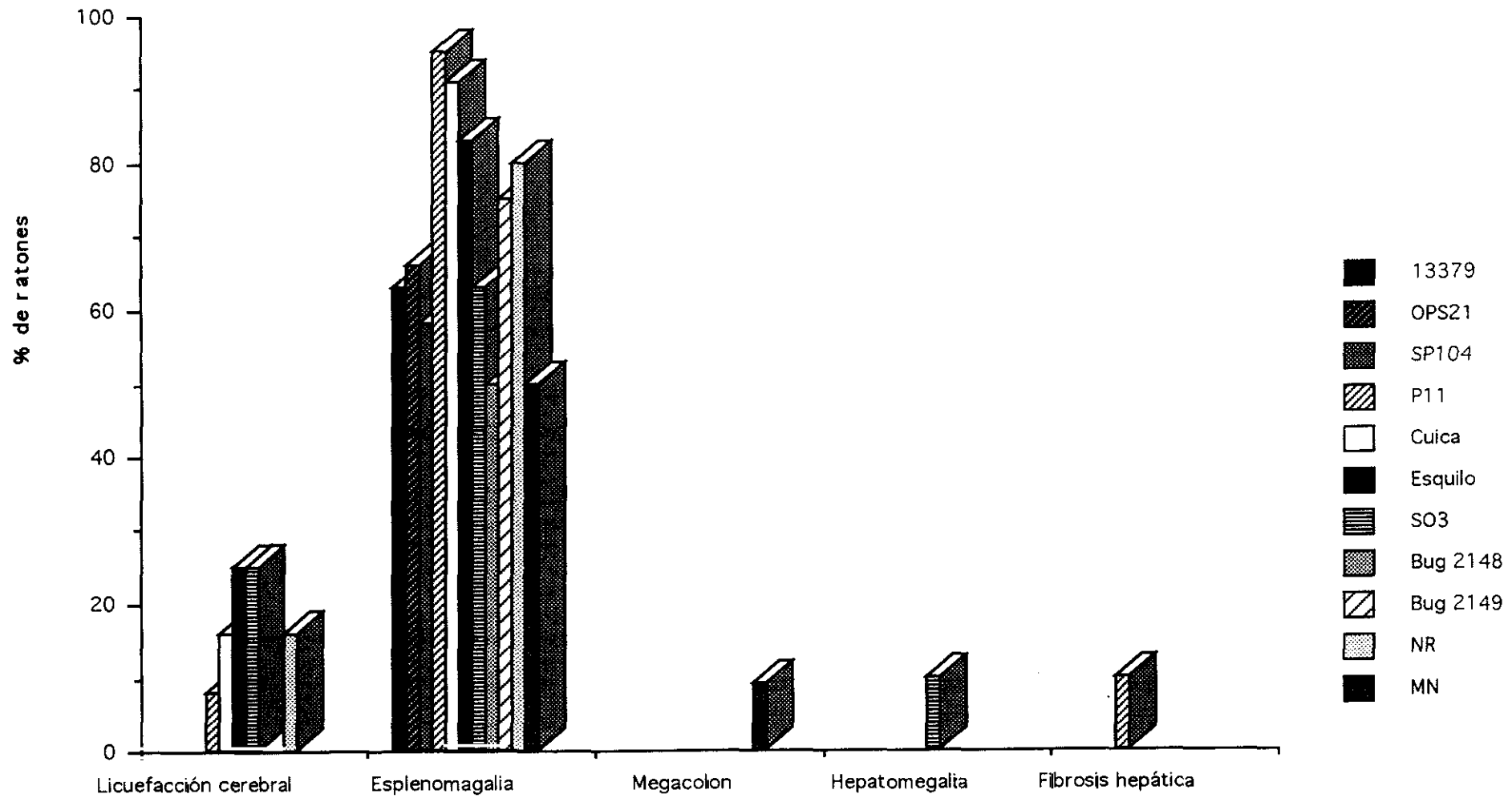


Fig. 16: Alteraciones macroscópicas

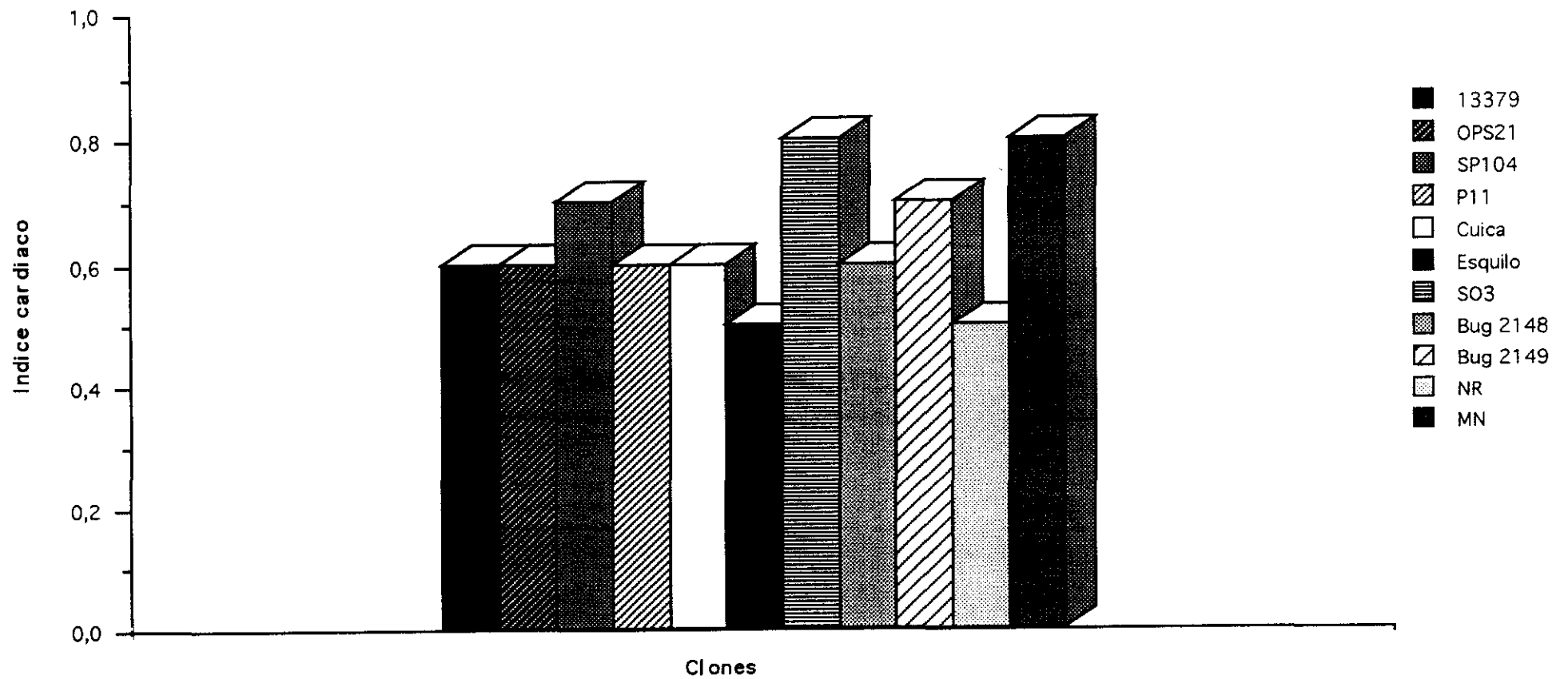


Fig. 17: Estudio comparativo del índice cardíaco en los diferentes clones

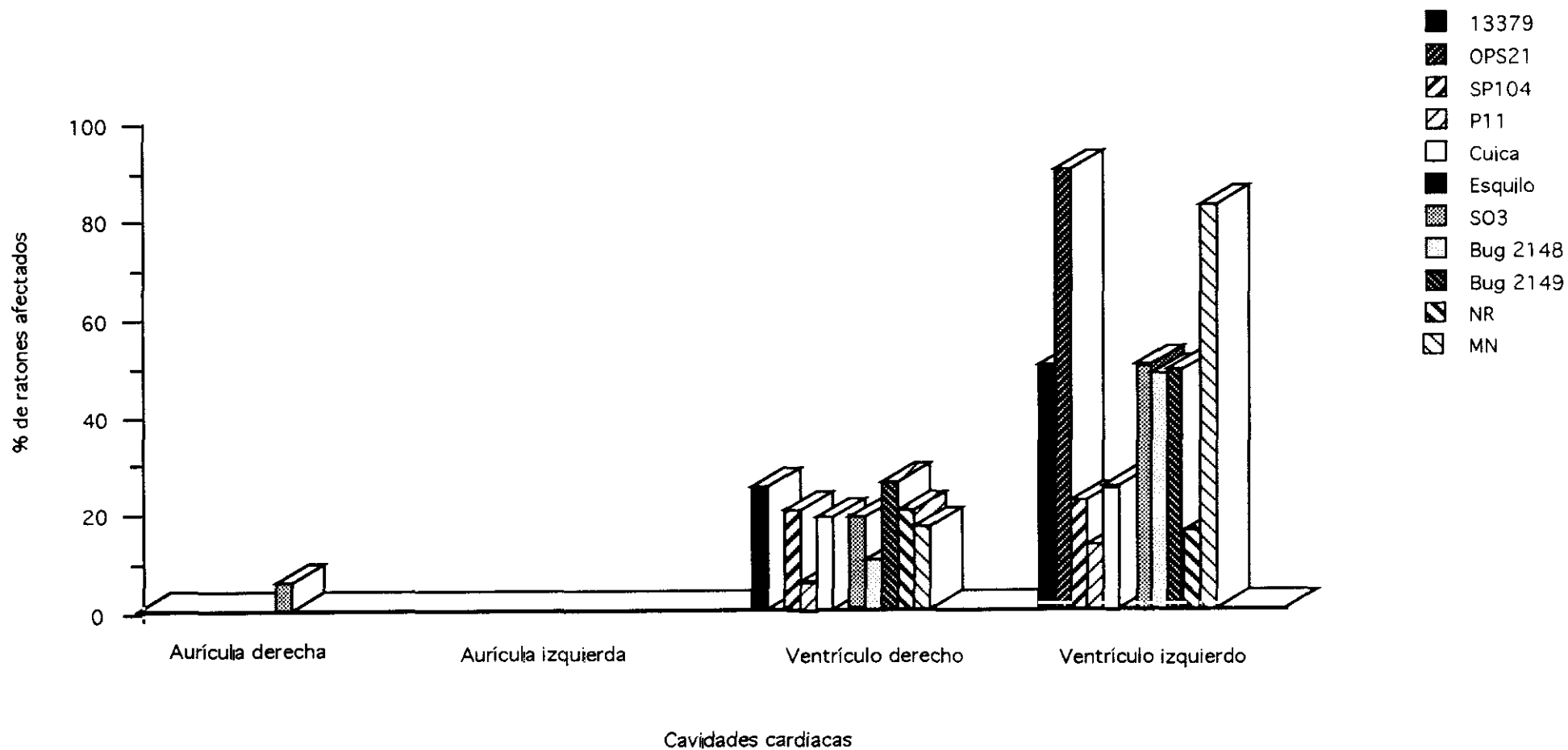


Fig. 18: Porcentaje de ratones con inflamación en cavidades cardiacas

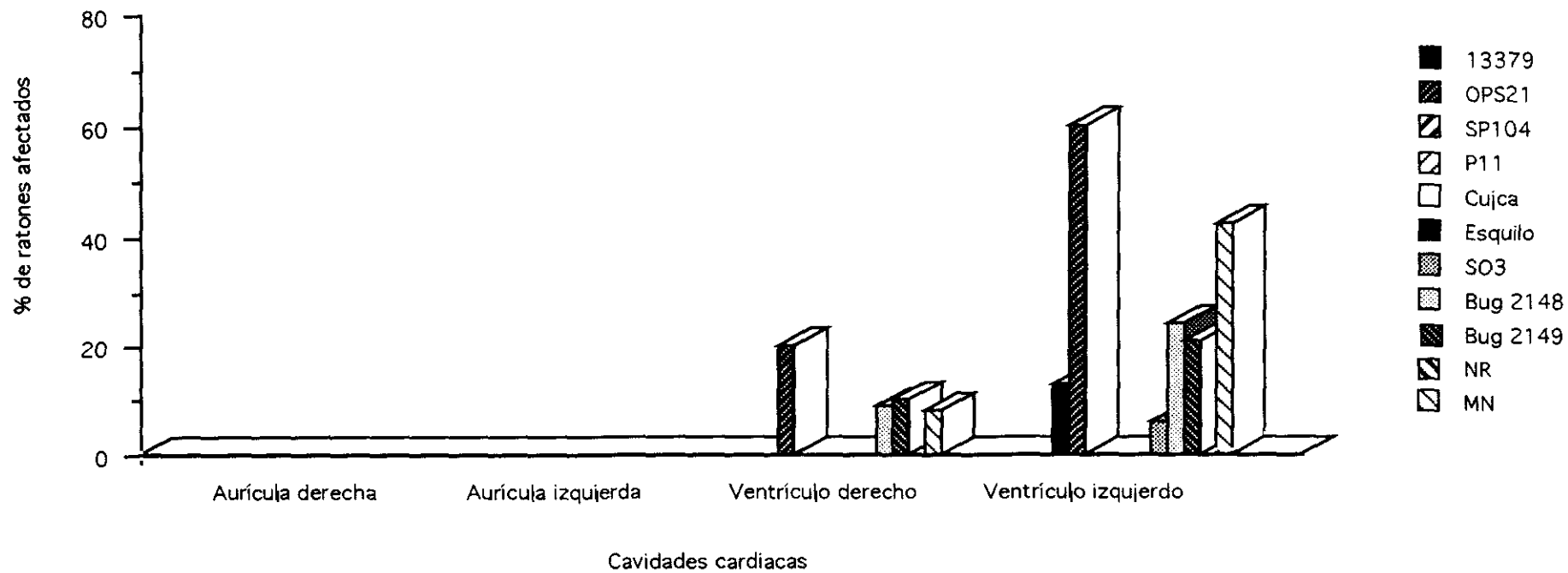


Fig. 19: Porcentaje de ratones con pseudoquistes en cavidades cardiacas

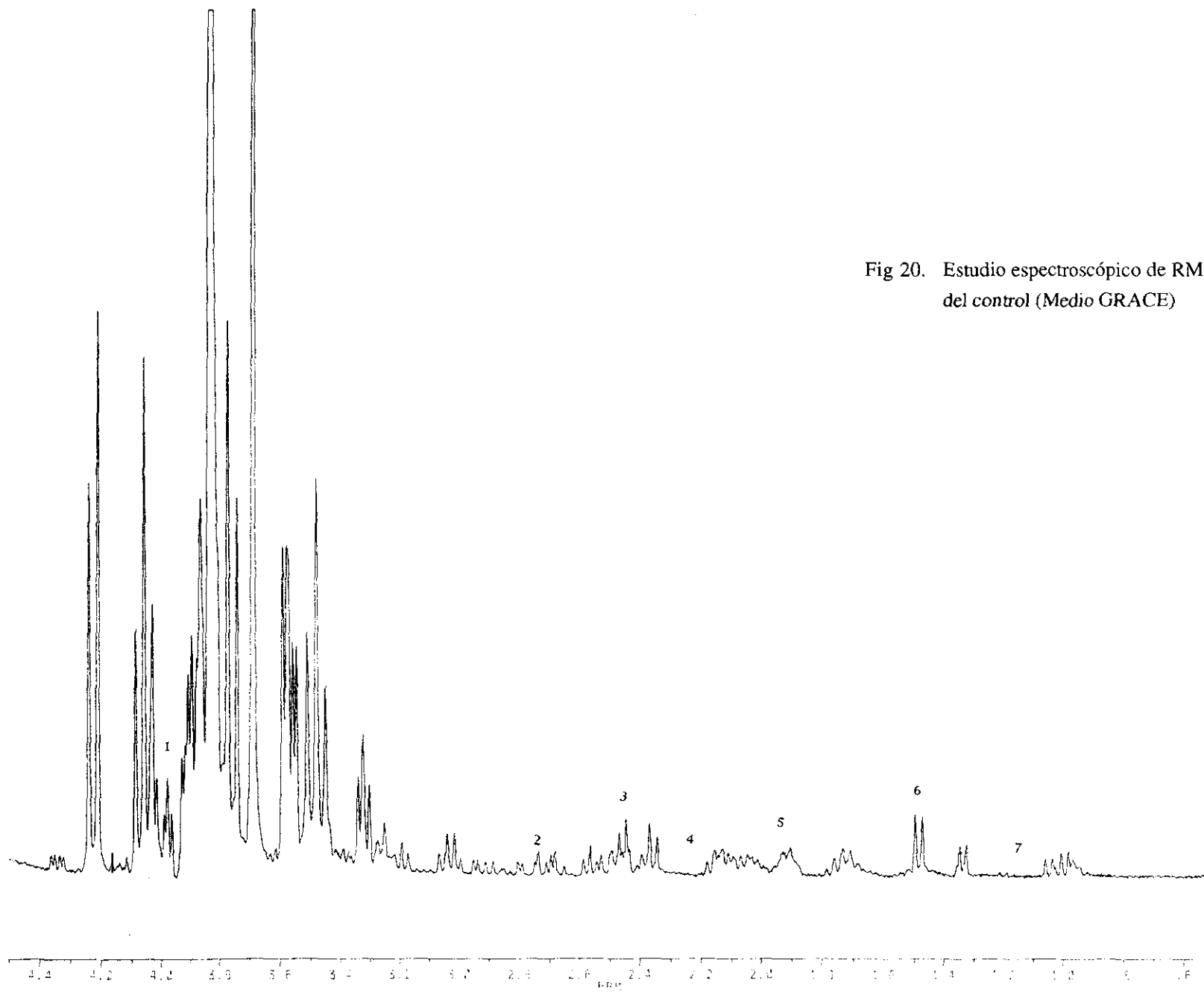


Fig 20. Estudio espectroscópico de RMN ^1H
del control (Medio GRACE)

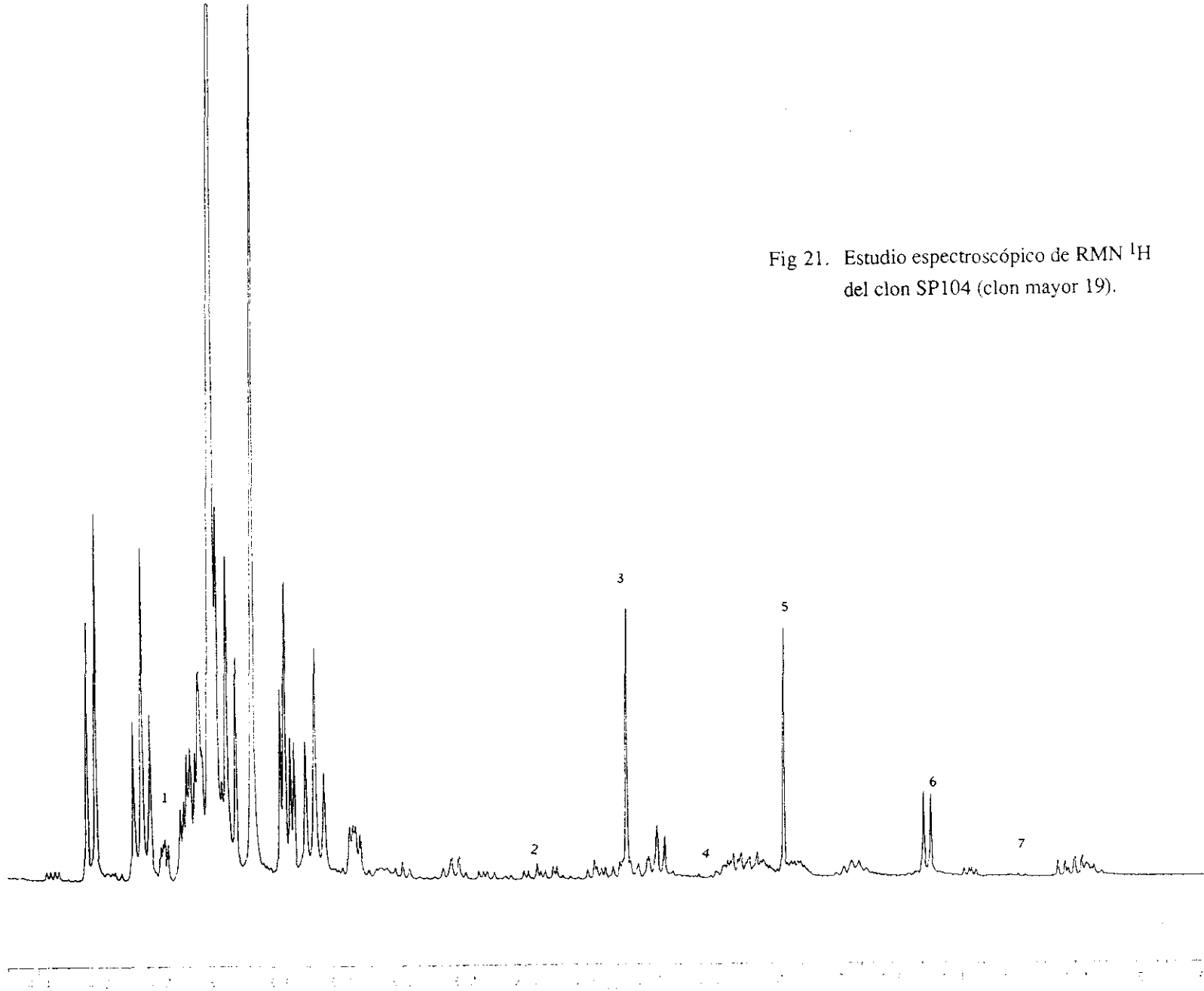


Fig 21. Estudio espectroscópico de RMN ^1H del clon SP104 (clon mayor 19).

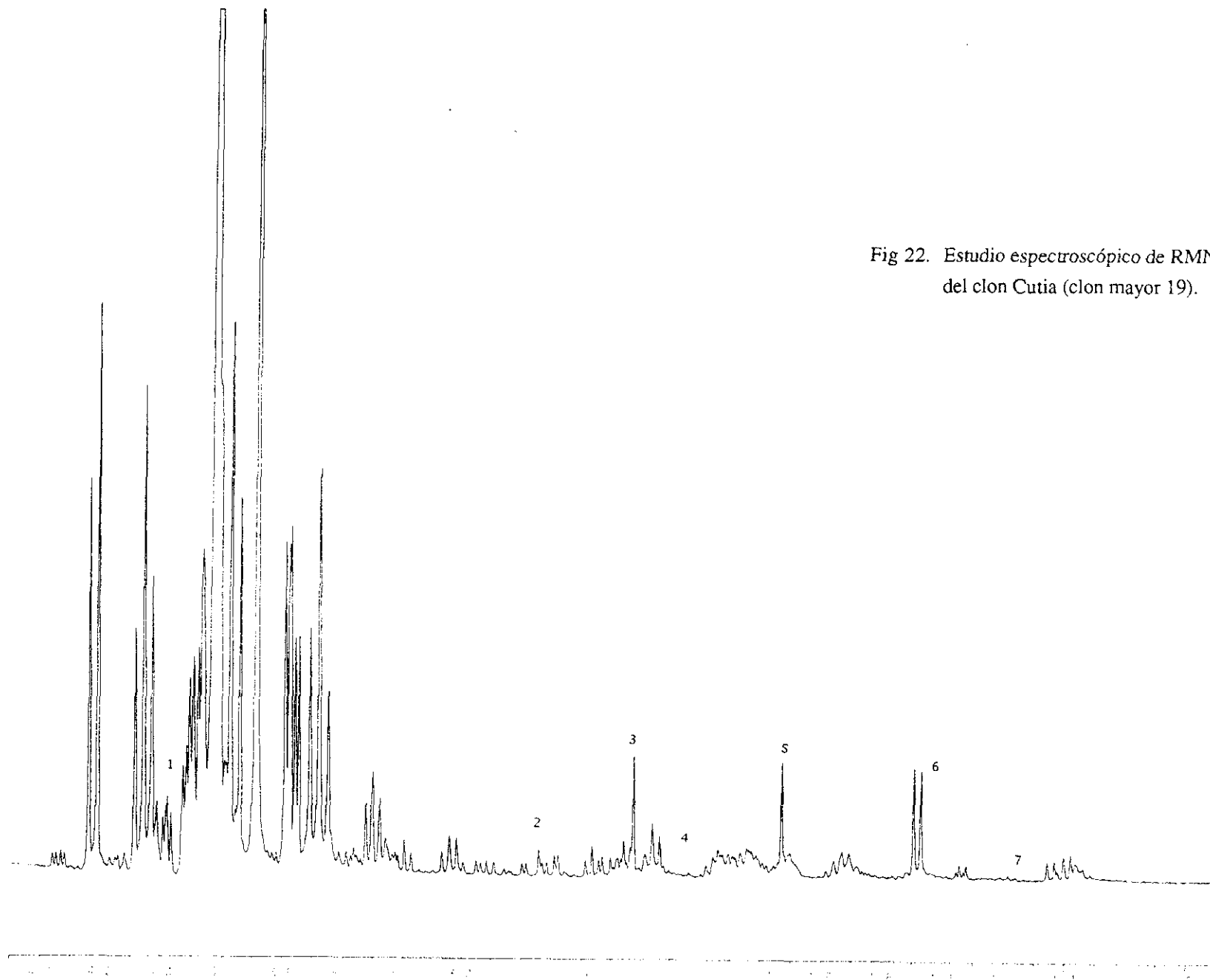


Fig 22. Estudio espectroscópico de RMN ^1H del clon Cutia (clon mayor 19).

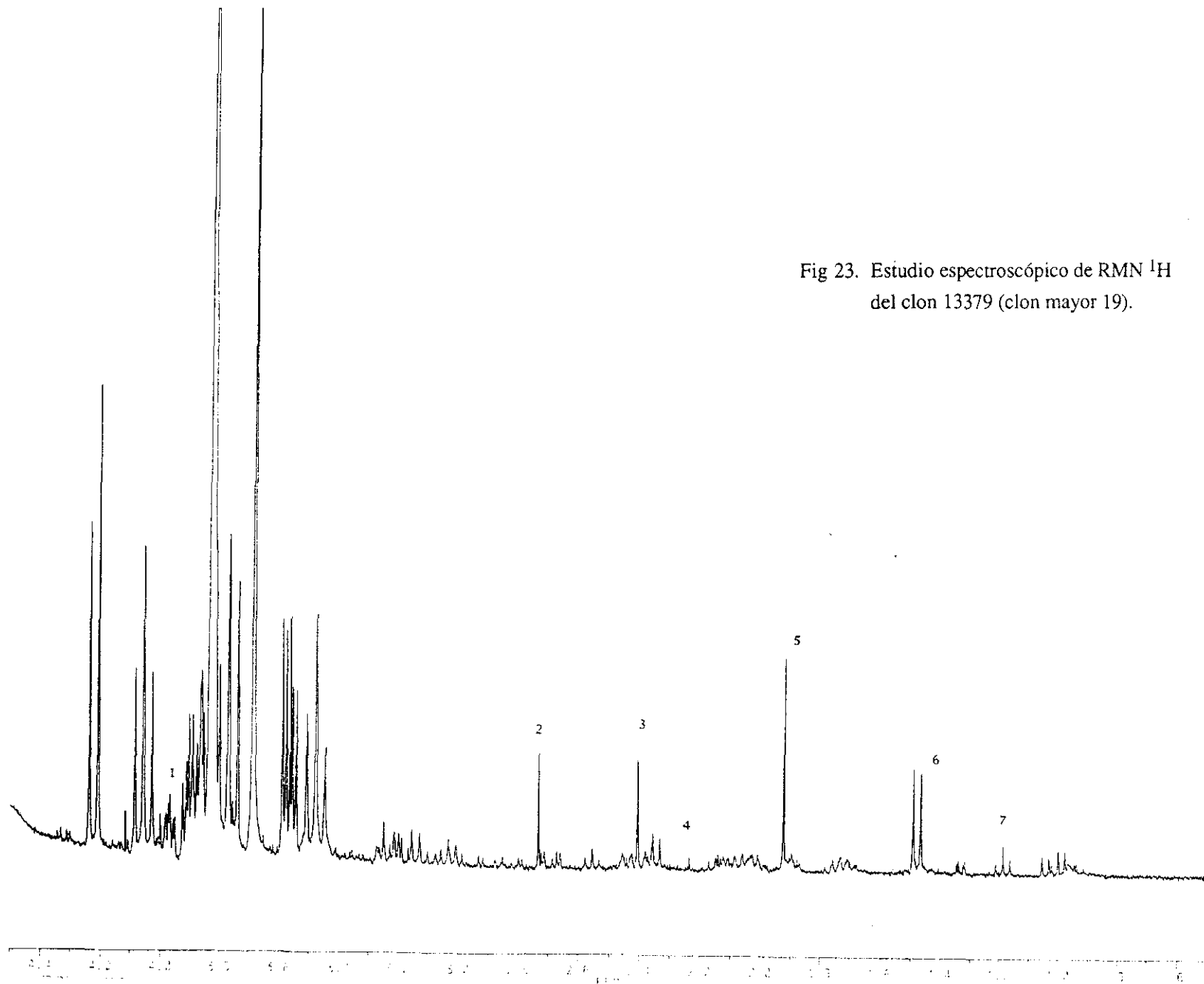


Fig 23. Estudio espectroscópico de RMN ^1H del clon 13379 (clon mayor 19).

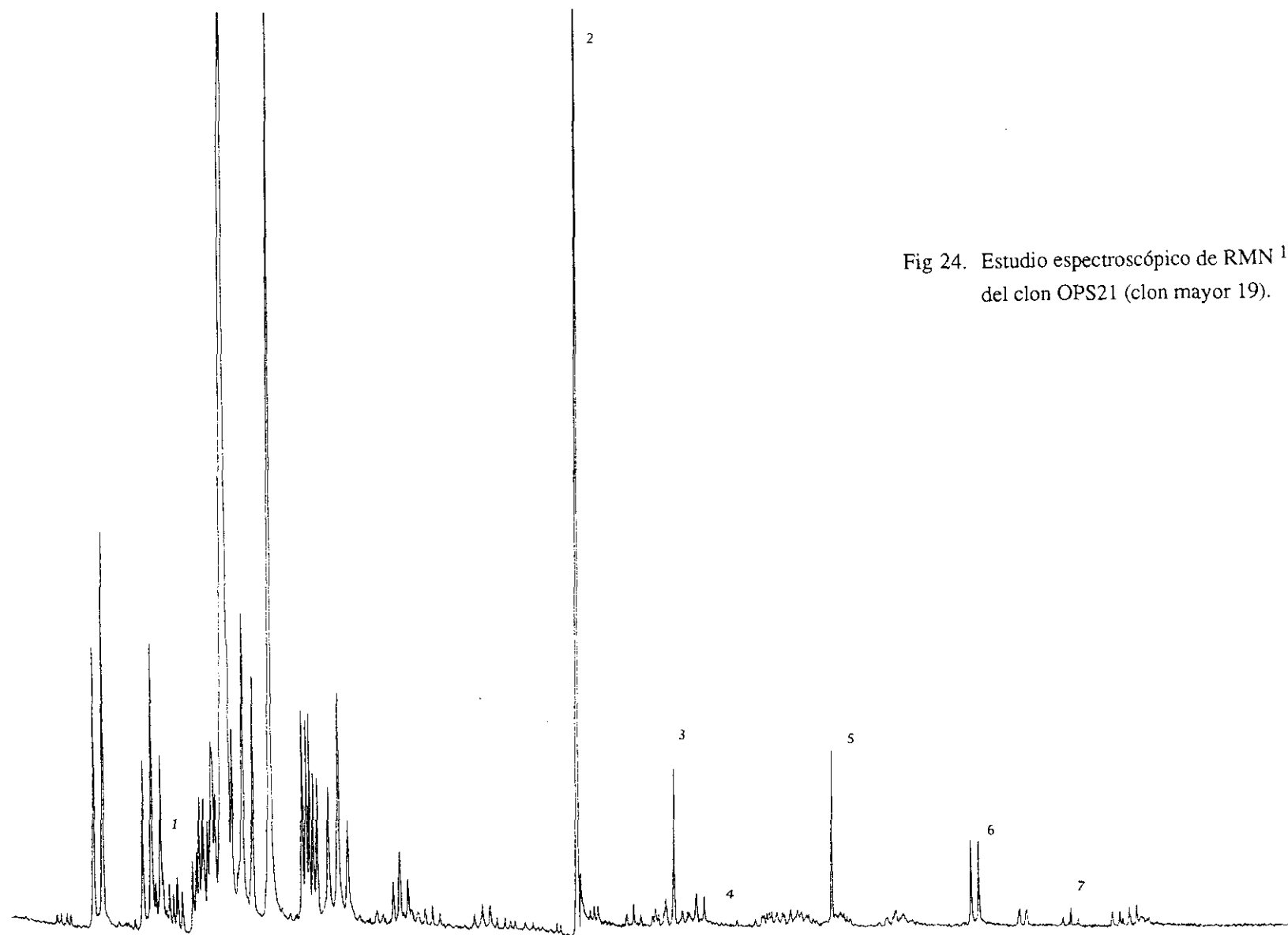


Fig 24. Estudio espectroscópico de RMN ^1H del clon OPS21 (clon mayor 19).

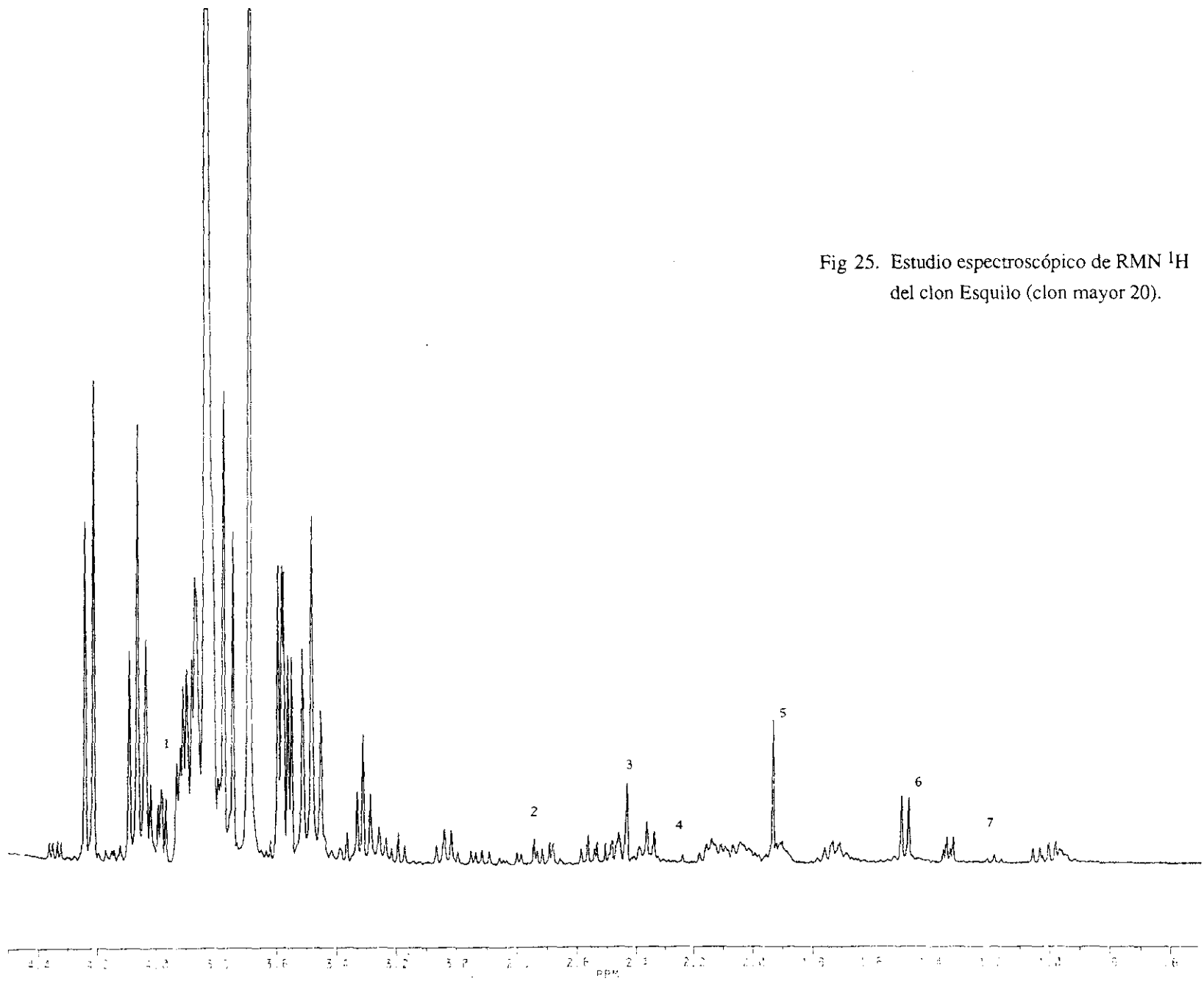


Fig 25. Estudio espectroscópico de RMN ^1H del clon Esquilo (clon mayor 20).

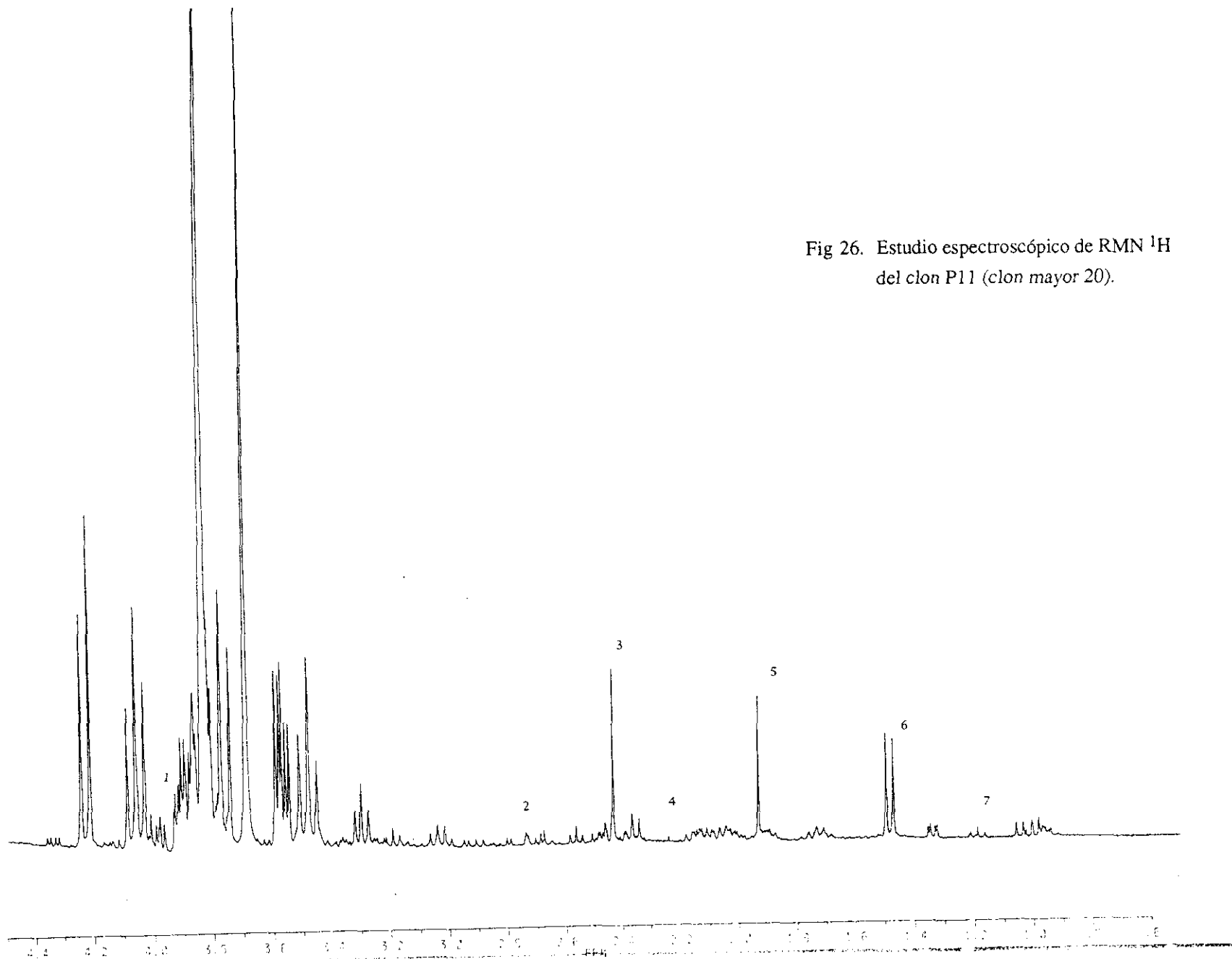


Fig 26. Estudio espectroscópico de RMN ^1H
del clon P11 (clon mayor 20).

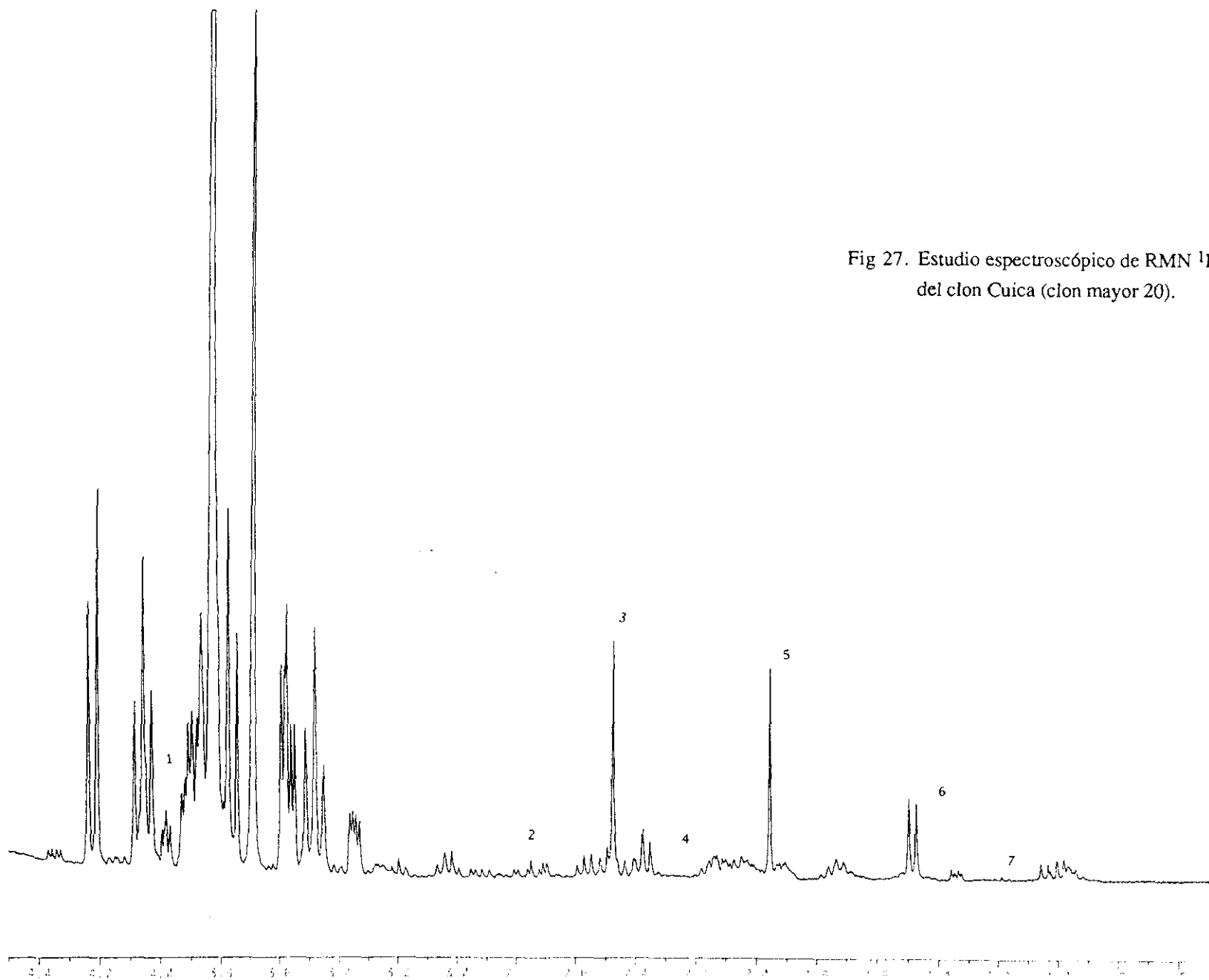
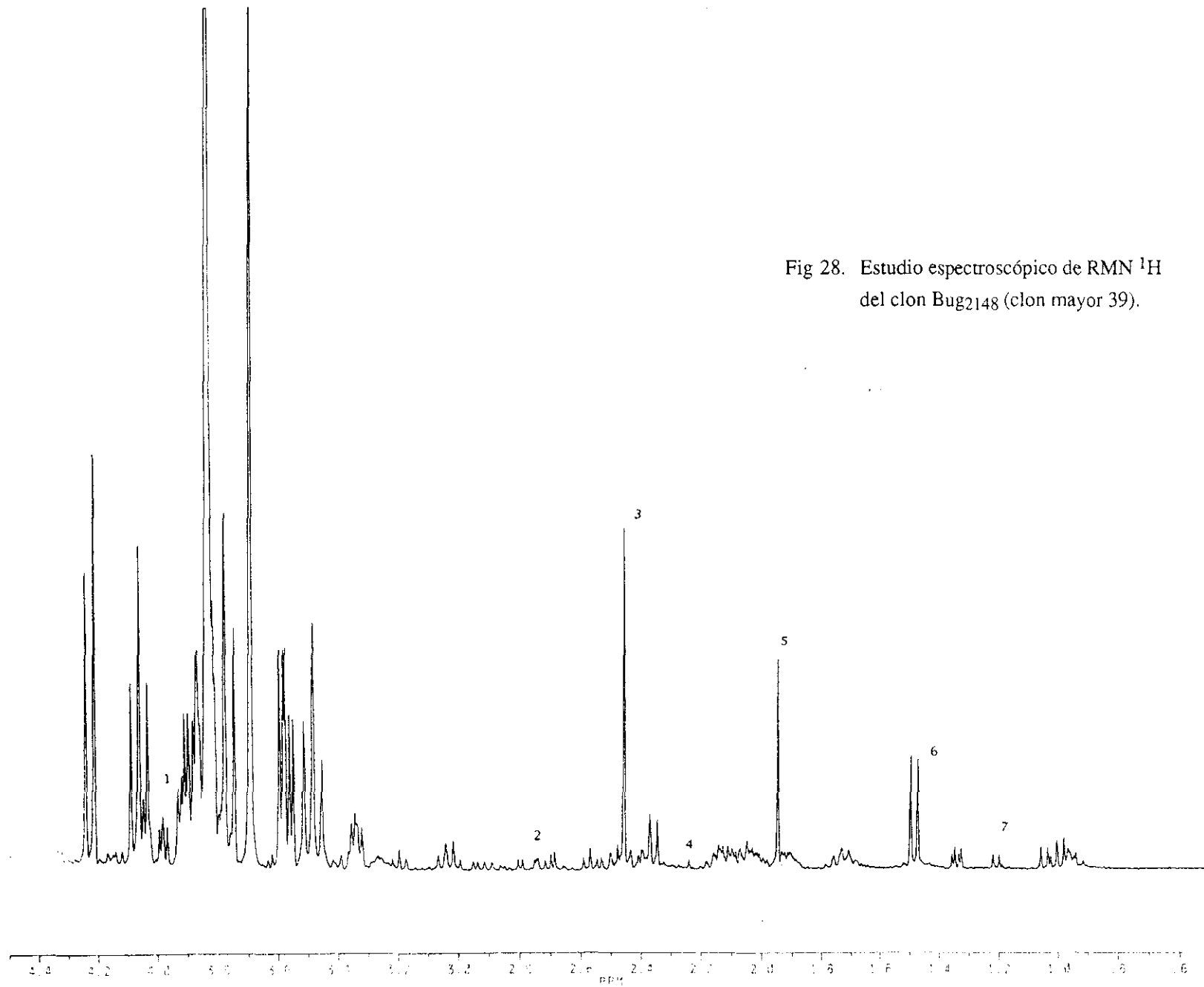


Fig 27. Estudio espectroscópico de RMN ^1H del clon Cuica (clon mayor 20).

Fig 28. Estudio espectroscópico de RMN ^1H
del clon Bug2148 (clon mayor 39).



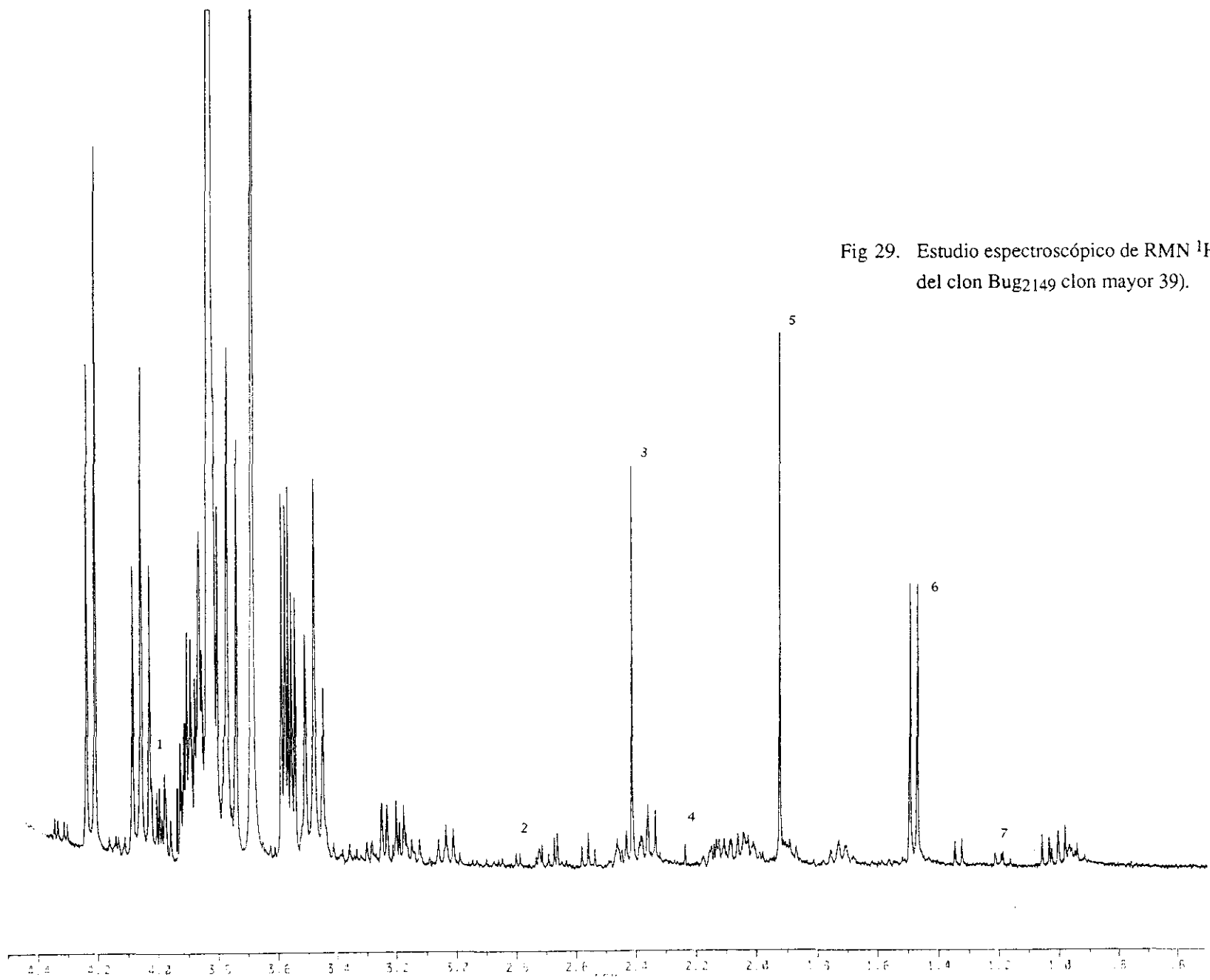
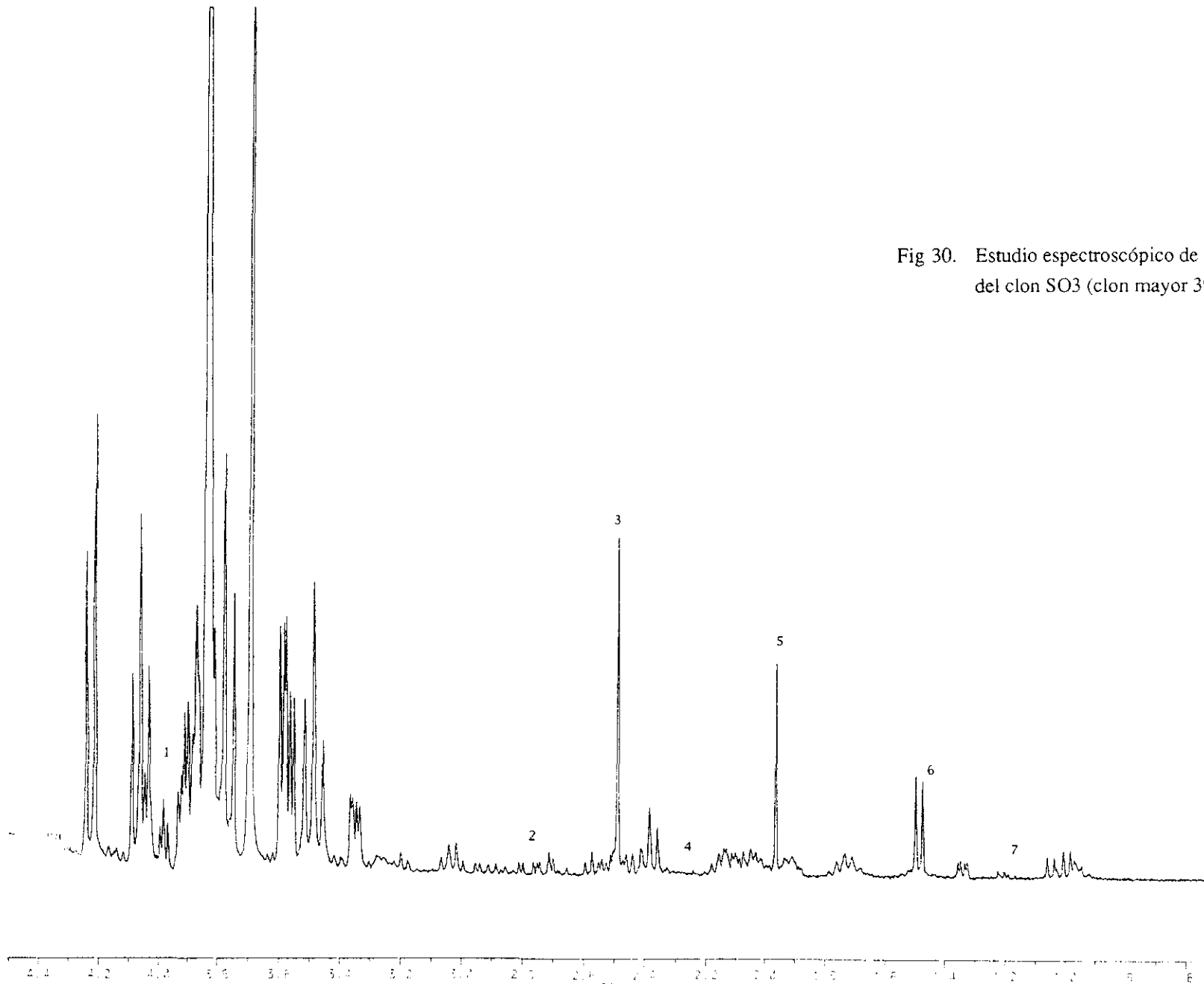


Fig 29. Estudio espectroscópico de RMN ^1H del clon Bug₂₁₄₉ clon mayor 39).

Fig 30. Estudio espectroscópico de RMN ^1H
del clon SO3 (clon mayor 39).



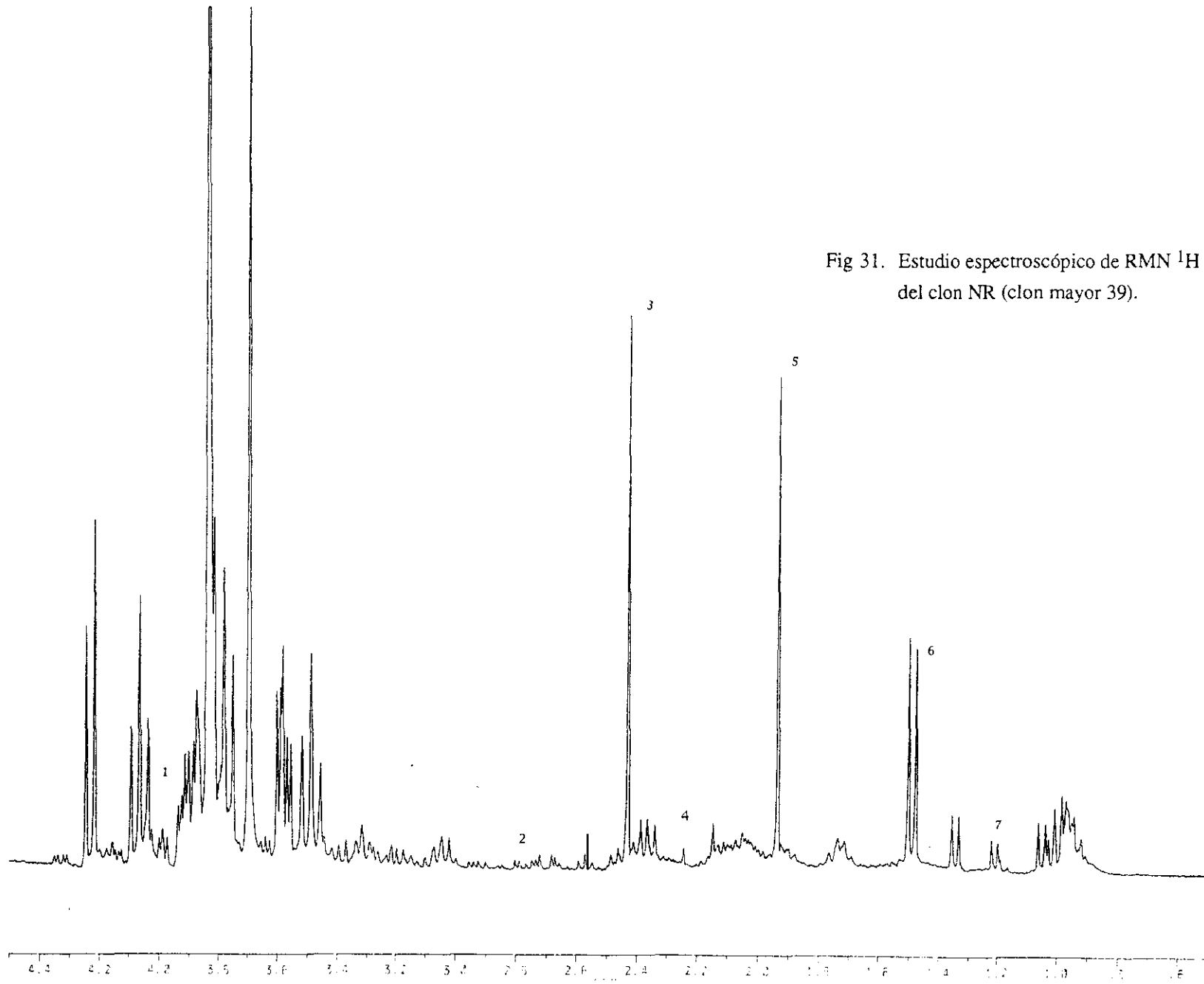


Fig 31. Estudio espectroscópico de RMN ^1H del clon NR (clon mayor 39).

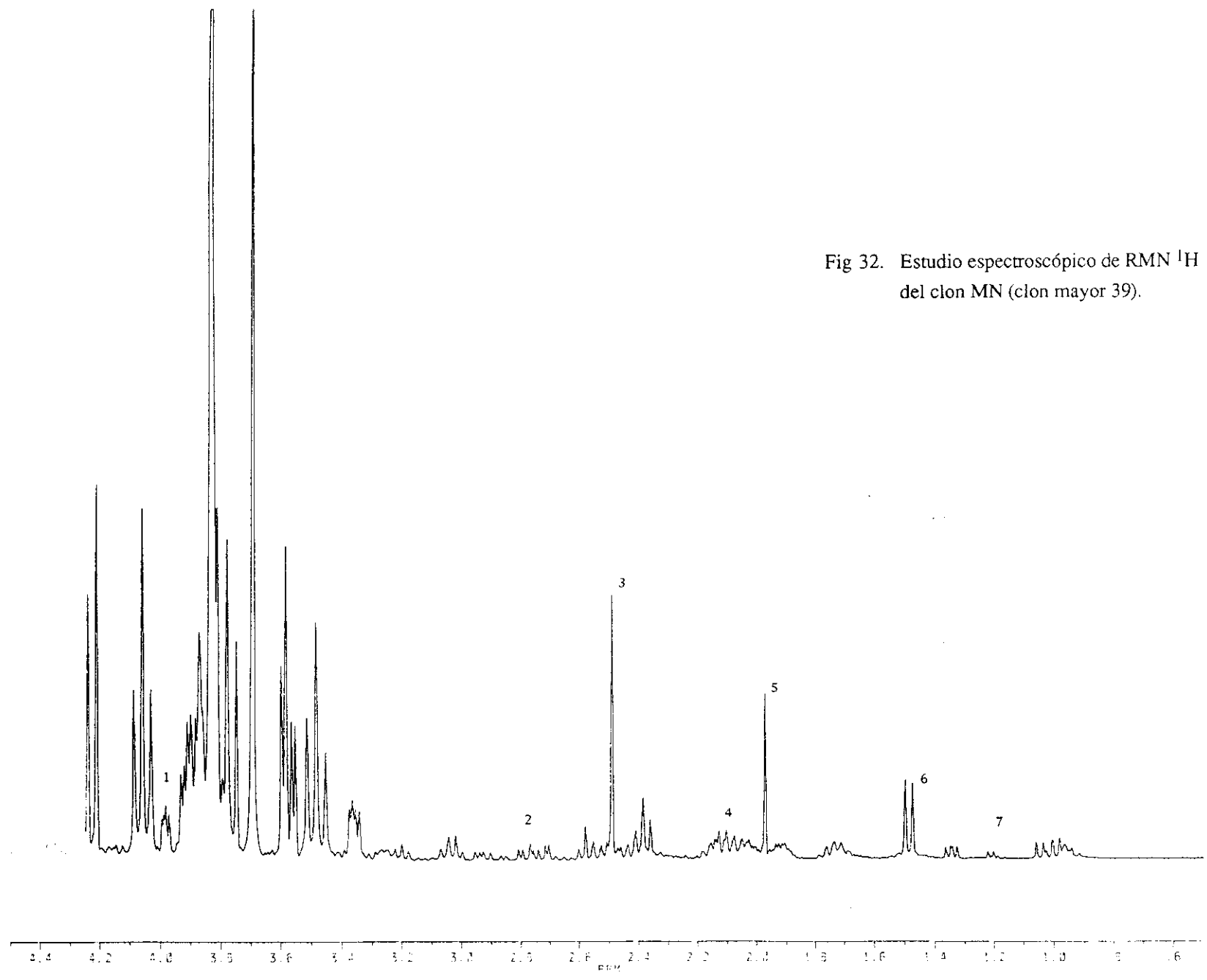


Fig 32. Estudio espectroscópico de RMN ¹H del clon MN (clon mayor 39).

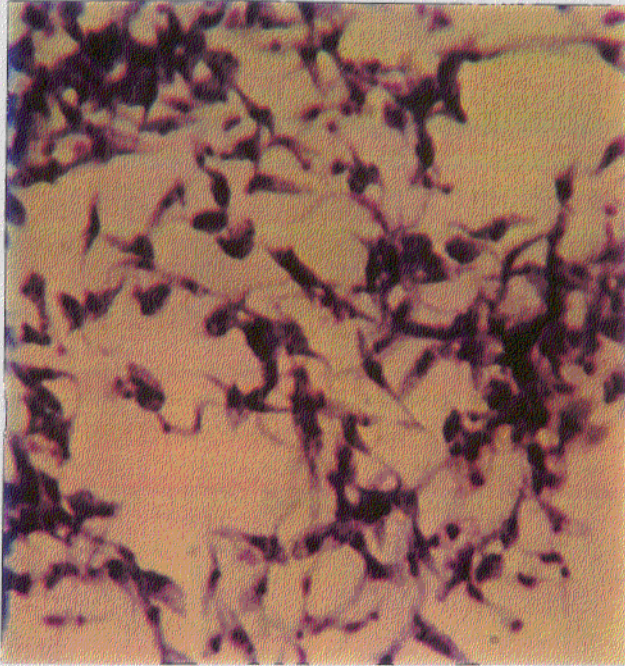


Fig. 33. *T. cruzi* Clon P11 en LIT. 20 días. Presencia de epimastigotes y tripomastigotes (x1000 Giemsa).

Fig. 34. *T. cruzi* Clon P11 en GRACE. 20 días. Presencia de epimastigotes y tripomastigotes (x1000 Giemsa).

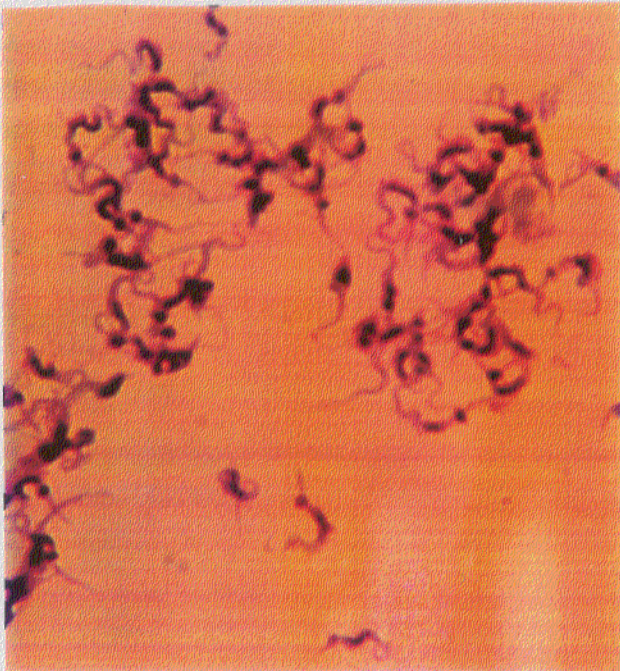
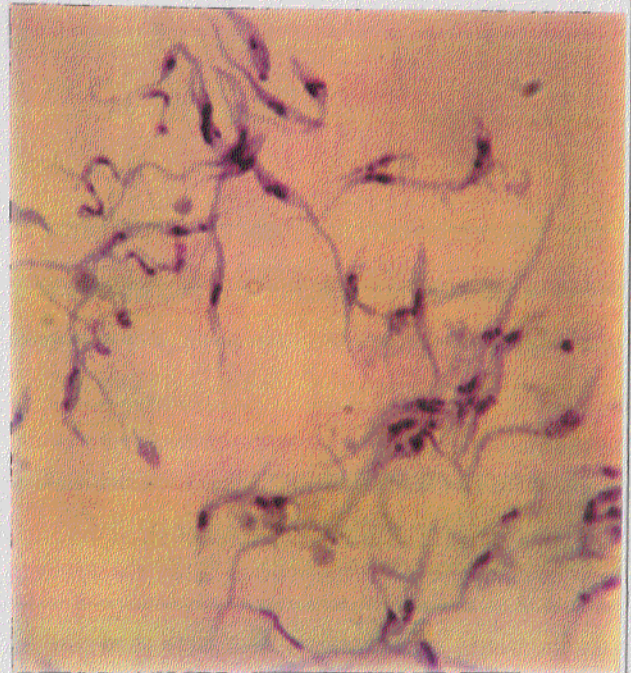


Fig. 35. *T. cruzi* Clon P11 en TAUP. Epimastigotes y mayoría de tripomastigotes. (x1000 Giemsa).

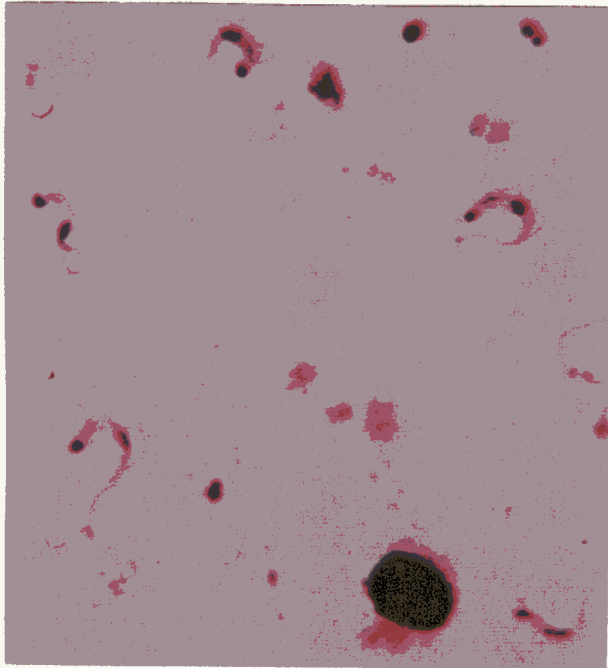


Fig. 36. *T. cruzi* Clon MN. Gota gruesa de sangre de ratón, 15 días postinfección. Presencia de tripomastigotes. (x1000 Giemsa).



Fig. 37. *T. cruzi* Clon BUG2149. Extendido de sangre de ratón, 21 días postinfección. Presencia de tripomastigotes. (x1000 Giemsa).

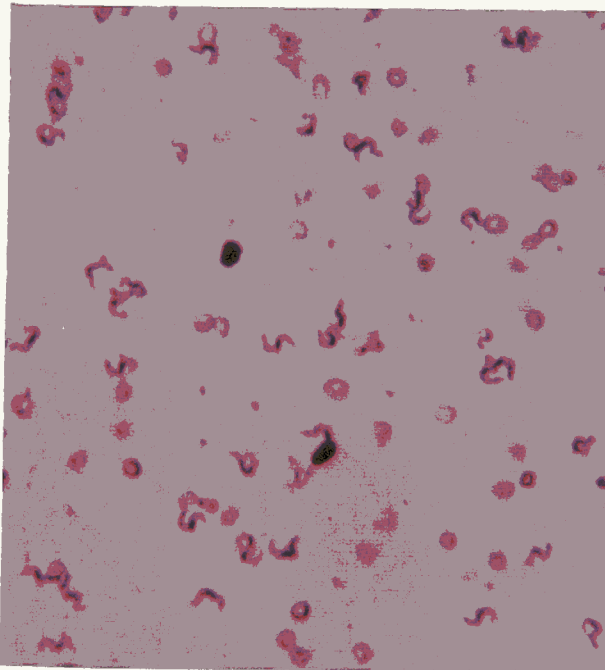


Fig. 38. Líquido ascítico de ratón infectado con *T. cruzi* Clon BUG2149, día 35. Presencia de tripomastigotes. (x400 Giemsa).

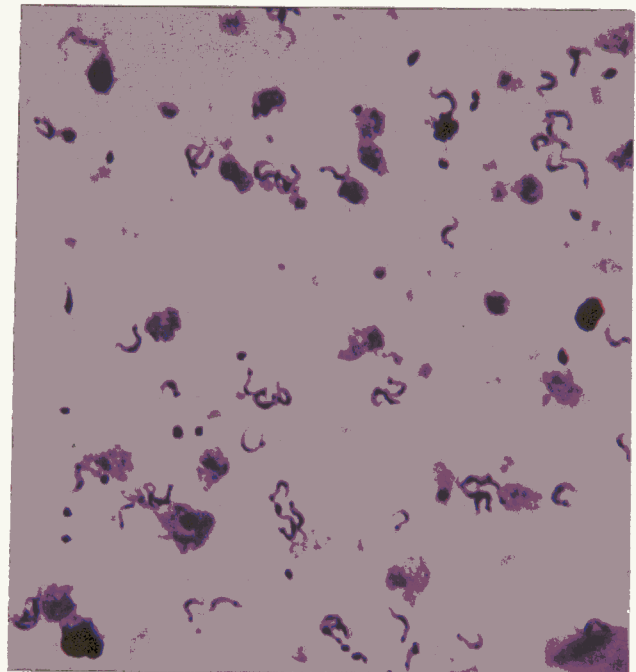


Fig. 39. *T. cruzi* Clon OPS21. Tripomastigotes provenientes de VERO, 16 días postinfección. (x400 Giemsa).

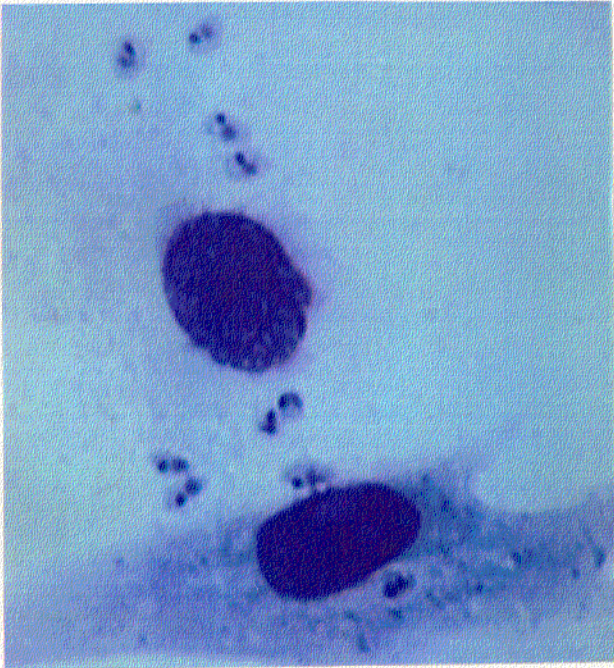


Fig. 40. Células VERO infectadas con *T. cruzi* Clon BUG2149, día 5 postinfección. Presencia de amastigotes. (x1000 Giemsa).

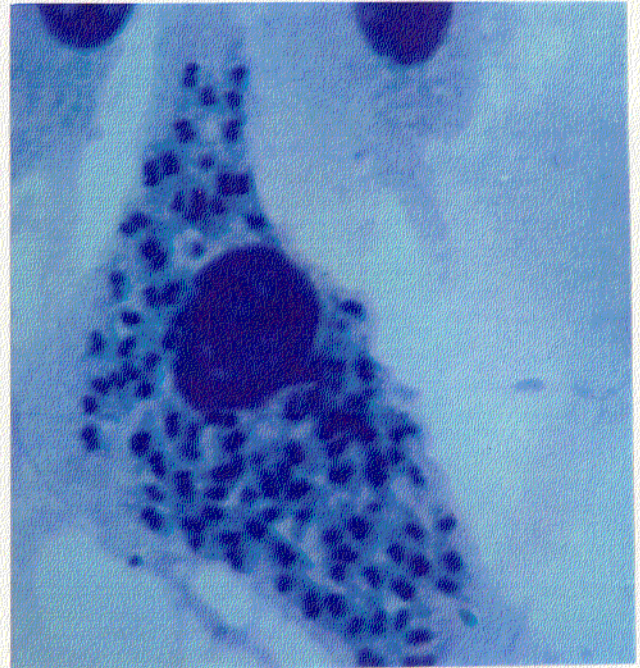


Fig. 41. Celulas VERO infectadas con *T. cruzi* Clon OPS21, día 5 postinfección. Presencia de amastigotes. (x1000 Giemsa).

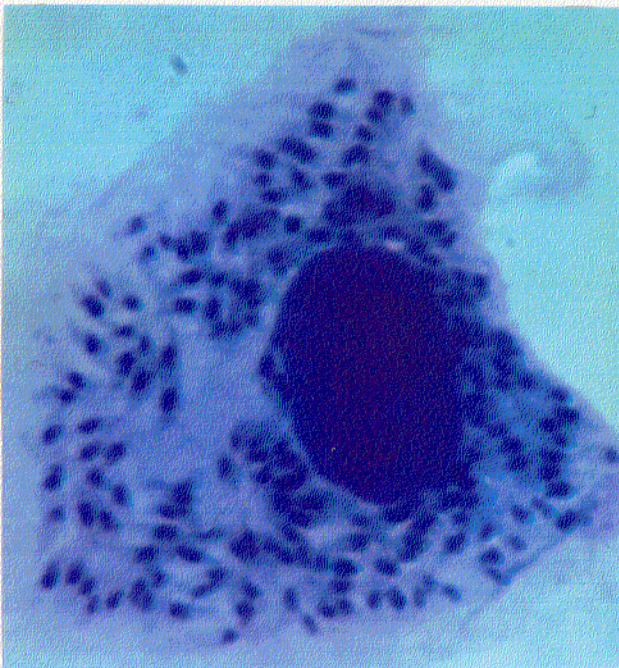


Fig. 42. Células VERO infectadas con *T. cruzi* Clon 13379, día 7 postinfección. Presencia de epimastigotes. (x1000 Giemsa).

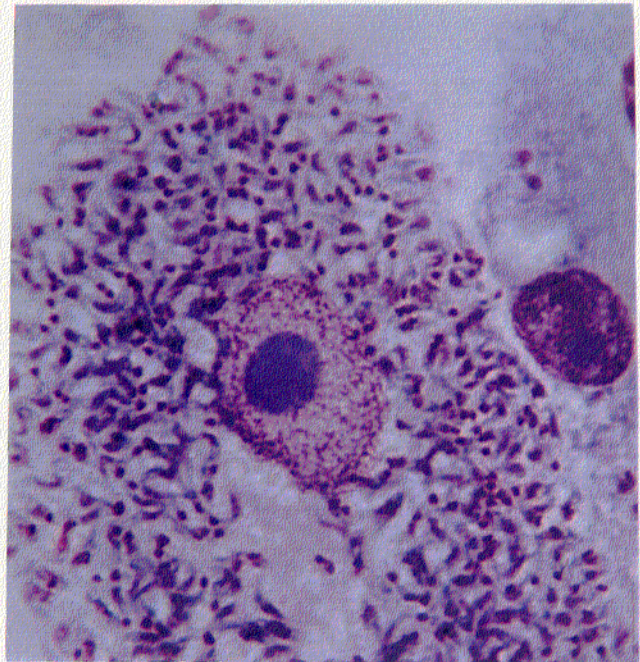


Fig. 43. Células VERO infectadas con *T. cruzi* Clon NR, día 10 postinfección. Presencia de tripomastigotes. (x1000 Giemsa).

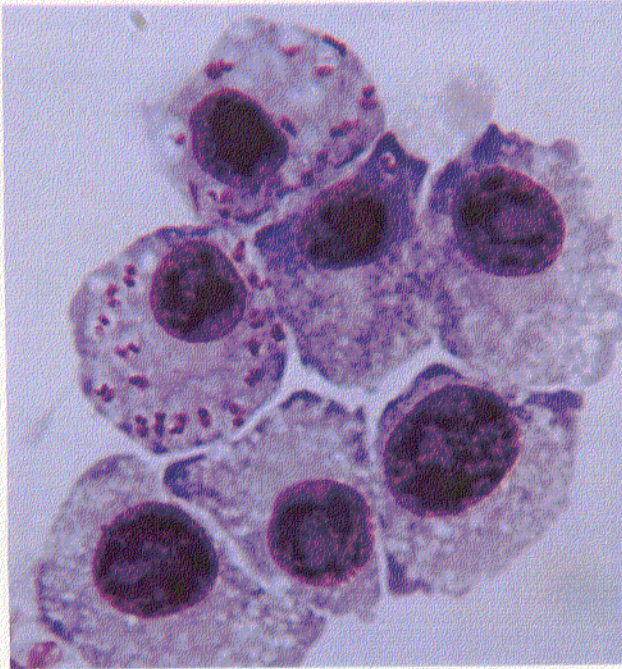


Fig. 44. Células J774 infectadas con *T. cruzi* Clon SP104, día 5 postinfección. Presencia de amastigotes. (x1000 Giemsa).

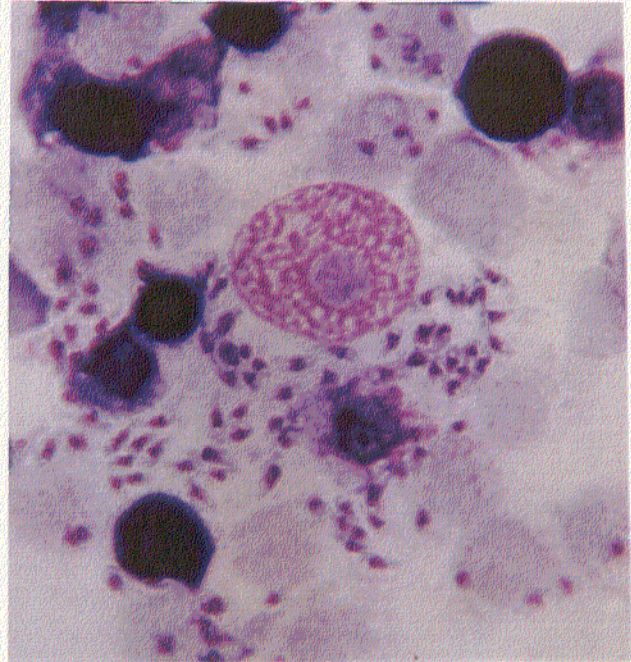


Fig. 45. Células J774 infectadas con *T. cruzi* Clon ESQUILO, día 7 postinfección. Presencia de epimastigotes. (x1000 Giemsa).

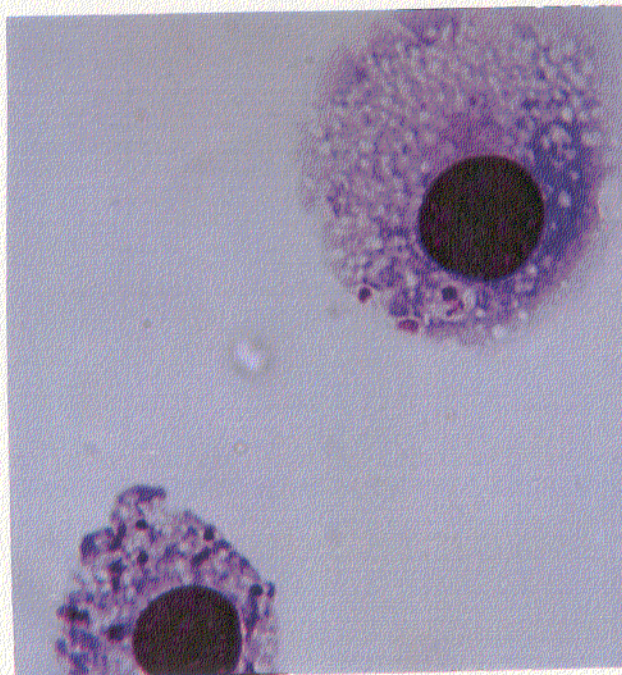


Fig. 46. Células J774 infectadas con *T. cruzi* Clon CUICA, día 5 postinfección. Presencia de amastigotes. (x1000 Giemsa).

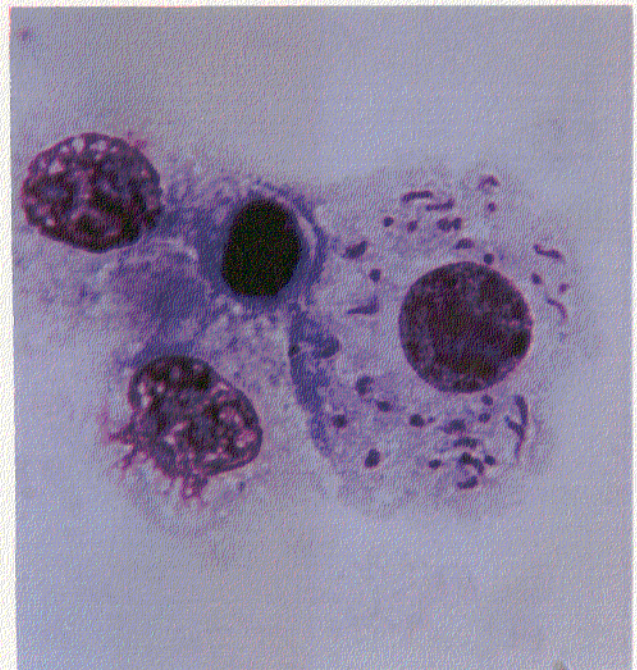


Fig. 47. Células J774 infectadas con *T. cruzi* Clon 13379, día 10 postinfección. Presencia de tripomastigotes. (x1000 Giemsa).



Fig. 48. *T. cruzi* Clon MN, 14 días postinfección. Pseudoquistes y miocarditis. (x400 H/E).

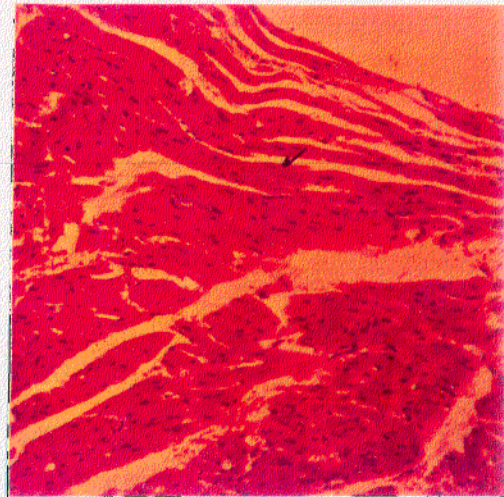


Fig. 49. *T. cruzi* Clon MN, 14 días postinfección. Miocarditis con pseudoquistes. (x100 H/E).

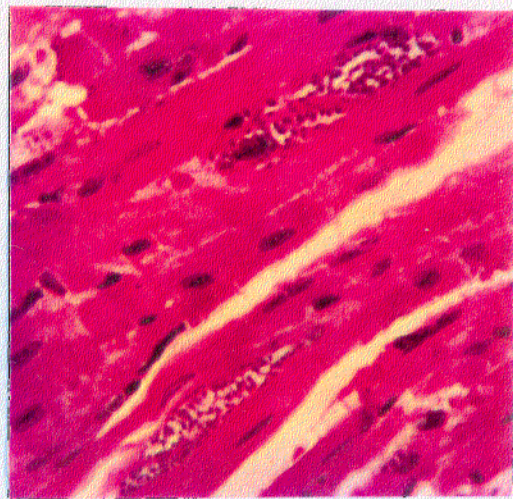


Fig. 50. *T. cruzi* Clon MN, 14 días postinfección. Miocarditis con Pseudoquistes. (x400 H/E).

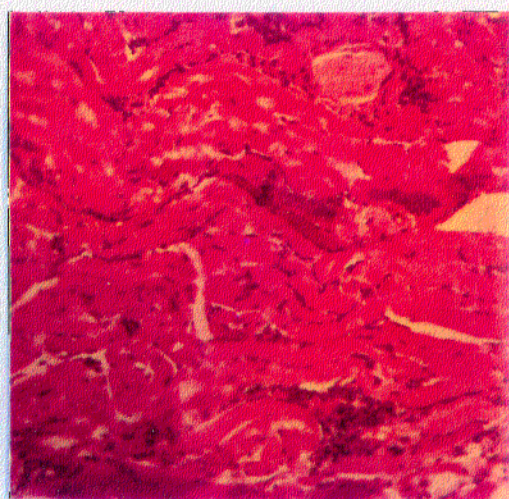


Fig. 51. *T. cruzi* Clon MN, 21 días postinfección. Miositis intensa con pseudoquistes. (x100 H/E).

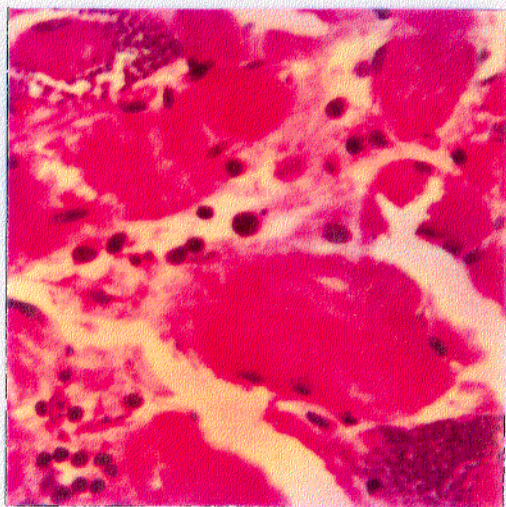


Fig. 52. *T. cruzi* Clon MN, 21 días postinfección. Miositis con presencia de pseudoquistes. (x400 H/E).

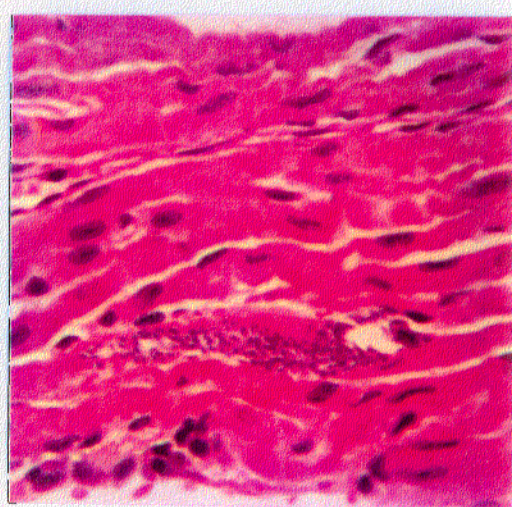


Fig. 53. *T. cruzi* Clon MN, 21 días postinfección. Miocarditis con pseudoquistes. (x400 H/E).

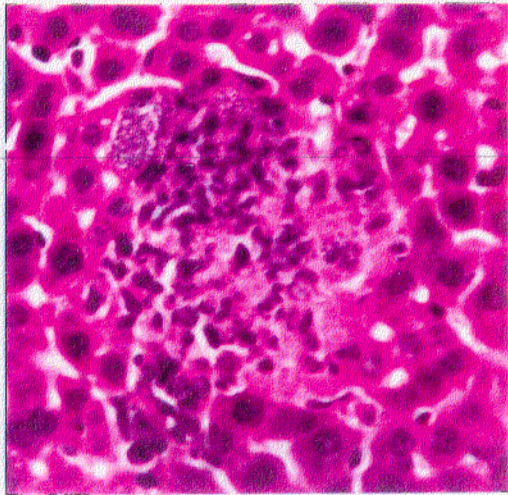


Fig. 54. *T. cruzi* Clon SO3, 28 días postinfección. Pseudoquistes en hígado. (x400 H/E).

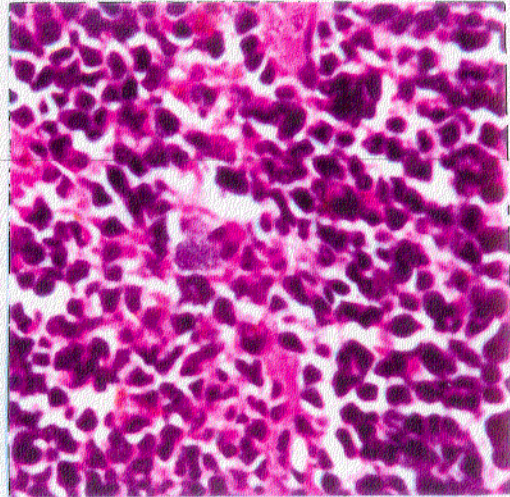


Fig. 55. *T. cruzi* Clon SO3, 28 días postinfección. Presencia de pseudoquiste en bazo. (x400 H/E).

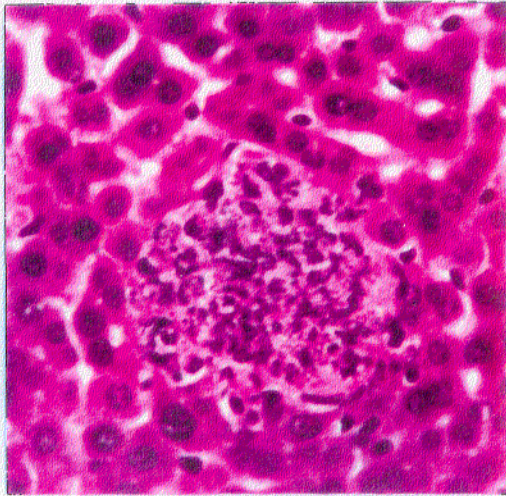


Fig. 56. *T. cruzi* Clon SO3, 28 días postinfección. Presencia de amastigotes en hígado. (x400 H/E).

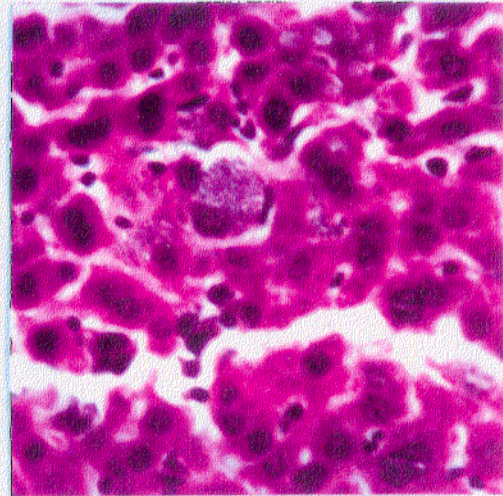


Fig. 57. *T. cruzi* Clon SO3, 28 días postinfección. Pseudoquistes en hígado. (x400 H/E).

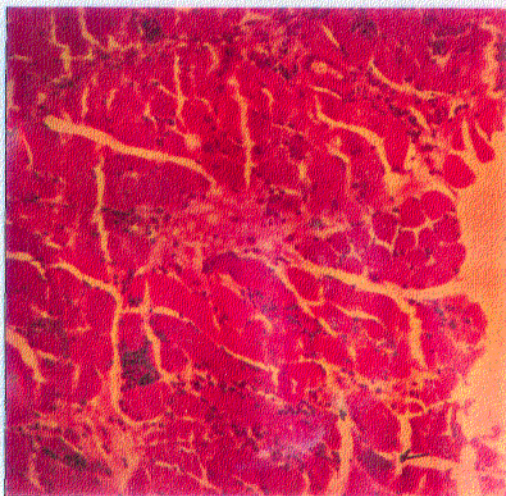


Fig. 58. *T. cruzi* Clon 13379, 56 días postinfección. Miositis severa con pseudoquiste. (x100 H/E).



Fig. 59. *T. cruzi* Clon P11, 35 días postinfección. Miositis severa con pseudoquiste. (x100 H/E).

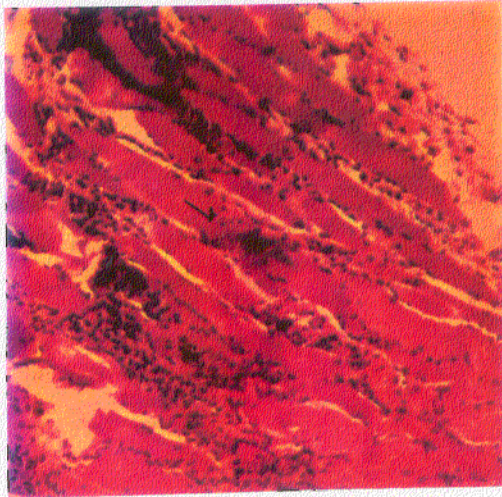


Fig. 60. *T. cruzi* Clon ESQUILO, 30 días postinfección. Miositis severa con pseudoquiste. (x100 H/E).

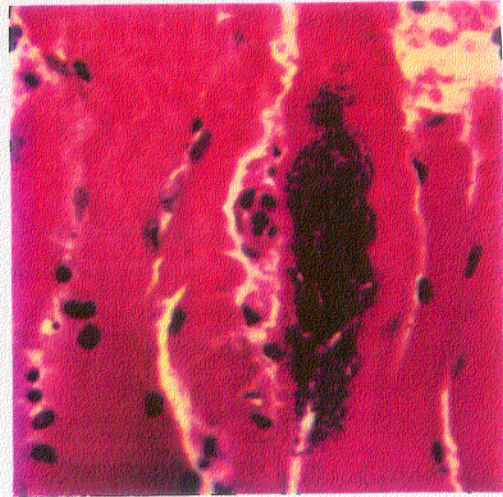


Fig. 61. *T. cruzi* Clon CUICA, 21 días postinfección. Miositis con pseudoquiste. (x400 H/E).



Fig. 62. *T. cruzi* Clon BUG 2148, 21 días postinfección. Miositis con pseudoquiste. (x400 H/E).

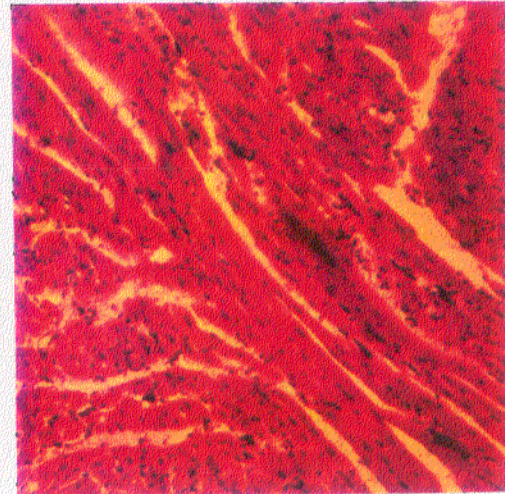


Fig. 63. *T. cruzi* Clon BUG 2148, 21 días postinfección. Miocarditis severa, pseudoquistes. (x100 H/E).

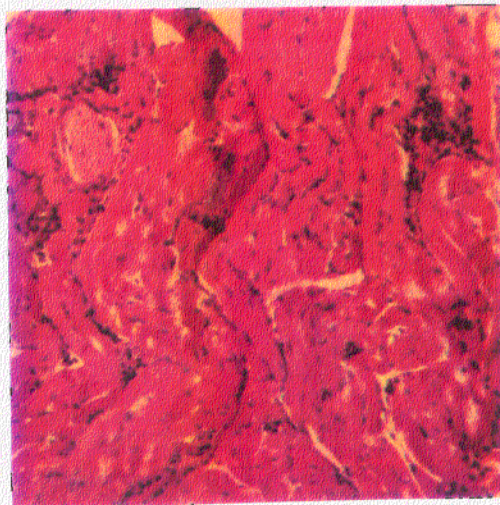


Fig. 64. *T. cruzi* Clon SP104, 35 días postinfección. Miositis severa con pseudoquistes. (x100 H/E).

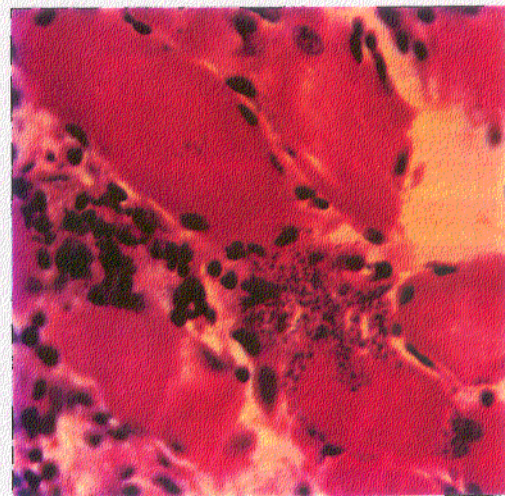


Fig. 65. *T. cruzi* Clon BUG2149, 21 días postinfección. Intenso inflamación, músculo esquelético con amastigotes (x400 H/E).

DISCUSSION

Existen algunas evidencias que apoyan la correlación entre clasificación bioquímica de cepas de *T. cruzi* y otras propiedades biológicas del parásito, tales como la tasa de crecimiento poblacional en cultivos axénicos (Dvorak J. A. et al., 1980; Katzin V. J., et al., 1983), especificidad de unión de anticuerpos monoclonales (Andrade S.G., et al., 1983; Flint J.E., et al., 1984) y propiedades patogénicas (Miles M.A., et al., 1981a).

Sin embargo de acuerdo a la teoría clonal (Tibayrenc M. y Ayala F.J., 1988), donde se describe que los aislados o cepas están constituidos por poblaciones de clones naturales, es necesario el estudio de los clones de *Trypanosoma cruzi* por separado, para dilucidar sus propiedades biológicas y médicas, ya que muchas infecciones chagásicas son causadas por mezclas de diferentes genotipos clonales del parásito lo que puede influir en el desarrollo, manifestaciones clínicas y severidad de la enfermedad de Chagas.

Una característica muy importante de *T. cruzi* es su amplia heterogeneidad con respecto a sus propiedades biológicas, bioquímicas y médicas (Dvorak J.A.,1984; Breniere S.F., et al1985; Tibayrenc M. et al.,1986). Los resultados obtenidos en esta investigación lo confirman.

En este trabajo se han utilizado diversos criterios para el análisis de las características de cada uno de los clones de *T. cruzi*, mediante el estudio del comportamiento y la capacidad de diferenciación en cultivo axénico, información sobre el metabolismo en cultivo, la capacidad de infección en cultivo celular y la evolución de la infección en un modelo experimental.

5. 1. CULTIVO AXENICO DE *Trypanosoma cruzi*

5. 1. 1. METACICLOGENESIS

De acuerdo a los resultados del estudio en cultivo axénico de la transformación de epimastigotes a formas metacíclicas, se demostró que la metaciclogénesis ocurrió en los tres medios utilizados pero con diferencias en sus porcentajes.

Son muchos los factores que estimulan o inhiben la metaciclogénesis, siendo muy importante la cepa o clon del parásito que se estudie y su comportamiento autónomo (Carne M. y Dvorak J.A.,1982), el medio de cultivo utilizado y el tiempo transcurrido lo que implica deficiencia o agotamiento de nutrientes (Camargo E.P.,1964; Contreras V.T., et al., 1985b; Gamallo C., et al., 1991)).

Se podría discutir si los porcentajes altos de transformación obtenidos en algunos clones como es el caso de P11, pueden ser consecuencia de su tasa elevada de crecimiento poblacional y un menor porcentaje de transformación en cultivos con baja tasa de multiplicación celular, como es el caso de CUTIA.

El número poblacional en este caso no parece ser un parámetro sólido para relacionar con la ocurrencia de la diferenciación en estos clones, porque el crecimiento fué similar para todos y el porcentaje de formas metacíclicas se calculó en un número definido total de parásitos tomados al azar y para todos los clones el mismo, tuvieran un abundante o pobre crecimiento poblacional.

Sin embargo la demanda de nutrientes en una población abundante, implica su consumo más rápido y por lo tanto podría ocurrir una diferenciación más temprana como fué el caso para el clon P11, donde su fase exponencial en medio TAUP se alcanzó en los primeros cinco días.

Estando de acuerdo lo anterior con los resultados de Brener Z.,1973 en los cuales informa que hay escasa transformación durante la fase de crecimiento exponencial. En el momento que se agotan los nutrientes disponibles y se acumulan metabolitos, se observa la aparición de las formas metacíclicas (Camargo E.P.,1964).

Se supone que no sólo el agotamiento de nutrientes por alta concentración poblacional induce la diferenciación, entonces probablemente existen otras condiciones que influyen y los menores porcentajes alcanzados de metaciclogénesis, están asociados a diferencias particulares en los requerimientos metabólicos para cada clon y a otros factores importantes de selección, como por ejemplo expresiones génicas involucradas en el metabolismo del AMP.

Recordemos que el medio de cultivo TAUP está compuesto por factores artificiales de orina del triatomino (TAU), suplementado con fosfatos y suero fetal bovino.

El medio TAU sin suplementos, copia las condiciones naturales dentro del insecto vector, donde ocurre usualmente la transformación en el ciclo biológico de *T. cruzi*.

En este medio de cultivo TAU la diferenciación no está acompañada de multiplicación (Krassner S.M. et al., 1990).

Sin embargo en el medio TAUP se observa replicación del parásito aunque más escasa comparativamente con los medios LIT y GRACE los cuales son más enriquecidos.

En el medio GRACE la diferenciación metacíclica es baja (Burgos M.H., et al., 1989), sin embargo al ser suplementado con Glutamina y Glucosa ocurre mayor transformación como aconteció para estos clones del parásito.

Es de suponer que se dá una presión selectiva *in vitro*, que dispara los mecanismos de diferenciación, algunos de estos mecanismos son ya conocidos y han sido mencionados anteriormente en la introducción.

También se podría asumir que los factores requeridos para la supervivencia del parásito, deben ser menos estrictos y específicos que los necesarios para la transformación (Krassner S. M. et al., 1990).

Se esperaría que un porcentaje alto de transformación del parásito, lo que implica mayor número de formas metacíclicas, conduzca a un mayor éxito de infectar a su hospedador y a su vez baja transformación pocas probabilidades de infección.

Sin embargo no siempre ocurre así, ya que en observaciones descritas por Sánchez G .A., 1992, la cepa Tulahuen de *T. cruzi* con diferenciación del 10%, presentó los mayores niveles de parasitemia y mortalidad en ratones.

Se podría pensar que la relación entre el porcentaje de diferenciación y la infectividad obtenida, no sea necesariamente una causa-efecto y que otras características del parásito fuesen más importantes.

Para algunos autores (Tanuri A. et al., 1985), la infectividad de las poblaciones de *T. cruzi* parece depender del origen de los clones de una cepa, más que de sus tasas de diferenciación.

El mayor porcentaje de diferenciación obtenido para los clones 39 superó el 40%, sin embargo su infectividad en ratón para la estabilización, no fué como se esperaba.

Por ejemplo los clones BUG2148 y BUG2149 necesitaron varios intentos para lograr la primera positivización de ratones a partir del cultivo axénico, lo que lleva a pensar que aunque se encuentren las formas metacíclicas, éstas deben carecer de alguna propiedad que las hace infectivas.

En el caso de los clones MN, SO3 y NR infectaron al ratón con períodos de prepatencia levemente menores.

En estos clones no se encontró relación directa entre diferenciación e infectividad asociada con la característica de compartir un mismo perfil isoenzimático.

Los parásitos mantenidos en cultivo por largos períodos de tiempo, tienden a la pérdida o atenuación de su virulencia, dependiendo de la cepa (Pizzi T.,1961; Bice D.E. y Zeledon R.,1970; Brener Z.,1973; Leguizamón M.S., et al., 1993).

Probablemente la pérdida de infectividad va relacionada con una paulatina disminución hasta darse ninguna transformación a formas metacíclicas, como un fenómeno de adaptación selectivo, esto pérdida de transformación se pudo observar claramente en la cepa Tulahuen de *T. cruzi*, la cual estuvo por largo tiempo en cultivo axénico (observación personal, no tema de tesis).

El clon CUTIA presentó el menor porcentaje de transformación y su crecimiento poblacional también fue escaso, sería necesario dilucidar mediante otros estudios cualitativos, cuál podría ser la razón de su comportamiento. Es probable que este clon esté muy adaptado a las condiciones de cultivo.

5. 1. 2. RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE PROTONES

La doble capacidad de *T. cruzi* de utilizar tanto azúcares como aminoácidos es probablemente de gran valor en su adaptación y colonización a diferentes hospedadores; indiscutible ventaja si se tiene en cuenta que estos organismos carecen de un sistema convencional de almacenamiento de carbohidratos (Vickerman K.,1994).

Para la identificación de los principales metabolitos que son excretados al medio de cultivo se ha utilizado la espectroscopía de RMN H^1 , técnica que viene siendo aplicada en los últimos años al estudio del metabolismo de los protozoos parásitos (Thompson S. N., 1991).

La producción de acetato como uno de los metabolitos mayoritarios, puede deberse al hecho de que en algunas de las formas del ciclo de vida de los géneros de la familia *Trypanosomatidae* la mitocondria no parece ser totalmente funcional, lo que llevaría a una incapacidad para reoxidar dicho metabolito (Oppenoes F. R.,1987 y Sánchez-M M., et al., 1992).

Probablemente debe estar relacionado con el catabolismo aeróbico a partir del exceso de Acetil CoA. En el caso de *T. cruzi* posiblemente se produce por el catabolismo de aminoácidos y no de la glucosa (Cazzulo J.J., et al., 1988).

El acetato fue un metabolito mayoritario para todos los clones.

El succinato es un producto universal del catabolismo de la glucosa, usualmente acompañado por al menos otro producto (Cazzulo J. J. 1992) aparentemente puede ser producido por la glucólisis del fosfoenolpiruvato que es carboxilado a oxalacetato, el cual puede ser reducido a succinato (Urbina J.A., et al., 1993).

El piruvato no siempre se produce en las diferentes poblaciones de *T. cruzi* (Cannata J.J. y Cazzulo J.J., 1984 y Sánchez-M M., et al., 1995).

La producción puede ser explicada por el hecho de que algunos miembros de la familia *Trypanosomatidae* no poseen lactato deshidrogenasa (Mukkada A. J., 1985), enzima responsable de la reoxidación de NADH durante la glicólisis.

Esta ausencia es compensada por la conversión de glicerofosfato a glicerol mediante la reversión de la reacción de la glicerol-kinasa (Oppenoes F. R., 1987).

En los resultados obtenidos con estos clones, se reportan trazas de este metabolito.

El etanol es uno de los metabolitos mayoritarios detectados en algunos aislados de *T. cruzi* (Sánchez-M M., et al., 1995) lo que supone que la excreción de este producto de fermentación, es probablemente el resultado de un metabolismo anaeróbico parcial o de la incapacidad del ciclo de la glicerolfosfato oxidasa para actuar sobre todos los equivalente reducidos que se producen en la glicólisis de tales aislados.

Es importante destacar que en los clones del presente estudio fué mínima la producción de este metabolito.

De acuerdo a Frydman B., et al., 1990, la disminución en la producción de L-alanina, acompañada del incremento en la producción del succinato, en presencia de NaHCO_3 , ha sido encontrado en poblaciones de *T. cruzi*.

Este evento ocurrió en todos los clones del estudio.

Las diferencias tanto cualitativas como cuantitativas observadas entre los diferentes clones estudiados, nos indican un delicado balance y cambios en las estrategias metabólicas para la degradación de substratos energéticos (glucosa o aminoácidos).

Las características metabólicas del parásito comparativamente con las células del hospedador mamífero, puede permitir abordar el desarrollo de nuevas drogas efectivas, mediante inhibiciones selectivas.

5.2. INFECCION CELULAR IN VITRO CON *T. cruzi*

En la actualidad se tiene conocimiento que el parásito *T. cruzi* invade una variedad de células de mamíferos por interacciones ligando receptores. Se han postulado dos proteínas uniendo carbohidratos, la neuraminidasa/transialidasa y la penetrina como importantes en el proceso de la interiorización del parásito en células de mamífero (Ortega-B E. y Pereira M.E., 1992).

De acuerdo a los resultados de infección con los clones, se determina un mayor índice de infección en las células VERO que en los macrófagos.

A su vez los macrófagos de la línea J774 presentan una tasa de multiplicación celular mayor que las células VERO, de acuerdo a los recuentos de células en saturación de monocapa y también el índice de infección en macrófagos fué menor que en VERO.

Esto podría estar de acuerdo con la aseveración de los investigadores Dvorak J.A. y Crane M.S. 1981 y Osuna A. et al., 1984, quienes dicen que el éxito de la infección de las células de mamíferos, parece que depende de la fase del ciclo celular, lo que sugiere probables alteraciones en las moléculas de superficie relacionadas con el ciclo celular y que pueden estar involucradas en los procesos de invasión.

Observaciones de experimentos adicionales utilizando macrófagos irradiados, efectivamente confirman que los macrófagos J774 aumentan su índice de infección cuando no se dividen.

Ambas líneas celulares utilizadas para la infección con los diferentes clones, resultaron ser muy apropiadas para demostrar que el parásito *T. cruzi* infecta tanto a células fagocíticas como aquellas que no lo son. Comprobándose que la interiorización del parásito en la célula es un evento que compromete activamente al parásito, además se pudo observar que la infección en macrófagos resultó menos exitosa.

El tiempo de duración del ciclo intracelular en las infecciones in vitro para estos clones y en las condiciones utilizadas, fué mayor que otros reportados, ésto está de acuerdo con Engel J.C., et al., 1985, quien dice que la tasa de replicación intracelular varía en *Trypanosoma cruzi* dependiendo de los clones y cepas, por tanto el ciclo intracelular puede tener diferente duración.

Debido a que este estudio fué cuantitativo, se enfatiza el índice de infección en los dos momentos elegidos del ciclo intracelular, sin embargo las observaciones directas permitieron la visualización de todas las formas del parásito y los cambios celulares aparentes que se van sucediendo a lo largo del desarrollo de la infección.

Las células parasitadas, al parecer no sufren daño, incluso continúan su multiplicación hasta el momento en que se lisan liberando los parásitos. Estas observaciones son respaldadas por el trabajo de Brener Z. 1973, quien de igual manera no observó aparentes daños celulares.

No todos los amastigotes se desarrollan hasta tripomastigotes dentro de la célula y al parecer cerca del 25% se degeneran (Brener Z.,1973).

Esto explicaría que al día 10 de infección los tripomastigotes no sean tantos como se hubiese esperado, con relación a los amastigotes cuantificados en el día 5.

Se pudo observar las formas de transformación intermedias como epimastigotes dentro de la célula, como ha sido reportado por Da-Silva L.H. 1959.

Se ha demostrado que la línea J774 es deficiente en la producción de metabolitos intermedios de oxígeno después de la fagocitosis (Ralp P., et al., 1975). Esta característica permite los estudios de infección celular en una línea con cualidades propias de macrófagos.

Por otra parte, se ha encontrado que un alto índice de infección en macrófagos por *T. cruzi* está asociado con baja producción de óxido nítrico. Resultados de Plasman N., et al., 1994 demuestran claras diferencias en el curso de la infección de *T. cruzi* en relación al estado de maduración de los macrófagos.

Las características de macrófagos y de la línea J774 que se comporta como tal, documentan información que respalda los hallazgos en el presente trabajo, con relación a las diferencias encontradas de menor índice de infección en los macrófagos que en las células VERO.

Recordando además que J774 produce baja cantidad de óxido nítrico (Kuhn R.,1993), pero puede ser suficiente para inhibir el establecimiento de la infección tan exitosamente como ocurre en las células VERO, además los macrófagos tienen características propias para actuar sobre los microorganismos.

Comparando los resultados del índice de infección de todos los clones en el día 10, vemos que en células VERO se obtuvo más del 50% de células infectadas, con un máximo del 84%.

En el caso de los macrófagos la infección fué mayor del 30% con un máximo del 67%.

Como observación interesante, algunos clones presentaron un porcentaje alto de infección, sin embargo el número promedio de parásitos dentro de la célula fué escaso, por ejemplo en células VERO con el clon SO3.

A la inversa también ocurrió, como fué el caso del clon BUG2148 en VERO al día 10 de la infección.

Recordando que las células fueron infectadas con parásitos de cultivo axénico, tomados en el momento de máxima diferenciación, en estos dos casos correspondieron al 72% y 75% respectivamente, se demuestra que aunque estos clones son infectivos, y ambos comparten el mismo perfil isoenzimático, su comportamiento intracelular es diferente en el mismo tipo de célula VERO o macrófagos.

5.3. ADAPTACION DE LOS CLONES DE *T. cruzi* EN RATON

La dificultad mayor que se tuvo en este trabajo para adaptar y estabilizar los diferentes clones, dependió en parte del tiempo que los parásitos estuvieron en cultivo previamente y también como en todos los demás experimentos, de las características individuales de cada clon.

Para lo sucedido con el clon CUTIA, no se tiene claridad de la razón por la cual no infectó células ni ratones, y en la única vez que se positivizó un ratón, su parasitemia fué mínima negativizándose en corto tiempo. Lo que significa que la respuesta del hospedador fué suficiente para superar la infección.

Es probable que este clon sea poco infectivo por naturaleza o que hubiese perdido su infectividad por una adaptación selectiva a permanecer en cultivo.

La relación entre diferenciación e infectividad parece ser menos relevante que el efecto de otras características del parásito sobre el proceso de infección.

La capacidad infectiva de los parásitos ha sido correlacionada con la presencia de antígenos de superficie capaces de adherirse a la membrana de la célula hospedadora (Zingales B. et al., 1982).

Esto podría estar en relación con la dificultad de predecir en que momento las formas metacíclicas estarían aptas para causar la infección y por ende explicaría en parte lo sucedido en la adaptación del parásito a ratón, para los diferentes clones.

Al parecer es necesario para la infectividad, que el cambio morfológico esté acompañado de cambios metabólicos y antigénicos (Tanuri A. et al., 1985).

En los resultados de pruebas adicionales con los clones BUG2148 y BUG2149, en las cuales se inocularon tres ratones respectivamente, con formas tripomastigotas provenientes de células VERO infectadas, se observó que éstas infectaron los ratones de manera más rápida y con mayor parasitemia que lo acontecido con los inóculos de metacíclicas de cultivo axénico.

Este hallazgo está en desacuerdo con los estudios de Urdaneta-M S 1983, donde se enuncia la escasa infectividad de metacíclicas provenientes de cultivo celular, probablemente la diferencia con sus hallazgos radica en que aquí se trata de clones y no cepas como en su estudio.

En una reciente investigación aún no publicada de Zúñiga C. et al., 1996, se confirma el poder de infectividad en ratón de los tripomastigotes de la cepa *T. rangeli*, provenientes de células infectadas in vitro, además estos tripomastigotes manifiestan otras características de comportamiento muy interesante, reflejado en su virulencia y hallazgos histopatológicos relacionados también con la edad de los ratones infectados.

En otros estudios Brener Z. 1973 y De Souza 1984 han revelado en sus respectivos trabajos, que los tripomastigotes obtenidos de sangre, cultivo celular y cultivo axénico son infectivos. Además otros trabajos reportan que amastigotes derivados de células infectadas pueden infectar y multiplicarse dentro de células de mamífero (Ley V., et al., 1988; Umezawa E.S., 1985).

Mediante experimentos con clones de cepa Y de *T. cruzi*, Alves A.M. et al., 1993, tratan de averiguar si los diferentes zimodemas se correlacionan con características del comportamiento del parásito, determinando los niveles de infectividad de los clones y subclones de *T. cruzi*.

Esta variación de zimodemas encontrada dentro de clones, suele ser reversible y está asociada con infectividad al ratón.

Se ha encontrado variación en los perfiles isoenzimáticos acompañada de cambios en la infectividad y virulencia, además están asociados con la ocurrencia de diferencias cuantitativas en el contenido total de ADN y contenido de las bases G-C y A-T entre tripomastigotes y epimastigotes de clones de *T. cruzi* (Nozaki y Dvorak J.A.,1993).

En la actualidad se sabe que las poblaciones de *T. cruzi* presentan alta heterogeneidad y características diversas tales como tropismo tisular, morfología, parasitemia, patrones isoenzimáticos y perfiles de productos de restricción por endonucleasas y que también suceden cambios significativos de infectividad y diferenciación metacíclica en cultivos de laboratorio (Engel J.C. et al., 1982). Por lo tanto es muy necesario llevar a cabo las investigaciones con poblaciones homogéneas o clones, donde las características se conservan sin cambios significativos.

5.4. INFECCION EXPERIMENTAL CON *T. cruzi* EN RATON COMPORTAMIENTO DE LA ESTRUCTURA CLONAL

El parásito *Trypanosoma cruzi* es un organismo muy complejo, como se define por diferentes marcadores bioquímicos como isoenzimas (Tibayrenc M., et al., 1986), anticuerpos monoclonales (Kirchhoff L.V. et al., 1984), y estudios de ADN del kinetoplasto (Macina R.A. et al., 1987), además de muchas otras investigaciones en diferentes tópicos.

Sin embargo poca información existe acerca de la infectividad y comportamiento de los clones naturales en modelo experimental.

El desarrollo de un modelo murino que simula las manifestaciones de la enfermedad humana en sus fases aguda y crónica, facilita el estudio de los mecanismos de la patogenia, haciendo posible el análisis de diferentes aspectos de la respuesta inmune y el estudio del daño tisular.

Los estudios experimentales utilizando formas metacíclicas inducidas en cultivo, muestran que ocurre semejante a si fueran con tripomastigotes provenientes de triatomíneos y las perturbaciones inmunológicas en el hospedador mamífero son las mismas (López M.F., et al.,1995).

De tal manera, los estudios realizados en esta investigación utilizando tripomastigotes metacíclicos de cultivo, copian lo que ocurre en las infecciones en la naturaleza con la mayor cercanía posible.

Los resultados del presente trabajo permitieron dilucidar el comportamiento de los diferentes clones de *T. cruzi* en modelo murino y otros aspectos biológicos del parásito.

En la infección a ratón se evaluó la prepatencia, la curva de parasitemia, el estudio de órganos y su análisis histopatológico.

Se revelan semejanzas y diferencias entre los distintos clones, que tienen el mismo o distinto perfil isoenzimático, ambas propiedades configuran un comportamiento individual que permite comprender la complejidad de este parásito.

Se observa claramente la relación bidireccional en la relación hospedador y parásito, donde intervienen los mecanismos de escape del parásito a la acción defensiva del hospedador y los factores genéticos de ambos organismos comprometidos (Braun M. y De Titto E. 1985).

Según los resultados histopatológicos de ratones infectados con los clones, claramente se distinguen las lesiones inflamatorias con infiltrados de células mononucleares y polimorfonucleares en el cincuenta por ciento de los órganos elegidos para el seguimiento, además los hallazgos de pseudoquistes o "nidos de amastigotes" los cuales confirman el establecimiento de la infección en el ratón.

El parásito *T. cruzi* puede presentar distintos tropismos tisulares en vertebrados (Melo R.C. y Brener Z., 1978; Mayer R. et al., 1990).

Durante la infección aguda se produce daño tisular, debido a la replicación de los organismos y al efecto de las toxinas liberadas por el parásito y en algunos casos inicios tempranos de reacciones autoinmunes.

Ocurre denervación temprana, pero sólo en la fase crónica se puede ver con claridad las manifestaciones de disfunción orgánica (McCabe R.E. et al., 1989).

Como característica común en los resultados de la histopatología, se encontró tropismo muscular, como un tejido de primera línea de infección para todos los clones de este estudio.

Los órganos musculares incluyendo el corazón, se encuentran frecuentemente infectados en la fase aguda de infección con *T. cruzi* (Bice D.E. y Zeledon R., 1970; Hanson W.L. y Roberson E.L., 1974).

Según los investigadores Antunes V.de P. et al., 1993 en la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, ocurre una rápida multiplicación del parásito, con parasitemia evidente y parasitismo tisular, distribuido de acuerdo a la afinidad del parásito con tipos celulares específicos, usualmente con afinidad por miocardio, músculo esquelético y tracto digestivo.

La miocarditis chagásica aguda se ha encontrado en la gran mayoría de los ratones infectados con los clones del estudio.

Es sabido que esta miocarditis tiende a regresar en fase aguda, según los estudios de infección con *T. cruzi* en perros, al igual que la inflamación encontrada a nivel de sistema nervioso central (Pittella J.E., et al., 1990).

Varias investigaciones sugieren por otra parte, que en pacientes infectados con *T. cruzi*, la miocardiopatía chagásica es producida por mecanismos autoinmunes, inducidos por antígenos compartidos por el parásito y las células del humano (Brener Z., 1994).

También se han reportado cardiopatías chagásicas en fase aguda con tropismo tisular variado (Penin P. et al., 1990).

Generalmente estas patologías severas se reportan en Chagas crónico. Otros hallazgos del mismo autor, manifiestan que la respuesta humoral probablemente participa en lesiones de músculo.

Los anticuerpos que se unen a la superficie de células del músculo y principalmente en músculo cardíaco, están en el suero de ratones crónicamente infectados con *T. cruzi*.

Las células sufren daño por la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos

En los últimos años se ha puesto especial interés en estudios multidisciplinarios que permitan mayor conocimiento del parásito *T. cruzi*.

La correlación entre variación molecular a nivel génico con los cambios en las propiedades patofisiológicas, requieren especial interés.

En la actualidad existe la tendencia de investigar con los clones más que con cepas, debido a que éstos permiten mayor certeza de homogeneidad (Myler P.J., 1993).

La teoría clonal en *T. cruzi*, ha revelado la existencia de diferencias entre individuos en relación a características biológicas y patogenicidad, probablemente como respuesta a la selección y adaptación a múltiples circunstancias (De Titto E.H., et al., 1987).

En los resultados histopatológicos de este estudio, se visualizan procesos inflamatorios en la mayoría de los órganos, siendo más relevantes a nivel de musculatura esquelética y cardíaca.

Todos los ratones infectados, presentaron infiltrados inflamatorios en los órganos comprometidos, cerebro, corazón, músculo esquelético y en menor grado en hígado, bazo y colon, con presencia o no de pseudoquistes.

Es de anotar que la inflamación no es un parámetro definitivo para asegurar una infección por *T. cruzi*, ya que muchas patologías lo presentan, sin embargo en este caso podría atribuirse a la infección con el parásito, ya que ha estado asociada con el hallazgo de pseudoquistes como infección establecida y presencia de parasitemia en todos los ratones.

Además la mayoría de los investigadores aducen que los infiltrados inflamatorios en infecciones con *T. cruzi*, aparecen generalmente y de manera temprana, lo cual sería un efecto de la perturbación electrofisiológica en los tejidos, a nivel de fibras nerviosas y sitios intramusculares principalmente.

Los infiltrados inflamatorios encontrados en corazón de ratones infectados con formas metacíclicas provenientes de cultivo axénico, están igualmente presentes como en las infecciones con los parásito provenientes del insecto vector López M.F., et al., 1995).

En otros trabajos de infección de ratón con *T. cruzi*, mencionan los procesos inflamatorios los cuales varían de acuerdo a la cepa de ratón utilizada y los correlacionan con niveles de Ig G2a, además explican que ratones más susceptibles responden con procesos inflamatorios donde predominan las células mononucleares (Andrade V. et al., 1985).

Otros autores han encontrado predominio de células T tipo CD8 en la inflamación por infección con *T. cruzi* en ratón. Cerca del 90% del infiltrado celular de corazón y músculo esquelético corresponde a estas células en la enfermedad de Chagas (Kierszenbaum F. 1995).

También se atribuye a los procesos iniciales autoinmunes las lesiones inflamatorias encontradas, sin presencia de parásitos en la enfermedad de Chagas (Mireilles H.J., et al., 1987).

De igual manera otros investigadores afirman que durante la infección con *T. cruzi*, las lesiones inflamatorias en corazón, músculo esquelético y otros tejidos probablemente son debidas a la respuesta inmune inducida por el parásito (Ribeiro dos Santos R., et al., 1991). Además la inflamación es de variada intensidad y distribución y a veces suele ser regresiva (Pittella J. E., et al., 1990).

En el estudio histopatológico de este trabajo, se encontró bastante compromiso inflamatorio de distribución variable en la mayoría de los órganos, que podría ser explicado en parte, por los enunciados anteriores.

Con respecto al hallazgo de pseudoquistes en hígado y bazo de ratones infectados con el clon SO3 fué exclusivo para este clon y ninguno de los otros clones con igual perfil isoenzimático, lo presentaron.

Además este clon SO3 mostró manifestación macroscópica de hepatomegalia, con bajas parasitemias en ratones.

Según Bertelli M.S. y Brener Z. 1980, se han encontrado receptores de membrana en macrófagos, diferentes a C3 y Fc, los cuales son específicos para parásitos sanguíneos.

Existe la posibilidad que receptores similares presentes en otras células del hospedador, puedan estar comprometidos en el diferente tropismo de *T. cruzi* en el hospedador vertebrado, ésto podría explicar en parte la diferencia de tropismo en el caso de este clon.

Probablemente una serie de factores confluyen para la especificidad del tropismo tisular relacionado con la infección de cada uno de los clones naturales en *T. cruzi*.

El hallazgo de tripomastigotes en líquido ascítico de ratones infectados con el clon BUG2149, se corresponde con lo reportado hace varios años por los investigadores Da-Silva L.H., 1959 y Wood D.E., 1951, quienes informaron la presencia de transformación de amastigotes a tripomastigotes en líquido peritoneal, probablemente liberados por elementos celulares en ratones infectados con *T. cruzi*.

Es de mencionar el hallazgo macroscópico de cerebros de consistencia muy blanda, probablemente se podría definir como encefalitis con áreas de necrosis colicuativa en los ratones inoculados con los clones CUICA ESQUILO y P11 pertenecientes al clon Mayor 20 y los clones SO3 y NR del clon Mayor 39, aunque a nivel microscópico la inflamación no fué relevante.

Llama la atención el hecho de que éstos clones a su vez, presentaron bajas parasitemias en los ratones y no se encontraron pseudoquistes en corazón de ninguno de ellos, excepto en infectados con el clon SO3 donde se observó un pseudoquiste.

No son suficientes datos para afirmar alguna relación entre estos parámetros, sin embargo cabe mencionar que el clon SO3 presentó compromisos tisulares muy interesantes y fué en los únicos ratones donde se encontraron pseudoquistes a nivel de bazo e hígado.

Estudios realizados en raton por González-C S.M. y Mirkin G. 1994 describen daño del sistema nervioso central traducido en hallazgo de infiltrados celulares focales con o sin parásitos asociados.

También según los estudios de estos investigadores, en la fase aguda de la enfermedad de Chagas, los parásitos participan al menos en algún grado, en la producción de lesiones tisulares (De Diego J. A. et al., 1991).

En general las lesiones son producidas por acción mecánica durante el período de intensa multiplicación intracelular del parásito, cuando éstos son liberados y se produce la lisis celular. Además los macrófagos ya activados son capaces de la acción parasiticida, lo cual puede agravar el daño tisular por liberación de sustancias citotóxicas de origen parasitario.

Haciendo un análisis comparativo de los resultados de parasitemias y compromisos tisulares de los clones, vemos que las mayores parasitemias se encontraron en los clones BUG2148, BUG2149, MN, del zimodema o clon Mayor 39 y en el clon 13379 pertenecientes al clon Mayor 19, y las menores correspondieron a los clones P11, CUICA y ESQUILO pertenecientes al Clon Mayor 20.

Sin embargo los compromisos inflamatorios y los hallazgos de pseudoquistes de amastigotes en los ratones infectados con los clones de mayores parasitemias, no fueron significativamente superiores a los encontrados en los ratones infectados con los clones que dieron menores parasitemias, como se puede ver comparando los clones SP104 y ESQUILO con el clon BUG2149.

Cabe mencionar que se encontró importante compromiso cardíaco y muscular esquelético en ratones infectados con el clon OPS21, el cual presentó la parasitemia más baja.

Lo anterior indica que no hay directa correlación entre la parasitemia y daño tisular. Iguales conclusiones fueron dadas por Borges M.M., et al., 1992 en su amplio estudio realizado en ratones cepa Swiss infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*.

En otros trabajos a nivel de poblaciones humanas, tampoco se ha encontrado relación directa entre la parasitemia y la evolución de la cardiopatía chagásica (Borges-P. J., et al., 1992).

De acuerdo a los resultados de compromiso de las cavidades cardíacas en cuanto a la inflamación encontrada, se observó que los clones presentaron mayor porcentaje de inflamación a nivel de ventrículos, lo que está en concordancia con los hallazgos de Simoes M.V. et al., 1994, en pacientes con miocarditis aguda.

Según Sartore G., et al., 1981 sugieren que la distribución de las lesiones inflamatorias en las diferentes partes del corazón, están

relacionadas con el metabolismo y diversidad antigénica de las cámaras del corazón.

Todas las diferencias al igual que las similitudes entre los clones, se agrupan en un contexto que lleva necesariamente a considerar la variabilidad en las interacciones parásito-hospedador.

Esta heterogeneidad tiene un impacto importante en la ecología y evolución de los parásitos y por tanto en la epidemiología de la enfermedad.

Se ha reportado que dos clones del mismo zimodema tienen características médico-biológicas diferentes (Tibayrenc M. y Ayala F.J., 1988).

Por lo tanto se hace aún más complejo el análisis y es precisamente lo que acontece para los clones de este estudio.

Segun lo discute Schmid-Hempel P. y Koella J. C. en su trabajo publicado en 1994, se encuentra una alta variabilidad en todos los sentidos, refiriendose tanto al parásito como al hospedador.

Hay muchas evidencias que respaldan la afirmación que una parasitosis involucra activamente al parásito y su hospedador y todos los factores que inciden en estas interacciones están relacionados.

La variabilidad en el genotipo del parásito (Dvorak J.A.,1984; Wagner W. y So M., 1990) y en el genotipo del hospedador (Trischman T., et al., 1978), susceptibilidad o resistencia a la infección, la edad, comportamiento social, variación geográfica y espacial definen el desarrollo de la enfermedad.

Algunos investigadores encuentran que la susceptibilidad de las diferentes cepas de ratones a la infección con *T. cruzi* en fase aguda, depende tanto de la cepa del ratón como de la cepa o clon del parásito (Postan M. et al., 1982a y 1982b).

Los resultados presentados aquí, revelan que estos clones infectan ratones de la cepa Swiss, en los cuales se dá una prepatencia corta y la parasitemia relativamente baja con tendencia a desaparecer alrededor de los 30 días.

En cuanto al estudio histopatológico se encuentra compromiso tisular con tropismo variado, sin mortalidad en fase aguda.

Los estudios realizados en modelos animales permiten comprender la interacción compleja que regula la infección, además que diferentes subpoblaciones de cepas *T. cruzi* pueden determinar diferentes características de infección como la mortalidad y el tropismo tisular (Mc. Cabe R., et al., 1989).

Segun los resultados de las investigaciones en infección con *T. cruzi* realizadas con modelo murino, incluyendo el presente trabajo, se está de acuerdo con la aseveración de algunos autores como Kierszenbaum F. et al., 1995, quienes dicen que es inapropiado referirse a cepas de ratones susceptibles o resistentes sin referirse a la cepa o clon de *T. cruzi* usada para establecer la infección.

El parásito *T. cruzi* está asociado con dos principales formas clínicas, la cardíaca y la intestinal. Estas manifestaciones no se encuentran igualmente distribuídas dentro del rango geográfico de la enfermedad.

Se ha tratado de buscar la explicación a ésto y Miles M.A., et al. 1981, propuso que estas diferencias clínicas pueden ser explicadas por la distribución de los distintos zimodemas del parásito.

A pesar de las muchas investigaciones que se realizan, existe todavía una serie de interrogantes en torno a la morbilidad en la enfermedad de Chagas.

Los largos períodos latentes que en ocasiones preceden a las lesiones, la discrepancia entre la carencia o escases de parásitos y la severidad de la enfermedad, la variable e imprevisible forma clínica y la evidencia de diferencias geográficas en la prevalencia de las formas clínicas.

En las investigaciones realizadas por Breniere S. F., et al, 1989, con un número considerable de pacientes chagásicos en Bolivia y cubriendo diferentes zonas geográficas del país, encontró una gran variabilidad genética de *T. cruzi*, traducida en diferentes zimodemas identificados.

Esto en principio está de acuerdo con la hipótesis de las propiedades patogénicas de los zimodemas.

Sin embargo estos autores no encontraron una regla que determine la hipótesis de especificidad patogénica de estricta asociación con zimodema particular.

Con los resultados de este trabajo tampoco se puede determinar una asociación específica de zimodema ni área geográfica del aislamiento con manifestación clínica, lo que permite asumir que los clones son entidades autónomas en su comportamiento, probablemente asociado con las condiciones del entorno y propiedades individuales del clon.

Según los estudios de características biológicas de *T. cruzi* realizado por Sánchez G. et al., 1990, los zimodemas Z1 y Z2 bol y Z2bra que corresponde a una clasificación antigua de amplios grupos, se encuentran diferencias significativas entre ellos.

Los clones naturales SP104 y MN del presente estudio aislados en Chile, pertenecen respectivamente a Z1 y Z2bol, los cuales segun sus resultados tienen baja virulencia en raton, igual sucede en los resultados de esta investigación.

De igual manera, otros autores Luquetti A.O. et al., 1986 y Apt W. et al., 1987, dicen que no hay una clara correlación entre los zimodemas de *T. cruzi* y los diferentes síntomas de la enfermedad de Chagas.

En general, todos estos investigadores explican las dificultades metodológicas que se encuentran en los aislamientos naturales, que pueden obrar como filtros de selección de subpoblaciones del parásito, en infecciones mixtas las cuales son muy frecuentes. Se han observado cambios en el ADN del parásito como respuesta al "stress" (Nozaki T., y Dvorak J.A., 1993), es probable que estos cambios en última instancia influyan en la adaptación del parásito a las presiones medio ambientales y por lo tanto ocurra una selección en la distribución geográfica de los organismos.

Se hace alusión a ésto para comentar que los clones de estudio aislados de la misma zona geográfica y compartiendo el mismo perfil isoenzimático, como puede ser el caso de los clones MN y NR del clon Mayor 39 aislados de Chile, no manifiestan grandes similitudes en su comportamiento a nivel de metaciclo, infección celular in vitro ni en raton.

Además, se han encontrado clones aislados de una misma zona geográfica los cuales presentan diferentes zimodemas entre sí, con manifestaciones histopatológicas similares, como es el caso de los clones 13379, P11 y SO3 aislados en Bolivia, lo que hace más compleja la asociación clínica con un zimodema particular.

En la presente investigación se utilizaron clones naturales del parásito *Trypanosoma cruzi*, lo que permite mayor certeza de homogeneidad para correlacionar su comportamiento en animales de experimentación, con el clon Mayor o zimodema y dilucidar la especificidad patogénica.

Se pudo relacionar una manifestación clínica de importancia, fué así como los clones ESQUILO, CUICA, y P11 con genotipo de clon Mayor 20, no presentaron pseudoquistes a nivel de corazón y presentaron pocos focos de inflamación con bajo porcentaje de área tisular afectada.

En términos generales, en los resultados de este estudio, se pudo observar una autonomía de comportamiento clonal, con algunos parámetros de similitud, no tantos como se hubiera esperado para los clones con el mismo perfil isoenzimático, lo que nos indica que existe un abanico de posibilidades que ocurren en las infecciones chagásicas, de acuerdo los parámetros biológicos y clínicos.

Los clones Mayores o zimodemas, más frecuentemente encontrados en la naturaleza son 19, 20 y 39 y se les puede encontrar en aislados de pacientes con infecciones mixtas (Ayala F.J. 1993) y según Breniere S. et al., 1989, no muestran diferencias significativas en su patogenicidad y están asociados con todas las diferentes alteraciones y patologías chagásicas.

En los resultados de esta investigación utilizando estos clones Mayores en un modelo experimental, se puede confirmar lo mismo, excepto para la manifestación cardíaca de pseudoquistes que está ausente para los clones del zimodema 20.

Es necesario enfatizar que existen varios factores que contribuyen a las diferencias en el comportamiento del parásito en otros aspectos biológicos.

En las investigaciones de Henriksson J., et al., 1993 con variabilidad de cariotipo y variabilidad isoenzimática, lograron correlacionar clasificación de poblaciones naturales del parásito *T. cruzi* por marcadores isoenzimáticos y localización de los genes en los cromosomas, lo que respalda la teoría clonal de reproducción en un parásito con sectores del ADN diploides como es *T. cruzi*.

Sin embargo en sus resultados, no encontraron correlación con las manifestaciones clínicas.

Las poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi*, tienen una estructura clonal, lo cual ha sido revelado por extensos estudios de genética de poblaciones (Tibayrenc M., et al., 1986).

Se han reportado interesantes hallazgos de variación de zimodemas dentro de clones, dependiendo de la composición del medio de cultivo, dichos cambios pueden ser regresivos y afectan la infectividad en ratón (Alves A., et al., 1993).

De igual manera Tanuri A. y Almeida D.F., 1984, encontraron la existencia de diferencias intraclonales.

Entre el gran número de clones naturales que se han aislado e identificado isoenzimáticamente, algunos son los más frecuentes en las diferentes zonas endémicas, a los cuales se les denomina clones Mayores por su genotipo dominante, también reciben el nombre de clonet (Tibayrenc M. y Breniere S.F. 1988; Ayala F.J., 1993).

Los clones Mayores 19 y 20 están muy relacionados filogenéticamente, con distancia genética de 0.02 y con una única diferencia alélica en 15 loci (Tibayrenc M. y Ayala F.J. 1988). La distancia genética estima el número de sustituciones alélicas que han ocurrido en dos organismos, en este caso clones, desde que ellos compartieron un ancestro común (Ayala F.J., 1993).

Cabe entonces la pregunta por qué, si los clones Mayores 19 y 20 son filogenéticamente muy cercanos, tienen marcadas diferencias en su comportamiento.

Es preciso pensar la explicación en referencia a las implicaciones evolutivas de adaptación lo que coincide con los argumentos que esgrime en su trabajo Ayala F.J., 1993, cuando afirma que *T. cruzi* es genéticamente en extremo heterogéneo y necesariamente ha ocurrido una adaptación al hospedador humano, de manera independiente y por linajes.

Probablemente por esta razón se encuentran diferencias significativas en la adaptación, infectividad, virulencia y diversidad en la patología de este parásito en sus hospedadores mamíferos.

Por lo tanto aunque sean tan similares isoenzimáticamente, se ha encontrado en este estudio de infección experimental con ratón, importantes diferencias entre ellos en manifestación clínica y de igual manera en su comportamiento en cultivo.

Cabe resaltar el comportamiento individual de clon de manera independiente y su posible relación con forma clínica de la enfermedad, lo que permite una mayor comprensión de la infección mixta por varios clones, dentro de un mismo hospedador humano.

Toda la información conocida de la estructura clonal en *T. cruzi*, demanda una caracterización por separado de los atributos biológicos y médicos de cada una de las unidades clonales como lo ha sugerido Tibayrenc. M. et al., 1990.

En la presente investigación se llevó a cabo un estudio con 12 clones naturales de *T. cruzi*, y se encontraron interesantes resultados que muestran un comportamiento autónomo y característico de clon.

Con la utilización de varios criterios de estudio como ha sido en este trabajo, se reporta una significativa variabilidad entre los clones de *T. cruzi* con algunas propiedades comunes, tanto en sus características biológicas como en las manifestaciones clínicas.

El modelo clonal necesita mayor refinamiento mediante adicionales investigaciones a nivel genético, inmunológico y molecular, además de la utilización del mismo y otros modelos experimentales, necesarios para el entendimiento de los fenómenos involucrados en la patogenia con relación activa en una parasitosis, lo que en última instancia lleva al mayor conocimiento de la enfermedad de Chagas en las poblaciones humanas y su posible solución.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación se puede concluir lo siguiente:

1. En estos clones no se encontró relación directa entre porcentaje de tripanosomas metacíclicos e infectividad y virulencia.

2. Los resultados del estudio del metabolismo del parásito en cultivo en fase exponencial, mostraron un delicado balance en las estrategias metabólicas para la degradación de substratos energéticos, con producción de succinato, acetato y alanina, como metabolitos principales.

Además los clones OPS21 y 13379 pertenecientes al clon Mayor 19, producen L-malato como metabolito principal, siendo éste el más importante para el clon OPS21.

3. Con respecto a la infección en líneas celulares VERO y macrófagos J774, con los clones del estudio, se pudo determinar un mayor índice de infección en VERO. Sin embargo se encontró en algunos clones, alto número de tripomastigotes intracelulares aunque su índice de infección fuera menor.

La duración del ciclo intracelular para estos clones fué mayor a lo establecido para cepas de *T. cruzi*.

4. En el modelo experimental, los clones mostraron variedad de tropismo tisular, con hallazgo de pseudoquistes y diferente cantidad de infiltrados inflamatorios asociados, siendo común en la histopatología el tropismo muscular.

Se encontraron pseudoquistes en hígado y bazo de ratones infectados con el clon SO3 del clon Mayor 39.

5. Cabe mencionar la ausencia de pseudoquistes en corazón de ratones infectados con los clones pertenecientes al clon Mayor 20.

6. No se encontró relación directa entre parasitemias e histopatología.

7. La infección en ratón cepa Swiss, presentó para todos los clones estudiados, prepatencias cortas, parasitemias bajas, y fase aguda de cincuenta días de duración, con ausencia de mortalidad

RESUMEN

El parásito *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana.

Este protozoo parásito posee un ciclo biológico complejo, con alternancia entre un hospedador vertebrado y un insecto vector, lo que implica una necesidad de adaptación selectiva a los diferentes medios.

Trypanosoma cruzi manifiesta una alta variabilidad genética, siendo una característica muy importante su amplia heterogeneidad con respecto a sus propiedades biológicas, bioquímicas y médicas.

Este parásito presenta una reproducción básicamente clonal, manifestando que su evolución ha sido muy antigua y ha ocurrido de manera independiente.

En la naturaleza las poblaciones de *T. cruzi* se encuentran como genotipos dominantes, identificados por perfiles isoenzimáticos.

En la actualidad se reconocen 43 zimodemas llamados clones Mayores, los cuales se encuentran en amplias zonas geográficas.

Los clones Mayores 19, 20 y 39 motivo del presente estudio, son los más frecuentemente encontrados en los diferentes aislados en la naturaleza.

Se ha realizado un estudio comparativo del comportamiento de los diferentes clones pertenecientes a los tres clones Mayores mencionados, bajo el punto de vista de las características biológicas y la manera como inciden sus propiedades individuales en la relación con el hospedador, lo que conduce en última instancia a la comprensión de las manifestaciones clínicas en la enfermedad de Chagas.

El proceso de diferenciación o metacicloogénesis, analizado en tres medios de cultivo para cada clon en particular, reveló que ocurre la transformación de formas epimastigotas a tripomastigotas metacíclicas, copiando lo que acontece en el insecto vector.

Los porcentajes de diferenciación varían en cada uno de acuerdo al medio de cultivo utilizado y al clon en particular.

Se encontró máximo porcentaje de transformación del 95% en medio TAUP para el clon P11 del clon Mayor 20, y mínimo porcentaje de 14% para el clon CUTIA del clon Mayor 19.

El estudio de metabolitos mediante la técnica no invasiva de RMN H1, mostró que los tres clones Mayores 19, 20 y 39, producen principalmente succinato, acetato y alanina.

Los clones 13379 y OPS21 pertenecientes al clon Mayor 19, mostraron como producto de excreción adicional L-malato, siendo para OPS21 el metabolito principal.

Se observaron diferencias tanto cuantitativas como cualitativas entre los diferentes clones.

Los resultados del estudio metabólico indican activación de la vía glicolítica y de aminoácidos como estrategia importante para la obtención de energía por parte del parásito.

Sin embargo de acuerdo a los resultados de infectividad de estos clones de estudio, en cultivo celular como en modelo experimental, se pudo observar que la infección acontece de manera similar para todos los clones, independientemente de sus porcentajes de diferenciación, excepto para el clon CUTIA cuyas formas metacíclicas obtenidas fueron incapaces de infectar tanto a células en cultivos como al modelo experimental.

Por lo tanto, no se observa relación importante como causa y efecto, entre el porcentaje de diferenciación y la infectividad.

En cuanto a la infección celular *in vitro*, se pudo comprobar que estos clones de *T. cruzi* infectan y desarrollan su ciclo intracelular en los diferentes tipos de células fagocíticas y no fagocíticas, con un tiempo de duración intracelular mayor a lo usual para cepas del parásito.

El índice de infección fué mayor en células VERO que en macrófagos para todos los clones, con 80% de máximo en VERO al día 10 postinfección para el clon SO3 del clon Mayor 39 y 67% de máximo en macrófagos, línea J774 para el clon P11 del clon Mayor 20.

En cuanto al estudio en modelo experimental murino, se pudo observar un comportamiento propio de clon, con semejanzas y diferencias entre los distintos clones que tienen el mismo perfil isoenzimático.

Se observa claramente la relación bidireccional en la relación hospedador-parásito, donde intervienen los mecanismos de escape de *T. cruzi* a la respuesta del hospedador, y los factores genéticos de ambos organismos comprometidos.

De acuerdo a la evolución de la parasitemia se encuentra que es relativamente baja y tiende a desaparecer a los 30 días postinfección.

Los resultados histopatológicos revelan tropismo tisular variado, siendo el músculo el tejido de primera elección.

Procesos inflamatorios severos y hallazgo del parásito en tejido a manera de pseudoquistes, lo cual confirma el establecimiento de la infección.

Es de resaltar el hallazgo de pseudoquistes en hígado y bazo de ratones infectados con el clon SO3, tropismo tisular poco frecuente en las infecciones con *T. cruzi*.

Como diferencia significativa se encontró que los clones pertenecientes al clon Mayor 20, no presentaron pseudoquistes en corazón, siendo éste órgano el más afectado en la enfermedad de Chagas.

Según los resultados de parasitemias y manifestaciones histológicas de lesión tisular, no se encuentra correlación directa entre estos dos parámetros.

Los resultados generales en modelo experimental, revelan que los clones del estudio, infectan ratones cepa Swiss con prepatencia corta y parasitemias bajas y compromiso tisular importante, sin mortalidad en fase aguda.

BIBLIOGRAFIA

Adroher F.J., Osuna A. y Lupianez J A. (1990): Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. II Hexoquinase phosphofructoquinase and piruvate kinase. Mol. Cell Biochem. 94(1):71-82.

Alves-A. M.B., Amilcar-T., Almeida D.F., y Von Kruger W.M.A. (1993): Reversible changes in the isoenzyme electrophoretic mobility pattern and infectivity in clones of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 77:246-253.

Andrade S G. (1974): Caracterizacao de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no reconcavo Baiano. Rev. Pat. Trop. 1(3): 65-121.

Andrade V., Brodskyn C., y Andrade S.G. (1983): Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77(6):796-799.

Andrade V., Barral-N M., y Andrade S.G. (1985): Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. Braz. J. Med. Biol. Res. 18(4): 499-506.

Andrews S. N. y Colli W. (1982): Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. J. Protozool. 29:264-269.

Antunes V de P., Mahler M.B., DosReis M.A., DosReis L., Silveira S.A., Pinto M.L., y Franquini J.Jr. (1993): Posible role of adrenal parasite reservoir in the pathogenesis of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87:552-554.

Apt W., Aguilera X., Arribada A., Gómez L., Miles M.A., y Widner G. (1987): Epidemiology of Chagas disease in north Chile: Isoenzyme profiles of *Trypanosoma cruzi* from domestic and sylvatic transmission cycles and their association with cardiopathy. Am. J. Trop. Med. Hyg 37:302-307.

Araujo F. C. de y Morein B. (1991): Immunization with *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigens incorporated into iscoms protect against lethal challenge in mice. Infect. Immun. 59:2909-2914.

Araujo J.T.C., Barbosa H.S. y Meirelles M.N. (1992): *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: Perspectives after 15 years study. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87(5): 43-56.

- Arévalo J., Panebra A., y Santacruz C. (1985): Relevance of hemina for in vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool 32: 553-555.
- Avila J.L. (1992): Molecular mimicry between *Trypanosoma cruzi* y host nervous tissues. Acta Cient. Venez. 43: 330-340.
- Ayala F. J. (1993): *Trypanosoma y Leishmania* have clonal population structures of epidemiological significance. Biol. Res. 26: 47-63
- Azogue E., La Fuente C., y Darras C.H. (1985): Congénital Chagas disease in Bolivia: Epidemiological aspects and pathological findings. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 79:176
- Barbosa H.S., Carvalho E L., Ferreira C F. y Meirelles M. N. (1993): *Trypanosoma cruzi* heart muscle cell interaction: The presence of two or more trypomastigotes within a single endocytic. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 25(4): 613-615.
- Basso G., Rasso R., Bibilone A. (1978): Investigaciones sobre la enfermedad de Chagas-Mazza. Eudeba B. Aires. pp. 1-21.
- Bertelli M.S., y Brener Z. (1980): Infection of tissue culture with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol. 66(6): 992-997.
- Bice D.E., y Zeledon R. (1970): Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909). J. Parasitol. 56:663-670.
- Bocca T. C. (1972): Enfermedad de Chagas : clinica de fase aguda. In: Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. Soc. Arg. Parasitología, B. Aires, pp 227-231.
- Bonaldo M.C., Souto-Padron T., De Souza W. y Goldenberg S. (1988): Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. J. Cell Biol. 116:1349.
- Borges-P J., Faraco-W H.P., y Rodriguez-C H. (1992): Evolucao da cardiopatia chagastica crónica. I. Influencia de parasitemia. Rev. Soc. Bras. Med.Trop. 25 (2):101-108.

Borges M.M., De-Andrade S.G., Pilatti C.G., Do-Prado-Jr J.C., y Kloetzel J.K. (1992): Macrophage activation and histopathological fids in *Calomys callosus* and Swiss mice infection with several strains of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87(4):493-502.

Boschetti M. A., Piras M. M., Henriquez D., y Piras R. (1987): The interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface protein with VERO cell and its relationship with parasite adhesion. Mol. Biochem. Parasitol. 24:175-184.

Bowman I. B. R. y Flynn I. W. (1976): Oxidative metabolism of Trypanosomes. In: Biology of the kinetoplastida, ed. Lumsden W. H. y Evans D. A. 1: 435-476.

Braun M., y De Titto E. (1985): Respuesta inmune al *Trypanosoma cruzi*. Un enfoque de patogenia en la enfermedad de Chagas. Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. 35: 1-4.

Brener Z. (1973): Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu. Rev. Microbiol. 27:347-382.

Brener Z., Costa C. A., y Chiari F. (1976): Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 11:245-249.

Brener Z. (1984): Laboratory acquired Chagas' disease: An endemic disease among parasitologist?. En: Genes and Antigens of Parasites. Morel C.M (ed). A laboratory Manual Inst. Oswaldo Cruz pp 3-4.

Brener Z. (1994): The pathogenesis of Chagas' disease: An overview of current theories. In: Chagas Disease and the Nervous System. Pan. Am. Health Organ. pp 30-46.

Breniere S.F., Tibayrenc M., Antezana G., Pabon J., Carrasco R., Selaes H., y Desjeux P. (1985): Preliminary results suggesting a tenuous or non-existent relation between clinical forms of Chagas disease and isoenzyme strains of *Trypanosoma cruzi*. C. R. Acad. Sci.III 300:555-557. UI:85253968.

Breniere S. F., Carrasco R., Revollo S., Aparicio G., Desjeux P., y Tibayrenc M. (1989): Chagas' disease in Bolivia. Clinical and epidemiology features and zymodeme variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41(5):521-529.

- Breniere S. F., Braquemond P., Solari A., Agnese J. F., y Tibayrenc M. (1991): An isoenzyme study of naturally occurring clones of *Trypanosoma cruzi* isolated from both sides of the west Andes highland. *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.* 85: 62-66.
- Breniere S. F., Bosseno M.F., Revollo S., Rivera M.T., Carlier Y., y Tibayrenc M. (1992): Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(3):335-341.
- Bua J., Bontempi E. J., Levin M., Orn A., Velazco D., Moreno M., Leviyayati P., Engstrom A., Segura E. L., y Ruiz A. M. (1991): *Trypanosoma cruzi*: cellular and antibody response against the parasite in mice immunized with a 19 amino acid synthetic peptide. *Exp. Parasitol.* 72: 54-62.
- Burgos M.H., Gutierrez L.S., Lammel E., y Isola E.L. (1989): Midgut extract rich in peritrophic membrane from *Triatomine infestans* induces differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Micros. Electr. Biol. Cell.* 13(2): 151-165.
- Camargo E. P. (1964): Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 6: 93-100.
- Campella O., Henriksson J., Aslund L., Frasch A. C., Petterson U., y Cazzulo J. J. (1992): The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50:225-234.
- Cannata J. B. y Cazzulo J.J. (1984): The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B:279-308.
- Carne M. S., and Dvorak J. A. (1980): *Trypanosoma cruzi*: pattern of RNA synthesis following infection of vertebrate cells. *J. Protozool.* 27(3): 336-338.
- Carne M.S., y Dvorak J. A. (1982): *Trypanosoma cruzi*: spontaneous transformation by Y strain variant in a liquid medium. *Exp. Parasitol.* 54:87-92.

- Carneiro N., Chiari E., Goncalves A.N., Da Silva-P A., Morel C.M., y Romanha A.J. (1990): Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop.* 47:35-45.
- Carvalho T. V., y Souza W. (1983): Separation of amastigotes and tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from culture cells. *Z. Parasitenkd* 69(5):571-575.
- Castellani N., Ribeiro L.V., y Fernández J.M. (1967): Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Protozool.* 14:447-451.
- Castro de S. (1993): The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87: 47-51.
- Cazzulo J.J., Franke de C. B. M., Engel J C., y Cannata J. B. (1985): End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in *Trypanosoma. cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 329-343.
- Cazzulo J. J., Arauzo S., Franke de Cazzulo B. M., y Cannata J. J. B. (1988): On the production of glycerol and L-alanina during the aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FEMS. Microbiol. Lett.* 51: 187-192.
- Cazzulo J. J. (1992): Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB J.* 6:3153-3161.
- Cerrone M.C. y Kuhn R. (1991): Macrophage regulation of immune responses of spleen cells from mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Immunol.* 138: 423-436.
- Chiari E. (1976): Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. In: *America Trypanosomiasis Research. Proc. Int. Sym. PAHO-OMS Sci. Publ. Cient.* 318:144-145.
- Clark I. A., y Howell M. J. (1990): Protozoan parasites of erythrocytes and macrophages. En: *Parasites: Immunity and Pathology.* Jersey M. Behnke. (ed). pp146-160.
- Contreras V.T., Morel C. M. y Goldenberg S. (1985a): Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol. Biochem Parasitol.* 14(1):83-96.

Contreras V.T., Salles J.M., Thomas N., Morel C.M., y Goldenberg S. (1985b): In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Bioch. Parasitol.* 16:315-327..

Contreras V.T. Araujo J.T., Bonaldo M C., Thomas N., Barbosa H., Meirelles M., y Goldenberg S. (1988): Biological aspect of the DM28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83(1): 123-133.

Crane M.S., y Dvorak J.A. (1980): *Trypanosoma cruzi*: pattern of RNA synthesis following infection of vertebrate cells. *J. Protozool*, 27 (33): 336-338.

Csete M., Lev B. I., y Pereira M. E. A. (1985): An influenza model for *Trypanosoma cruzi* infection: Interactive roles for neuraminidasa and lectin. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 117: 153-165.

Davis C. D., y Kuhn R. E. (1990): Selective binding of *Trypanosoma cruzi* to host cell membrane polypeptides. *Infect. Immun.* 58(1):1-6.

Da-Cruz M.Q., Brascher H.M., Vargens J.R., y Oliveira L.A. (1991): Effect of actinomycin D on *Trypanosoma cruzi*. *Experimentia* 47(1): 89-92.

Da-Silva L.H. (1959): Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 10: 265-276.

Deane M.P., Jansen A.M., Mangia R.H. R., Goncalves A. M., y Morel C. M. (1984): Are our laboratory strains representative samples of *Trypanosoma cruzi* population that circulate in nature?. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79:19-24.

Denicola A., Rubbo H., Rodriguez D., y Radi R. (1993): Peroxynitrite mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.* 304(1): 279-286.

De Diego J. A., Penin P., Mayer F., Del Rey J. y Gamallo C. (1991): The application of the statistical study in the morphometric characterization of a colombian strain of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 66:3-8.

De Gaspari E., Umezawa E., Zingales B., Stolf A. M., Colli W., y Abrahamson I. (1990): *Trypanosoma cruzi* : serum antibody reactivity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85:261-270.

De souza W., De Carvalho T.V., Benchimol M., y Chiari E. (1978): *Trypanosoma cruzi*: Ultrastructural cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake. *Exp. Parasitol.* 45:101-115.

De Souza W. (1984): Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytol.* 86: 197-283.

De Titto E., Israelki D., y Araujo F.G. (1987): Circulating *Trypanosoma cruzi* the same cloned population show differences in the ability to infect cells and to cause lethal infection in mice. *Experientia* 43:1227-1229.

Do Campo R., y Moreno S N J. (1996): The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitology Today* 12(2):61-65

Dvorak J.A. (1975): New in vitro approach to quantitation of *Trypanosoma cruzi* vertebrate cell interaction. PAHO Int. Symp. to new app. Am. Trypanosom. Res. Belo Horizonte, Brasil 105-120.

Dvorak J.A. (1976): New in vitro approach to quantitation of *Trypanosoma cruzi* vertebrate cell interactions. Am. Trypanosomiasis Research. WHO. Publ. Cient. (318) 109-120.

Dvorak J.A., Hartman D.L., y Miles M.A. (1980): *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. *J. Protozool.* 27(4): 472-474.

Dvorak J.A., y Crane M.S. (1981): Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites. *Science* 214: 1034-1036.

Dvorak J A., Hall T.E., Crane M.J., Engel J.C., McDaniel J.P., y Urgeles R. (1982): *Trypanosoma cruzi*: Flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J. Protozool* 29:430.

Dvorak J A. (1984): The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: Biological and Medical implications. *J. cell Biol.* 24: 357-371.

Dvorak J A. (1985): Single cell isolates of *Trypanosoma cruzi*: How and why? In: Meeting on Standarization of Methods for T. cruzi Classification. TDR/EPICHA-TCC/84.8 UNDP/World Panamá city. Special Programme for Research and Training Tropical Disease.

Engel J.C., Dvorak J.A., Segura E.L., y Crane M.S.T. (1982): *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium. *J. Protozool* 29(4):555-560.

Engel J.C., Doyle P. y Dvorak J. (1985): *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of clones derived from chronic chagasic patients. II. Quantitative analysis of the intracellular cycle. *J. Protozool.* 32(1):80-83.

Estevez M. G., Gonzalez-P M., Alviano C. S., Angluste J., y Goldenberg S. (1989): Changes in fatty acid composition associated with differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology Letters* 59:31-34.

Fernández J. F., Castellani O., y Kimura E. (1969): Physiological events in the course of the growth and differentiation of *Trypanosoma. cruzi*. *Genetics (suppl)* 61:213-226.

Figueiredo F., Rossi M. A., Ribeiro dos Santos R. (1985): Evoluçao da cardiopatia experimentalmente induzida em coelhos infectados com *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18: 113-141.

Flint J.E., Schechter M., Chapman M.D., y Miles M.A.(1984): Zymodeme and species specificities of monoclonal antibodies raised against *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc.Trop. Med. Hyg.* 78:93-202.

Frydman B., de los Sntos C., Cannata J. J. B., y Cazzulo J. J. (1990): Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Evidence of the presence of two alanine pools and of two CO₂ fixation reactions. *Eur. J. Biochem.* 192:363-368.

Gamallo C., Penin P., Mayer R., Del Rey J. y de Diego J.A. (1991): Comparative morphometry of *Trypanosoma cruzi* forms in the intestine of *Rhodnius prolixus* and in the NNN Medium. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 66: 237-240.

Gazinelli G., y Brener Z. (1991): Immunologic aspects of the morbidity of human chagas' disease. *Res. Immunol.* 142:167-169.

Gea S., Gruppi A., Cerban F., Pistoressi M. C., y Vottero E. (1992): Immune response in mice immunized with acidic antigenic fractions from *Trypanosoma cruzi* cytosol. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 34(5): 389-394.

Gilroy F. V., Edwards M. R., Norton R. S. y O´ Sullivan W. J. (1988): Metabolic studies of the protozoa parasite, *Crithidia luciliae* using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Mol. Biochem. Parasitol. 31:107-116.

Goldenberg S., Contreras V. T., Salles J M., Lima-F.M.P., Bonaldo M.C., Valle D., Goncalves A.M., y Morel C.M. (1984): Perspectives of vaccination against Chagas´ disease through biotechnology. II. Gene expression in *T. cruzi* trypomastigotes and cell-free translation of mRNA coding for relevant surface antigens. In: O.Torrigiani ed., New Approaches to Vaccine Development. Schwabe & co. Basel Switzerland. pp 442-459.

Goldenberg S., Contreras V.T., Salles J.M., Bonaldo M.C., Lima-F.P. Lafaille J.J., Gonzalez-P M., Linss J., y Morel C.M. (1987): In vitro differentiating system for the study of diferential gene expression during *Trypanosoma cruzi* development. In: Molecular Strategies of Parasitic Invasion. UCLA symp. Molec Cell Biology, New Series. Vol 42. N. Agabian, H. Goodman & N. Nogueira.. pp 203-212.

Goldenberg S. (1990): *Trypanosoma cruzi* as a model for studying cell differentiation parasites: Mol Biol. Drug and Vaccine. Design pp1-6.

González-C S. M., y Mirkin G. (1994): Peripheral nervous system alterations in a murine experimental model of Chagas' disease. In: Chagas' Disease and the Nervous System. Pan Am. Health. Organ. pp.317-334.

González J., Araguth M.F., y Yoshida N. (1991): Resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection resulting from immunization of mice with 90 kilodalton antigen from metacyclic trypomastigotes. Infect. Immun. 59(3): 863-867.

González-P M., Romero P., y Goldenberg S. (1988): Cyclic AMP and adenylate cyclasa activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. Exp. Parasitol. 66:205.

Hall B.F., Furtado G.C., y Joiner K A. (1991): Characterization of host cell derived membrane proteins of the vacuola surrounding different intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* in J774 cells. Evidence for phagocyte receptor sorting during the early stages of parasite entry. J. Immunol. 147(12): 4313-4321.

Hall B. F. (1993): *Trypanosoma cruzi*: Mechanism for entry into host cells. Semin. Cell. Biol. 4:323-333.

Hanson W.L., y Roberson E.L. (1974): Density of parasites in various organs and the relation to numbers of trypomastigotes in the blood during acute infection. *J. Protozool.* 21:512-517.

Hanson W. L., Chapman W., Waits V. B. (1976): Immunization of mice irradiated *Trypanosoma cruzi* growth in cell cultures: Relation of numbers of parasites immunizing infection and route of immunization to resistance. *Int. J. Parasitol.* 6: 341-347.

Harth-G., Mills A.A., Lin-T., y Araujo-F G. (1994): *Trypanosoma cruzi* glycoprotein of M 56000 Characterization and assessment of its potential to protect against fatal parasite infections. *Mol. Microbiol.* 11(2): 261-271.

Heath S., Vernick K., Hieny S., y Sher A. (1989): A cAMP inducible gene expressed during the development of infective stages of *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Biochem.* 13E:105.

Henriksson J., Aslund L., y Petterson U. (1996): Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*12(3):108-114.

Henriquez D., Piras R., y Piras M. M. (1981): Surface membrane interactions of *Trypanosoma cruzi* and VERO cell: dissociation of the adhesion and penetration steps. *J. Cell. Biol.* 91: 108.

Henriquez D., Piras R., y Piras M.M. (1981b): The effect of surface membrane modification of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2:359-366.

Henriksson J., Petterson U., y Solari A. (1993): *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. *Exp. Parasitol.* 77: 334-348.

Hoare C.A. (1972): The trypanosomes of mammals. *A Zoological Monograph.* Blackwell Scientific Publ. Oxford 30-56.

Homsy J. J., Granger B., y Krassner S. M. (1989): Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* 36(2): 150-153.

Hontebeyrie-J M. (1993): Immunopatologie de la trypanosomiasis americaine. *Bull. Inst. Pasteur* 91:75-88.

Hontebeyrie M. (1994): Humoral and cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and disease. In: Chagas' Disease and the Nervous System. Pan. Am. Health Organ. pp. 273-283.

Hyde T. P., y Dvorak J. A. (1973): *Trypanosoma cruzi*: Interaction with vertebrate cells in vitro. II. Quantitative analysis of the penetration phase. Exp. Parasitol 34:289-294.

Jacobson R.L. y Doyle R.J. (1996): Lectin-parasite interaction. Parasitology Today 12(2):55-60.

Juri M.A., Ferreira A., Ramos A., y Hoecker G. (1990): Non-lytic antibodies in H-2 controlled resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi*. J. Med. Biol. Res. 23:685-695.

Katzin V.J., Añasco N., Isola E.L., y González-C S.M. (1983): Characterization of *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms differentiated from epimastigotes. A comparative study between both stages. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 25:55-61.

Kirchhoff L.V., Engel J.E., Dvorak J.E., y Sher A. (1984): Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* differ in their expression of a surface antigen identified by a monoclonal antibody. Mol. Biochem. Parasitol. 11:81-89.

Kirchoff L.V. (1993): Chagas disease. Parasitic. Dis. 7(3): 487-501.

Kierszenbaum F. (1995): What are T-cell subpopulations really doing in Chagas' disease?. Parasitology Today 11(1):6-7.

Kipnis T.L., Calich V.L.G. y Diaz Da Silva W. (1979): Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. Parasitology 78: 89-98.

Kipnis T. L., David J.R., Alper C.A., Sher A., y Da Silva W.D. (1981): Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentialles their uptake by macrophages. Proc. Nat. Acad. Sci. (wash) 78:602-605.

Krassner S.M., Granger B., Phermsangngnam P., Le T., y Lindem V. (1990): Further studies on substrates inducing metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool. 37(2):128-132.

Kuhn R.E., y Durum S.K. (1975): The onset of immune protection in acute experimental Chagas' disease in C3H(He) mice. *Int. J. Parasitol.* 5: 241-244.

Kuhn R.E. (1993): Macrophages in experimental Chagas' disease. In: *Macrophage-Pathogen interactions*. En: Zwilling B. y Eisenstein T.K.(ed), pp. 495-502.

Leguizamón M.S., Campetella O.E., Orn A., and González-C S.M.(1993): Reversion of culture-induced virulence-attenuation in *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 88(1):161-162.

Levitus G., Hontebeyrie-J M., Van-R M.H., y Levin M.(1991): Humoral autoimmune response to ribosomal P protein in chronic Chagas heart disease. *Clin. Exp. Immunol.* 85:413-417.

Ley V., Andrews M.W., Robbins E.S., y Nussenzweig V. (1988): Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J. Exp. Med.* 168: 649-659.

Ley V., Robbins E.S., Nussenzweig V. y Andrews N W. (1990): The exit of *Trypanosome cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments'. *J. Exp. Med.* 171:401-413.

López M.F., Cunha J.M.T., Bezerra F.L., Gonzalez M.S., Gómez J.E., Lapa J.R., Garcia E.S., y Dos Reis G. (1995): *Trypanosoma cruzi*: Both chemically induced and *Triatomine* derived metacyclic trypomastigotes cause the same immunological disturbances in the infected mammalian host. *Exp. Parasitol.* 80:194-204.

Luquetti A.O., Miles M.A., Rassi A., De Rezede J.M., De Souza A.A., Póvoa M.M., y Rodríguez I. (1986). *Trypanosoma cruzi*: Zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80:462-470.

Macina R.A., Araujo S., Reyes M.B., Sánchez D.O., Basombrio M.B., Montamat E.E., Solari A., y Frasch A.C. (1987): *Trypanosoma cruzi* Isolates from Argentina and Chile grouped with the aid of DNA probes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25: 45-53.

Marsden P. D., (1967): *Trypanosoma cruzi* infections in CFI mice. I. Mortality with different doses of trypanosomes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 61:57-61.

Martelh C.M.T., Andrade A.L.S., Silva S.A., y Zicker F. (1992): Risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection among blood donors in central Brazil. Mem. Inst. Oswaldo 87:339-343.

Mayer R., De Diego J. A., Penin P., Del Rey J. y Gamallo C. (1990): Caracterización morfológica y patológica de una cepa de *T. cruzi* de origen colombiano. Rev. Iber. Parasitol. 50: 179-191.

Mc Cabe R. E., Meagher S.G., y Mullins B T. (1989): *Trypanosoma cruzi*: Explain organ cultures from mice with chronic Chagas' disease. Exp. Parasitol. 68:462-469.

Mc Cabe R. E., y Mullins B. T. (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(6): 2384-2388.

Mc Cabe R. E., Meagher S.G., y Mullins B.T. (1991): Endogenous interferon gama macrophage activation and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi*. J. Infect. Dis. 163(4): 912-915.

Meirelles M. N., Martinez-P A., Souto-P T., y De Souza W. (1983): Participation of concanavalin A binding sites in the interaction between *Trypanosoma cruzi* and macrophages. J. Cell Sci. 62:287-299.

Meirelles M. N., Araujo J., Miranda C. F., De Souza W., y Barbosa H. S. (1986): Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cell: ultraestructural and cytochemical analysis of endocytic vacuola formation and effect upon myogenesis in vitro. Eur. J. Cell Biol. 41:198-206.

Melo R. C., y Brener Z. (1978): Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. J. Parasitol. 64:475-482.

Mesri E. A., Levitus G., Hontebeyrie-J., Van-R M. N., Dighiero G., Van-R M. H., y Levin M. (1990): Mayor *Trypanosoma cruzi* antigenic determinant in Chagas' heart disease shares homology with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope. J. Clin. Microbiol. 28: 1219-1225.

Meyer H., Oliveira-M M. X. (1948): Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures: A four year study. Parasitology 39:91-94.

- Miles M. A., Toye J. P., Oswaldo S. C., y Godfrey D. G. (1977): The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71: 275-285.
- Miles M. A., de Souza A. A., Povoá M., Shaw J. F., Laison R., y Toye P. J. (1978): Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272: 819-821.
- Miles M.A., Cedillos R.A., Povoá M.M., De Souza A.A., Pirata A., y Macedo V. (1981): Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease?. *Lancet* 1: 1338-1340. UI:81219737.
- Miles M. A., Povoá M.M., de Souza A.A., Lainson R., Shaw J.J., Ketteridge D.S. (1981): Chagas' disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Para State, North Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.* 75:667-674.
- Miles M., Apt W., Widmer G., Povoá M., y Schofiel C. (1984): Isozyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78: 526-635.
- Ming M., Chnenkora M., Ortega B.E. y Pereira M.E. (1993): Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59(2): 243-252.
- Mireille H.J., Gérard S., Genevieve M., Giles M. y Harvey E. (1987): L3T4 cells able to mediate parasite specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur. J. Immunol.* 17:1027-1033.
- Moncayo A. (1994): Recent trends in Chagas' disease research. In: *Chagas' Disease and the Nervous System.* Pan Am. Health Organ. pp.55-71.
- Monteon V. M., Nekrassov V., Zepeda A., Aranda A., y Reyes P.A. (1992): Interaction of a mixture of epimastigotes and trypomastigotes from a culture of a mexican isolate of *Trypanosoma cruzi* with mouse macrophages. *Rev. Latin. Microbiol.* 34(1): 43-48.
- Morales M.C., Cardoni R.L., Rimoldi M.T., Esteva M., y Milei J. (1987): Heart damage comparing three strains of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (B. Aires).* 47:493-499.

Morel C., Chiari E., Plessman-C E., Mattei D. M., Romanha A. J., y Simpson L. (1980): Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by patterns of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6810-6814.

Mortara R. A. (1991): *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. Exp. Parasitol. 73(1): 1-14.

Mukkada A. J. (1985): Energy metabolism in *Leishmania*. In: Leishmaniasis. ed. Chang Brey. Elsevier Science Publisher B. V. Biomedical División pp. 49-64.

Myler P.J. (1993): Molecular variation in trypanosomes. Acta Trop. 53:205-225.

Nogueira N. y Cohn Z. (1976): *Trypanosoma cruzi*: Mechanisms of entry and intracellular fate in mammalian cells. J. Exp. Med. 143:1402-1420.

Nogueira N., Chaplan S., y Cohn Z. (1980): *Trypanosoma cruzi*: factors modifying ingestion and fate of blood forms trypomastigotes. J. Exp. Med. 152:447-451.

Nogueira N. (1983): Host and parasite factors affecting the invasion of mononuclear phagocytes by *Trypanosoma cruzi*. Ciba Found. Symp. 52-73.

Nozaki T., y Dvorak J. A. (1993): Intraespecific diversity in response of *Trypanosoma cruzi* to environmental stress. J. Parasitol. 79(3): 451-454.

Opperdoes F. R. (1987): Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. Ann Rev. Microbiol. 41: 127-151.

Ortega-B. F. y Pereira M.F. (1992): Entry of *Trypanosoma cruzi* into eukariotic cells. Infect. Agents. Dis. 1(3):136-145.

Osuna-Carrillo A., Jimenez-Ortiz A., y Lozano-M J. (1979): Medios de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Iber. Parasitol. 39:129-133.

Osuna A., Ortega G., Gamarro F., Castanys S., y Mascaró M.C. (1984): Some factors affecting the in vitro invasion of HeLa cells by *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Parasitol. 14:253-257.

Ouaissi M. A., Afchain D., Capron A., y Grimand J. A. (1984): Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi*, trypomastigotes and their biological function. *Nature* 308 (5957):380-382.

Ouaissi M. A., Cornette J., y Capron A. (1986): Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19:201-211.

Penin P., De Diego J. A., Del Rey J., Mayer R. y Gamallo C. (1990): Acute chagasic cardiopathy produced by a strain of *Trypanosoma cruzi* (Type I) in an experimental model. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65:208-213.

Pinto-D J. C. (1982): Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudio clínico epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982. Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Piras M. M., Piras R., Henriquez D., y Negri S. (1982): Changes in morphology and infectivity of cell culture derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6(2): 67-81.

Piras M. M., Henriquez D., y Piras R. (1985): The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction of *Trypanosoma cruzi*- fibroblasts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14:151-163.

Pittella J. E., Meneguette C., Barbosa A. J., y Bambirra F. A. (1990). Histopathological and immunohistochemical study of the brain in the acute and chronic phases of experimental trypanosomiasis in dog. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 84(6):615-621.

Pizzi T., y Prager R. (1952): Estabilización de la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi* por pasaje seriado en ratones de constitución genética uniforme: análisis cuantitativo del curso de la infección. *Biología* 16 (17):3-12.

Pizzi T.(1957): Inmunología de la enfermedad de Chagas. *Rev.U Chile* pp.183-186.

Pizzi T. (1961): Un derivado imidazólico efectivo en el tratamiento de las infecciones experimentales por *Trypanosoma cruzi*. *Bol. Chil. Parasitol.* 16: 35-36.

Plasman N., Metz G., y Vray B. (1994): Interferon gamma activated immature macrophages exhibit a high *Trypanosoma cruzi* infection rate associated with a low production of both nitric and tumor necrosis factor-alpha. *Parasitol. Res.* 80(7):554-558.

Postan M., Dvorak J.A., y Mc Daniel J.P. (1982a): Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEN mice with two clones isolated from a common source. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:497-506.

Postan M., Mc Daniel J.P., y Dvorak J.A. (1982b): Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. II. Course of infection of C57B1/6 mice with single cell isolated stock. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:236-238.

Ralph P., Prichard J. y Cohn M. (1975): Reticulum cell sarcoma. An effector cell in antibody dependent cell-mediated immunity. *J. Immunol.* 114(2): 888-905.

Ramirez M.I., Ruiz R de-C., Araya J.E., Da Silveira J.F. y Yoshida N. (1993): Involvement of the stage specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infect. Immun.* 61(9): 3636-3641.

Ramirez L.E., Lages-S E., Searez J.M., y Chapadeiro E. (1994): The hamster (*Mesocricetus aureatus*) as experimental model in Chagas' disease: Parasitological studies in acute and chronic phases of *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* 27(3):163-169.

Rangel-Aldao R., Allende O., Triana F., Piras R., Henriquez D. y Piras M. (1987): Possible role of cyclic AMP in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 22:39.

Ribeiro dos Santos R., Pirmez C., y Savino W. (1991): Rol of autoreactive immunological mechanism in chagasic carditis. *Res. Immunol.* 142: 134-137

Rogerson G. N. y Gutteridge W. E. (1980): Catabolic metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 10:131-135.

Romanha A. J., y Brener Z. (1988): *Trypanosoma cruzi* isoenzyme pattern as an epydemiological tool. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83(1): 383-386.

Rondinelli E.,(1994): Conservation of heat-shock proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today* 10(5):172-176.

Rosenbaum M. B. (1964): Chagasic myocardopathy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 7: 199-225.

Rubbo H., Denicola A., y Radi R. (1994): Peroxynitrite inactivates thiol-containing enzymes of *Trypanosoma cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration. *Arch. Biochem. Biophys.* 308(1):96-102.

Sánchez G., Wallace A., Olivares M., Diaz N., Aguilera X., Apt W., y Solari A. (1990): Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* zymodemes: in vitro differentiation of epimastigotes and infectivity of culture metacyclic trypomastigotes to mice. *Exp. Parasitol.* 71:125-133.

Sánchez G. (1992): Estudio de la variabilidad en poblaciones y clones de *Trypanosoma cruzi* por criterios biológicos, inmunológicos y bioquímicos. Tesis de postgrado en Ciencias Biológicas, Biología. Facultad de Ciencias-Universidad de Chile

Sánchez-Moreno M., Lasztitly P., Coppens I., y Opperdoes F. R. (1992): Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54:185-200.

Sánchez-Moreno M., Fernández-Becerra E., Entrala E., Opperdoes F. R., Dollet M., y Osuna A. (1995): In vitro culture of *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. Metabolic studies by ¹H NMR. *J. Euk. Microbiol.* 42:314-320.

Sartore S., Gorza L., Bormioli S.P., Libera L.D., y Schiaffino S. (1981): Myosin types and fiber types in cardiac muscle. I. Ventricular myocardium. *J. Cell. Biol.* 88:226-233.

Scott M. T., y Snary D. (1982): Immunology of Parasitic Infection. Cohen S. y Warrent K., Blackwell (ed), N.Y. 261-298.

Scott M. T., y Goss-Sampson M. (1984): Restricted Ig isotype profiles in *Trypanosoma cruzi* infected mice and Chagas' disease patients. *Clin. Exp. Immunol.* 58: 372-379.

Scott M.T. y Snary D. (1985): American trypanosomiasis (Chagas disease). En: Immunology of Parasitic Infection. Cohen S. y Warren K. S pp.261-298

Schenkman S., Andrews N.W., Nussenzweig V. y Robbins E.S. (1988): *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in polarized manner. *Cell* 55: 157-165.

Schenkman R. P., Vandekerchove F. y Schenkman S. (1993): Mammalian sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 61(3):22-25.

Schmid-H P., y Koella J.C. (1994): Variability and its implications for host-parasite interactions. *Parasitol. Today* 10(3):98-102.

Schmunis G.A. (1994): American trypanosomiasis as a public health problem. In: *Chagas Disease and the Nervous System*. Pan. Am. Health Organ. 3-29.

Silva J.S., Twardzik D.R., y Reed S.G. (1991): Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF beta). *J. Exp. Med.* 174(3): 539-545.

Simoes M.V., Nonino A., Simoes B.P., Almeida-F.O.C., Maciel B.C., y Marin-N J.A. (1994): Reagudizacao de cardite chagastica provocando insuficiencia ventricular direita exclusiva. *Arq. Bras. Cardiol.* 62(6): 435-437.

Snary D. (1985): The cell surface of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 117: 75-92.

Steindel M., Dias E., Menezes de C. L., Romanha A.J. y Simpson A.J. (1993): Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol. Bioch. Parasitol.* 60: 71-80.

Sullivan J.J. (1983): Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* in vitro: a simplified procedure. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76:300-303.

Tafuri W.L., Chiari E. y Raso P. (1983): Ciclo intracelular do *Trypanosoma cruzi* e sua importancia na patogenese da doenca de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 16: 219-221.

Tanowitz H., Wittner M., Sveda M. y Soeiro R. (1975): Studies on ribosomal RNA of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 61: 1065-1069.

Tanuri A., y Almeida D.F. (1984): Isoenzyme variation in clones of *Trypanosoma cruzi*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 56: 117-118.

Tanuri A., de Andrade P.P. y Almeida D.F. (1985): *Trypanosoma cruzi*: isolation of cloned strains and characterization of their infectivity. J. Parasitol. 71: 397-402.

Texeira A. R. (1987): The Stercorarian trypanosomes. In: Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis. ed. Soulsby E. S. L.

Texeira A. R., Argañaraz E.R., Freitas L.H Jr., Lacava Z.G., Santana J.M. y Luna H. (1994): Possible integration of *Trypanosoma cruzi* KDNA minicircles into host cell genome by infection. Mutat. Res. 305: 197-209.

Thompson S. N. (1991): Applications of nuclear magnetic resonance in parasitology. J. Parasitol. 77: 1-20.

Tibayrenc M., Ward P., Moya A., y Ayala F.J. (1986): Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proc.Natl. Acad.Sci.USA83:115-119.

Tibayrenc M., y Ayala F. J. (1987): *Trypanosoma cruzi* populations: More clonal than sexual. Parasitology Today 3(6):189-190.

Tibayrenc M. y Ayala F. J. (1988): Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution 42:277-292.

Tibayrenc M., y Breniere S. F. (1988): *Trypanosoma cruzi*: Mayor clones rather than principal zymodemes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de J. suppl. I 83: 249-255.

Tibayrenc M., Kjellberg F. y Ayala F.J. (1990): A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* y *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 2414-2418.

Tibayrenc M., y Ayala F.J. (1991): Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. Parasitology Today 7(9): 228-232.

Trischmann T. M., Tanowitz H., Wittner M., y Bloom B. (1978): Role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. Exp. Parasitol. 45:160-168.

Trischmann T. M., y Bloom B. R. (1982): Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 35: 546-551.

Turk J. L., Parker D., y Poulter L. W. (1972): Funtional aspects of the selective depletion of lymphoid tissue by ciclophosphamide. *Immunology* 23:493-501.

Umezawa E. S., Milder R.V., y Abrahamson I.A. (1985): *Trypanosoma cruzi* amastigotes: Development in vitro and infectivity in vivo of the forms isolated from spleen and liver. *Acta Trop.* 42: 25-32.

Urbina J. A., Machin I. y Jurado L. (1993): The limitations of the paradigms studies on the intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Res.* 26: 81-88.

Urbina J. A. (1994): Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today* 10(3):107-110.

Urdaneta-M S. (1983): Pleomorphism in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from blood and cell culture. *Tropenmed. Parasitol.* 34:225-228.

Veas F., Cuny G., Breniere S. F. y Tibayrenc M. (1990): Subespecific kDNA probes for Mayor clones of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 1-4.

Veas F., Breniere S.F., Cuny G., Brengues C., Solari A. y Tibayrenc M. (1991): General procedure to construct higly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sesitive by polymerase chain reaction. *Cell. Mol. Biol.* 37(1): 73-84.

Velazco J. R., Adroher F. J. y Osuna A. (1989): A survey of culture media of *Trypanosoma cruzi* amastigote forms from infected VERO cells. *Chemosphere* 19:1743-1748.

Velge P., Ouaiissi M.A., Cornette J., Afchain D. y Capron A. (1988): Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction. *Parasitology* 97: 255-268.

Vercesi A.E. (1994): Ca²⁺ Homeostasis and mitochondrial bionergetics in *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian J. Med Biol. Res.* 27: 501-503.

Vickerman K. (1994): The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int. J. Parasitol.* 24:1317-1331.

Wagner W. y So M. (1990): Genomic variation of *Trypanosoma cruzi* Involvement of multicopy genes. *Infect. Immun.* 58: 3217-3224.

Wood D.E. (1951): Development of Arizona *Trypanosoma cruzi* in mouse muscle. *Am. J. Trop. Med.* 31:1-7.

Wrightsmann R., Krassner S. y Watson J. (1982): Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: Multiple genes influencing parasitemia and survival. *Infect. Immun.* 36(2): 637-644.

Younes A., Hontebeyrie M., Tricottet V., Eisen H., Reynes M. y Said G. (1988): Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 77-83.

Zeledon R., Alvarenga N.J. y Schosinky K. (1977): Ecology of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Pan. Am. Health Organ. Sci. Publ.* 347: 59-70.

Zeledon R., Bolanos R. y Rojas M. (1984): Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Acta Trop.* 41:39.

Zenian A. y Kierszenbaum F. (1982): Inhibition of macrophage-*Trypanosoma cruzi* interaction by concanavalin A y differential binding of bloodstream and culture forms to the macrophage surface. *J. Parasitol.* 68: 408-415.

Zingales B., Andrews N.W., Kuwajima V.Y. y Colli W. (1982): Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: possible correlation with interiorization process in mammalian cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6:111-124.

Zingales B. y Colli W. (1985): *Trypanosoma cruzi* interaction with host cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 117:129-152.

Zuna H., La Fuente C., Valdez E., Recacoechea M., Franco J.L., Romero A. y Bermudez H. (1985): Prospective study of the transmission of *Trypanosoma cruzi* by blood in Bolivia. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 65 suppl: 107-113.

Zúñiga C.A. (1995): Evolución de la respuesta inmune en ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. Tesis de postgrado en Ciencias Biológicas-Inmunología, Facultad de Medicina-Universidad de Chile.