

UCH-FC

DOC-B

S 211

C-1

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD EN POBLACIONES Y CLONES  
DE *TRYPANOSOMA CRUZI* POR  
CRITERIOS BIOLÓGICOS, INMUNOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

por

**GITTITH ARIELA SANCHEZ PADILLA**

1993

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Aldo Solari Illescas

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

GITTITH ARIELA SANCHEZ PADILLA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de **Doctor en Ciencias con mención en Biología**, en el examen de defensa de Tesis rendido el .....

Director de Tesis:

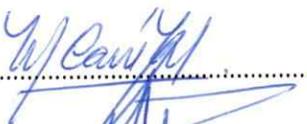
Dr. Aldo Solari I.



.....

Comisión Informante de la Tesis:

Dra. Margarita Carú M.



.....

Dr. Alfredo De Ioannes I.



.....

Dr. Guido Pincheira V.



.....

Dra. Olga Pizarro A.



.....

Dr. Mario Rosemblatt S.



.....

A mis padres,  
Arturo y Yolanda

A mis hijos,  
Claudia, Rodrigo y Mariela

## AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos:

Al Dr. Aldo Solari I., por la confianza que depositó en mí y por el apoyo que me brindó durante el desarrollo de la tesis.

A Juan Venegas H., por su colaboración y espíritu crítico, con el cual desafié mi perfeccionamiento.

A la Dra. Anne Wallace por su valiosa cooperación en el desarrollo de algunos experimentos.

A mis alumnos, amigos y colaboradores del laboratorio, por el entusiasmo, ayuda y estímulo, sin los cuales estos años de trabajo no habrían tenido la alegría de compartir: Eric Díaz, Ismael Correa, Claudio Berríos, Inés Zulantay, Maritza Olivares, Marta Gajardo, Loreto Moraga, Sergio Muñoz y Silvia Ortíz.

A Patricia Varela B., por su valioso y experto aporte en la realización de geles bidimensionales.

A Margarita Carú M., por su lucidez y valiosas sugerencias que contribuyeron a mejorar el escrito.

A Juan Araos y Luisa López, por la buena voluntad y excelente labor auxiliar desarrollada.

A Titina Cerda por su disponibilidad y eficiencia en la digitación de este trabajo.

## INDICE

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
1. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	1
2. Enfermedad de Chagas .....	4
3. Heterogeneidad de las poblaciones de <i>T. cruzi</i> .....	4
A. Metacicloogénesis .....	8
B. Infectividad en ratón .....	9
C. Infectividad de formas tripomastigotas en células de cultivo.....	11
D. Susceptibilidad de formas tripomastigotas a sueros inmunes.	12
E. Detección de glicoconjugados mediante lectinas .....	13
F. Bases moleculares de la infectividad y evasión de la respuesta inmune .....	15
<b>HIPOTESIS</b> .....	18
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	19
1. Procedencia de los reactivos .....	19
2. Material biológico.....	19
2.1 Caracterización isoenzimática (zimodemas) de poblaciones y clones de <i>T. cruzi</i> .....	19
2.2 Formas epimastigotas .....	20
2.3 Tripomastigotas metacíclicos .....	20
2.4 Tripomastigotas sanguíneos .....	20
2.5 Tripomastigotas de cultivo celular .....	21

	Página
3. Antisueros .....	21
4. Caracterización biológica .....	22
4.1 Período prepatente .....	22
4.2 Curvas de parasitemias y mortalidad .....	22
5. Ensayos de inmunofluorescencia y mortalidad .....	23
5.1 Inmunofluorescencia indirecta en formas tripomastigotas vivas	23
5.2 Inmunofluorescencia indirecta convencional .....	23
6. Experimentos de infectividad .....	23
7. Ensayos de lisis mediada por complemento .....	24
7.1 Obtención de complemento .....	25
8. Detección de residuos de carbohidratos mediante lectinas fluo- resceinadas .....	25
8.1 Formas epimastigotas fijadas .....	25
8.2 Detección de carbohidratos mediante lectinas fluoresceinadas en parásitos vivos .....	25
9. Marcación de antígenos de superficie con <sup>125</sup> I-yodo.....	26
10. Inmunoprecipitación de antígenos de superficie con pro- teína A de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
11. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones dena- turantes .....	27
12. Inmunoelectrotransferencia de proteínas .....	28
13. Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida .....	28
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
1. Diferenciación <i>in vitro</i> de formas epimastigotas a tripomastigo- tas metacíclicos .....	29
2. Purificación de tripomastigotas metacíclicos mediante cromatografía en DEAE-celulosa .....	33

	Página
3. Diferenciación <i>in vitro</i> de formas epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos de poblaciones de <i>T. cruzi</i> pertenecientes a zimodemas Z1 y Z2 .....	33
4. Caracterización biológica de poblaciones de <i>T. cruzi</i> en ratones .....	36
4.1 Infectividad de tripomastigotas de cultivo en ratones irradiados .....	36
4.2 Caracterización de poblaciones de <i>T. cruzi</i> en ratones no irradiados .....	36
4.3 Parasitemias .....	41
5. Detección de residuos de carbohidratos mediante lectinas fluoresceinadas .....	41
5.1 Detección de residuos de carbohidratos en formas epimastigotas mediante lectinas fluoresceinadas .....	41
5.2 Detección de residuos de carbohidratos en formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos y tripomastigotas en cultivo celular mediante lectinas fluoresceinadas .....	43
6. Infectividad de cepas de <i>T. cruzi</i> en células de cultivo Vero.....	43
7. Lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos ....	48
7.1 Lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos de formas tripomastigotas sanguíneas de diferentes cepas .....	48
7.2 Lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos de formas tripomastigotas metacíclicas de cultivo .....	51
7.3 Lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos de formas tripomastigotas provenientes de cultivo celular.....	53
8. Inmunofluorescencia indirecta de formas tripomastigota vivas....	53
9. Análisis antigénico de distintas poblaciones de <i>T. cruzi</i> mediante antisueros generados en contra de parásitos Z1 y Z2 .....	53
10. Análisis antigénico de cepas de <i>T. cruzi</i> mediante antisueros Z1 y Z2 en geles bidimensionales .....	56
10.1 Proteínas inmunoprecipitadas .....	56
10.2 Análisis bidimensional de proteínas de superficie .....	59

	Página
<b>DISCUSION</b> .....	62
1. Diferenciación <i>in vitro</i> de forma epimastigota a tripomastigota .....	63
2. Curso de la infección experimental en ratón .....	64
3. Infectividad en células de cultivo .....	66
4. Lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos .....	67
5. Reconocimiento antigénico en formas tripomastigotas .....	69
6. Implicaciones de la clonalidad en el parásito protozoario.....	71
<b>PROYECCIONES</b> .....	74
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	76

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo vital de <i>T. cruzi</i> .....	3
Figura 2. Diferenciación "in vitro" de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos .....	30
Figura 3. Frotis de epimastigotas teñidos con colorante de May Grünwald-Giemsa visualizado al microscopio óptico .....	31
Figura 4. Frotis de tripomastigotas de cultivo celular cepa v115 teñidos con colorante de May Grünwald-Giemsa visualizados al microscopio óptico.....	32
Figura 5. Estudios de infectividad en ratones no irradiados de distintas poblaciones de <i>T. cruzi</i> .....	38
Figura 6. Estudios de infectividad en ratones no irradiados de distintas poblaciones de <i>T. cruzi</i> .....	39
Figura 7. Infectividad en células de cultivo Vero de tres poblaciones de <i>T. cruzi</i> .....	45
Figura 8. Células Vero infectadas con parásitos de <i>T. cruzi</i> pertenecientes a cepa Daza.....	46
Figura 9. Células Vero infectadas con parásitos de <i>T. cruzi</i> pertenecientes al clon DM28c.....	47
Figura 10. Perfiles antigénicos de distintas poblaciones de tripomastigotas analizados mediante "Western blotting" con sueros de ratón líticos y no líticos.....	55
Figura 11. Perfiles antigénicos de una población de tripomastigotas analizados mediante "Western blotting" con sueros líticos y no líticos de pacientes chagásicos.....	57
Figura 12. Análisis por electroforesis bidimensional de antígenos de tripomastigotas inmunoprecipitados con sueros líticos y no líticos teñidos con azul de Coomassie.....	58
Figura 13. Análisis por electroforesis bidimensional de antígenos de superficie de tripomastigotas del clon Dm28c marcados con <sup>125</sup> I-yodo e inmunoprecipitados con antisueros líticos y no líticos de ratón.....	60
Figura 14. Análisis por electroforesis bidimensional de antígenos de superficie de tripomastigotas de la cepa Tulahuén marcados con <sup>125</sup> I-yodo e inmunoprecipitados con antisueros líticos y no líticos de ratón.....	61

## LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla I	Poblaciones de <i>T. cruzi</i> pertenecientes a zimodemas Z1 y Z2: hospedador y origen geográfico.....	34
Tabla II	Porcentajes de diferenciación " <i>in vitro</i> " de poblaciones de <i>T. cruzi</i> pertenecientes a zimodemas Z1 y Z2.....	35
Tabla III	Infectividad de poblaciones de <i>T. cruzi</i> pertenecientes a zimodemas Z1 y Z2 en ratones irradiados.....	37
Tabla IV	Período prepatente y porcentajes de letalidad por cepas de <i>T. cruzi</i> en ratones no irradiados.....	40
Tabla V	Detección de carbohidratos mediante lectinas fluoresceinadas en epimastigotes fijados pertenecientes a zimodemas Z1 y Z2.....	42
Tabla VI	Detección de carbohidratos mediante lectinas fluoresceinadas en formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas y tripomastigotas de cultivo celular.....	44
Tabla VII	Clasificación mediante zimodemas, origen geográfico y hospedador de cepas y clones utilizadas en la reacción de lisis mediada por complemento.....	49
Tabla VIII	Porcentajes de reactividad lítica de sueros inmunes en contra de formas tripomastigotas sanguíneas.....	50
Tabla IX	Porcentajes de reactividad lítica de sueros inmunes en contra de formas tripomastigotas metacíclicas de cultivo acelulare .....	52
Tabla X	Porcentajes de reactividad lítica de sueros inmunes en contra de formas tripomastigotas de cultivo celular.....	54

## RESUMEN

En este trabajo se estudiaron poblaciones y clones de *Trypanosoma cruzi* pertenecientes a los dos zimodemas predominantes en Chile (Z1 y Z2), los cuales son radicalmente diferentes y están separados por grandes distancias genéticas, según se ha determinado por estudios isoenzimáticos.

Los parámetros que se analizan son: capacidad de diferenciación "*in vitro*" de formas epimastigotas a tripomastigotas, curso de la infección experimental en un modelo murino, infectividad en células de cultivo, reconocimiento de glicoconjugados mediante lectinas, susceptibilidad a lisis mediada por complemento en presencia de anticuerpos y análisis antigénicos de formas tripomastigotas con sueros generados en contra de parásitos pertenecientes a ambos tipos de zimodemas.

Los parásitos pertenecientes al zimodema Z1 mostraron alta capacidad de diferenciación "*in vitro*", provocaron altas parasitemias en ratón e infectaron células de cultivo. Por el contrario, el grupo Z2 mostró bajos porcentajes de diferenciación "*in vitro*", parasitemias subpatentes en ratón y baja capacidad infectiva en células de cultivo.

Sueros inmunes generados contra poblaciones Z1, fueron capaces de provocar lisis mediada por complemento de parásitos Z1, aunque la reactividad lítica dependió de la cepa utilizada. Antisueros contra parásitos Z2 fueron incapaces de lisar parásitos Z1.

Las formas celulares utilizadas como célula blanco, ya sea tripomastigotas sanguíneas, metacíclicas o de cultivos celulares, difirieron en susceptibilidad a la lisis mediada por complemento, siendo las dos últimas formas las más susceptibles.

El análisis antigénico mediante "Western blot" permitió visualizar preferentemente antígenos de peso molecular sobre 90.000. Los antisueros que no poseen actividad lítica reconocen débilmente algunos antígenos. En cambio, aquellos sueros que poseen actividad lítica reconocen varios antígenos mayoritarios, con pesos moleculares entre 90.000 y 112.000, los que fueron detectados en las diferentes cepas estudiadas. El análisis de antígenos de superficie marcados con  $^{125}\text{I}$ -yodo y mediante un suero con actividad lítica demostró que éste era capaz de reconocer selectivamente una proteína de peso molecular 110.000. En cambio, el antisuero no lítico reconoce una proteína de peso molecular 40.000.

En conjunto estos resultados muestran que las diferencias en los parámetros biológicos y bioquímicos analizados se correlacionan con las diferencias genéticas existentes entre las poblaciones de *T. cruzi* estudiadas, lo que permite apoyar la estructura clonal de las poblaciones naturales de este parásito.

## ABSTRACT

In this work *Trypanosoma cruzi* populations and clones belonging to the predominant zymodemes in Chile (Z1 and Z2) were studied. These groups are radically different and are separated by large genetic distances.

The parameters analysed are: the capacity of *in vitro* differentiation of epimastigote to trypomastigote forms, the experimental infection course on a murine model, infectivity of cells in culture, glycoconjugate recognition by lectins, susceptibility to complement mediated lysis in the presence of antibodies and the antigenic analysis of trypomastigote forms with immune sera elicited against parasites from both zymodeme types.

Parasites belonging to the zymodeme Z1 displayed high *in vitro* differentiation capacity, they generated high parasitemias in mice and infections on tissue culture cells. On the contrary, the Z2 group displayed low *in vitro* differentiation percentages, subpatent parasitemias in mice and low infection capacity on tissue culture cells.

Immune sera elicited against Z1 populations were able to trigger complement mediated lysis of Z1 parasites, although the lytic reactivity was strain depend. Antibodies against Z2 parasites were unable to lyse Z1 parasites although the cellular forms used as target cells, either blood trypomastigotes, metacyclics or tissue culture derived forms diverged on the susceptibility to complement mediated lysis, the last two forms being the most susceptible ones. The antigenic analysis by Western blot allowed the preferential detection of antigens with a mol weight of over 90.000. The immune sera with no lytic activity detect weakly only a few antigens. On the contrary, these immune sera with lytic activity detect several major antigens. Two of these antigens have a mol weight of 90.00 and 112.000 and were detected on several strains studied. The analysis of surface antigens labelled with <sup>125</sup>I-iodine by means of an immune sera with lytic activity showed the selective recognition of a protein with a mol. weight of 110.000, on the contrary, the non lytic immune sera detect a protein of 40.000.

All together these results show that differences on the biological and biochemical parameters analysed correlate with the genetic differences between the *T. cruzi* populations studied, aspect that supports the clonal structure of the natural populations of the parasites.

## ABREVIATURAS

$\beta$ ME	$\beta$ -mercaptoetanol
BCIP	5-bromo-4 cloro-3-indolil-fosfato
BSA	albúmina de bovino
C'	complemento humano
CON-A	<i>Canavalia ensiformis</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAk	DNA kinetoplastico
SBF	suero bovino fetal
HCl	ácido clorhídrico
KCl	cloruro de potasio
$K_2HPO_4$	fosfato dibásico de potasio
$KH_2PO_4$	fosfato monobásico de potasio
M	Molar
mg	miligramo
$MgCl_2$	cloruro de magnesio
mM	milimolar
NaCl	cloruro de sodio
$NaH_2PO_4$	fosfato monobásico de sodio
$Na_2HPO_4$	fosfato dibásico de sodio
NBT	nitro azul tetrazolium
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	tampón fosfato salino

PM	peso molecular
PNA	lectina de <i>Harachis hypogaea</i>
P/V	peso/volumen
PMSF	fenil metil sulfonil fluoruro
rad	unidad de radiación
SDS	dodecil sulfato de sodio
SBA	lectina de <i>Glycine maxima</i>
TAU	orina artificial de triatomíneos
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TEMED	NNN'N-tetrametilen-etilen-diamino
TLCK	tosil-L-lisina clorometil cetona
PLCK	L-1-tosilamida-2-fenil-etil clorometil
TRIS	TRIS (hidroximetil) aminometano
ug	microgramo
v/v	volumen volumen
WGA	lectina de <i>Triticum vulgaris</i>

## INTRODUCCION

### 1. *Trypanosoma cruzi*:

#### Características generales:

*Trypanosoma cruzi* pertenece al Phylum Protozoa, Superclase Mastigophora los cuales son protozoarios flagelados que no poseen cromatóforos, Orden Kinetoplastida, cuyos miembros presentan uno a cuatro flagelos y un organelo autoreplicable, el kinetoplasto, que contiene DNA, Familia Trypanosomatidae, en la cual están incluidos varios géneros de flagelados. Los tripanosomas son flagelados digenéticos (parásitos con alternancia de evolución en hospedadores invertebrados y vertebrados) que presentan durante su ciclo evolutivo diferentes formas celulares. Pertenecen al grupo Stercorarea ya que se trata de tripanosomas que evolucionan a lo largo del tubo digestivo del vector y cuya transmisión se realiza a través de las heces. El subgénero es Schizotrypanum, que engloba los tripanosomas de kinetoplasto voluminoso que se reproducen intracelularmente de modo regular (Brener, 1985).

*Trypanosoma cruzi* es transmitido al vertebrado cuando el insecto vector, al alimentarse deposita en la piel, heces u orina que contienen la forma infectiva tripomastigota metacíclico. Los parásitos invaden el cuerpo a través de la lesión producida por la picada del insecto o penetran activamente la membrana de la mucosa (Brener, 1972; Brener, 1973; Brener y Alvarenga, 1979; Apt y Reyes, 1986b; Andrews y col., 1987).

*Trypanosoma cruzi* circula en la sangre en la forma tripomastigota no proliferativa. Después de la interiorización del parásito a la célula hospedadora, los tripomastigotas demoran cerca de 3 horas en reorganizarse en la forma amastigota, las que permanecen más o menos durante 35 horas antes de comenzar a dividirse. Cerca de 9 divisiones asincrónicas ocurren para dar

origen a aproximadamente 500 amastigotas. Los amastigotas se transforman nuevamente en tripomastigotas, los cuales producen lisis celular y continúan la infección (Dvorak e Hyde, 1973).

En el insecto vector los tripomastigotas sanguíneos se transforman en epimastigotas los cuales se multiplican en el intestino medio (Chagas, 1909; Atias y Apt, 1991). En la porción distal del intestino y recto, los epimastigotas se diferencian a la forma infectiva tripomastigota metacíclico (Fig. 1).

Los vectores de la enfermedad de Chagas corresponden a insectos de la sub-familia *Triatominae*. Los géneros más importantes en la transmisión del parásito son: *Triatoma* (con 30 especies), *Panstrongylus* (con 10 especies) y *Rhodnius* (con 10 especies).

En Chile, los vectores están representados por 2 especies del género *Triatoma* distribuidas desde la I a la VI Región, *T. infestans* y *T. spinolai*. Cada una de ellas cumple un rol epidemiológico distinto, asociándose la primera al ciclo de transmisión doméstico y la segunda al ciclo silvestre (Apt y Reyes, 1986).

En condiciones experimentales de laboratorio es posible obtener, con relativa facilidad, formas epimastigotas en cultivos acelulares axénicos en cantidades apropiadas para realizar diversos estudios.

Los tripomastigotas infectivos se pueden obtener como formas:

- a) tripomastigotas metacíclicos mediante diferenciación espontánea a partir de epimastigotas de cultivos acelulares o mediante inducción en medios definidos (Contreras, 1981; Crane y Dvorak, 1982; Contreras, 1985).
- b) tripomastigotas sanguíneos de ratones infectados, los que pueden haber sido inmunosuprimidos previamente.
- c) tripomastigotas de cultivos celulares donde se realiza el ciclo infectivo "in vitro".

Aún cuando se dispone de estas 3 fuentes de obtención de las formas infectivas tripomastigotas, el bajo rendimiento y los altos costos constituyen serias limitantes para los estudios en esta forma del parásito.

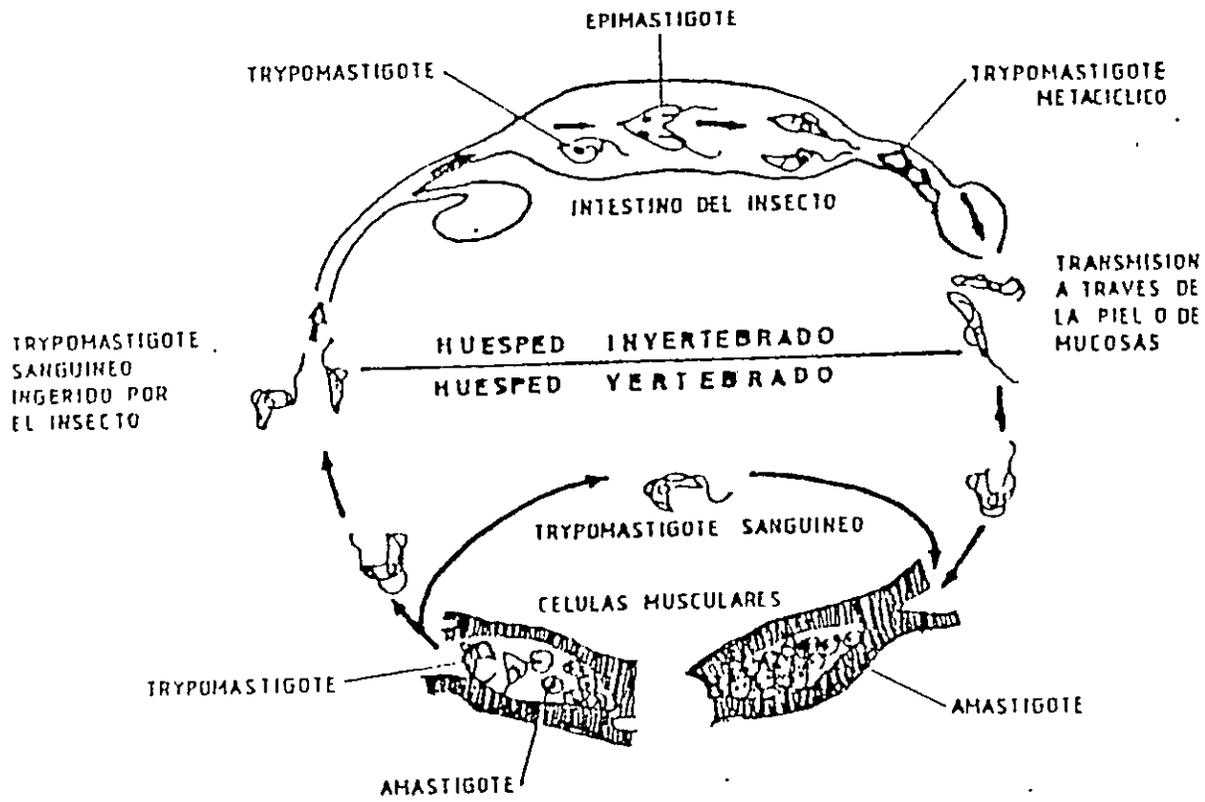


Fig. 1. Ciclo vital de *T. cruzi*

## 2. Enfermedad de Chagas

*Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, la que constituye uno de los problemas parasitarios humanos más importantes del continente americano. Actualmente se estima que existen entre 16-18 millones de personas infectadas y 90 millones con riesgo de infección (Moncayo-Medina, 1987).

Datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (Moncayo-Medina, 1987) revelan que un 62% de los individuos en fase crónica no tiene síntomas, un 27% presenta el cuadro cardíaco, un 3% el cuadro digestivo (megaesófago y/o megacolon) y un 8% ambos cuadros.

## 3. Heterogeneidad de las poblaciones naturales de *T. cruzi*

La enfermedad de Chagas puede presentarse en una variedad de formas, desde una infección aguda fulminante hasta una infección crónica inaparente. Los factores involucrados en la patogenia no han sido dilucidados, sin embargo, hay evidencias que apoyan la idea que tanto variaciones en el genotipo del parásito (Dvorak, 1984; Wagner y So, 1990), como del hospedador (Trischmann y col., 1978; Trischmann, 1986), pueden influenciar profundamente el desarrollo de la interacción huésped parásito.

En la década del 60 se propuso por primera vez, (Lambrecht, 1965) que el grupo de organismos conocidos como *Trypanosoma cruzi* estaría, en la naturaleza, constituido por una población genéticamente heterogénea y que dicha heterogeneidad genómica podría ser un factor determinante en la diversidad de manifestaciones de la enfermedad de Chagas.

Mediante técnicas electroforéticas se pueden observar diferencias en patrones isoenzimáticos en el parásito, correspondientes a variaciones fenotípicas que pueden ser directamente relacionadas con variantes genéticas de *T. cruzi* (Miles y col., 1984; Romanha y Brener, 1988; Breniere y col., 1991).

Los patrones isoenzimáticos fueron primero utilizados por Toyé (1974) quién a través de ellos, demostró variabilidad en distintos aislados de *T. cruzi*. Posteriormente, se estudiaron muestras del norte de Brasil (Miles y col., 1981b), las cuales se pudieron clasificar en 3 grupos de zimodemas o conjuntos de poblaciones de parásitos que presentan un perfil isoenzimático común, (Ready y Miles, 1980; Miles, 1985). El grupo Z1 se encontró asociado al ciclo silvestre de la enfermedad, el Z2 al ciclo de transmisión doméstica y el grupo Z3 a muestras provenientes de armadillos y de sus vectores específicos. Los 3 zimodemas eran capaces de infectar humanos y de causar cuadros agudos. Sin embargo, los cuadros crónicos eran casi exclusivamente causados por parásitos del tipo Z2. Esta predominancia del grupo de parásitos Z2 en pacientes de fase crónica ha sido señalada por otros autores (Luquetti y col., 1986; Romanha y col., 1988).

La relación entre la forma clínica de la enfermedad de Chagas y los zimodemas de *T. cruzi* fue señalada por Miles y col. Ellos observaron la predominancia de parásitos Z2 en pacientes del este y centro de Brasil, donde se sabe que los pacientes desarrollan megaesófago y megacolon. Por otro lado, notaron la ausencia de parásitos del tipo Z2 en Venezuela, donde los pacientes desarrollan principalmente cardiopatías (Miles, 1985). En otros estudios, sin embargo, no se ha observado relación entre formas clínicas y zimodemas (Brener, 1985; Romanha y Brener, 1988; Acosta y col., 1988).

Estudios isoenzimáticos que abarcan un gran número de poblaciones de *T. cruzi* y una mayor cantidad de *loci* genéticos analizados, han permitido conocer la magnitud de variabilidad genética existente en las poblaciones. El análisis de 542 poblaciones provenientes de diversos hospedadores, vectores y regiones geográficas, reveló la existencia de 43 grupos de parásitos, los cuales correspondían a subclasificaciones de los 3 zimodemas descritos anteriormente (Tibayrenc y col., 1986; Tibayrenc y Ayala, 1988; Tibayrenc y col., 1990; Tibayrenc y Ayala, 1991). A pesar de que se analizó un alto número de *loci* genéticos (15 sistemas isoenzimáticos), se encontró un número relativamente discreto de grupos de parásitos, lo que llevó a proponer a Tibayrenc (1986) que cada uno de estos grupos representaría distintos clones de parásitos

distribuidos en las diversas poblaciones naturales del protozoo. Estos mismos grupos se encontraron en distintas regiones geográficas, hospedadores mamíferos y vectores (Tibayrenc y Ayala, 1988).

### **Teoría clonal de las poblaciones naturales de *T. cruzi***

En los últimos 20 años, se han realizado progresos importantes en el campo de la caracterización de cepas de parásitos, gracias al desarrollo de nuevos marcadores moleculares como son las isoenzimas o las sondas de DNA (Macina y col., 1987).

Tibayrenc y Ayala (1988), propusieron que mediante la interpretación de datos moleculares sobre una base teórica de genética de poblaciones, se puede saber si las poblaciones están aisladas entre sí desde un punto de vista genético. En el caso de los parásitos, se puede determinar si las cepas son entidades genéticas que persisten como tales a través de las generaciones o si, por el contrario, son variantes individuales inestables, que duran solamente el tiempo de una generación. Los estudios de este tipo están centrados en el modo de reproducción del parásito en sus poblaciones naturales.

Mediante el análisis de la distribución de los genotipos en las poblaciones es posible determinar en parásitos protozoarios y otros organismos microbianos, si el modo de reproducción es predominantemente sexual o clonal. Los criterios que se analizan están relacionados con dos pruebas clásicas de genética de poblaciones: el equilibrio de Hardy-Weinberg y el desequilibrio de ligamiento.

En general, las poblaciones de especies sexuales muestran equilibrio de Hardy-Weinberg y el equilibrio de ligamiento o desviaciones débiles de ellos. Por esto, desviaciones importantes de las predicciones de estas pruebas, son consideradas como pruebas indirectas de la ausencia de reproducción sexual o de que ésta está restringida en la especie en estudio (Zhang y col., 1988). En este caso, en genética de poblaciones se habla de propagación clonal (situaciones donde la descendencia es genéticamente idéntica al individuo

parental, excepto por la incorporación de mutaciones). Esto se puede observar no solamente en el caso de divisiones mitóticas simples (clonalidad en sentido estricto), sino también en varios casos de partenogénesis o de autofecundación. Es importante señalar que el modelo clonal no implica que la recombinación esté totalmente ausente, sino más bien que ésta es escasa aún en escala evolutiva, de tal manera que las consecuencias del modo de reproducción clonal persisten. En tal sentido, este modelo es compatible aún con experimentos exitosos que prueben recombinación genética en el laboratorio.

En *T. cruzi*, los extensos estudios realizados en poblaciones naturales han llevado a proponer una estructura de población clonal (Tibayrenc y col., 1986; Tibayrenc y col., 1990; Tibayrenc y Ayala, 1991). Esto se basa en que las dos consecuencias genéticas fundamentales de la reproducción sexual, que son segregación de alelos y recombinación entre loci estarían ausentes o severamente restringidas. Cabe hacer notar que en condiciones experimentales de laboratorio no ha sido posible observar recombinación genética entre poblaciones de *T. cruzi* pese a que bajo las mismas condiciones en otras especies de tripanosoma se ha logrado (Jenni y col., 1986).

Según el concepto de clonalidad, los clones naturales se comportan en gran medida como entidades genéticas independientes, por lo tanto, es posible esperar que la variabilidad genética del parásito, demostrada mediante estudios isoenzimáticos, esté correlacionada con características biológicas del parásito.

En la literatura existen algunas evidencias que apoyan la idea de que existe correspondencia entre clasificación bioquímica y otras propiedades biológicas del parásito (Andrade y col., 1983; Andrade y col., 1985) tales como: cinética de crecimiento en cultivos acelulares (Dvorak y col., 1980; Piras y Henríquez, 1983; Katzin y col., 1983), desarrollo del parásito en el insecto vector (García y Dvorak, 1982), especificidad de vector (Schenone y col., 1985), propiedades farmacológicas *in vitro* (Barnabé y col., 1983; Andrade, 1985), especificidad de unión de anticuerpos monoclonales (Andrade y col., 1983; Flint y col., 1984; Kirshoff y col., 1984; Chapman y col., 1984; Orozco y col., 1984; Andrade, 1985; Mortara y col., 1988; Yoshida y

col., 1989), propiedades patogénicas (Miles y col., 1981a; Luquetti y col., 1986), polimorfismo de fragmentos de restricción de DNA kinetoplasmático (Engels, 1981; Morel y Simpson, 1980; Morel, 1984; Goncalves y col., 1984; Goncalves y col., 1985; Carreño y col., 1987). Sin embargo, aún es necesario obtener nuevas y más completas evidencias a través de diversos criterios para establecer si realmente existe correspondencia entre clasificación bioquímica y otras propiedades biológicas. De establecerse dicha correlación, se apoyaría el postulado de la estructura clonal de las poblaciones de *T. cruzi*.

Concordante con la idea anterior, los distintos aspectos biológicos y moleculares del parásito que sería relevante estudiar, podrían ser:

#### **A. Metaciclologénesis**

La forma infectiva de *T. cruzi* en la naturaleza es la forma tripomastigota metacíclica de la orina del triatomíneo, por lo tanto, la transformación de la forma epimastigota a tripomastigota infectiva, que se denomina metaciclologénesis, es de gran importancia para la mantención del ciclo del parásito y podría influenciar enormemente el curso de la infección producida por las diferentes cepas. Este proceso puede ocurrir espontáneamente en cultivos envejecidos de epimastigotas (Chagas, 1909). Se estableció que este fenómeno ocurre sólo al final de la fase exponencial de crecimiento (Camargo, 1964) y se postularon dos hipótesis para explicarlo: a) la existencia de un metabolito que induce la diferenciación, que se acumularía en el tiempo, y b) la falta de algún componente nutricional en el medio de cultivo que gatillaría la diferenciación. Hasta el momento, se han dado evidencias que apoyan ambas hipótesis (Castellani y col., 1967; Fernández, 1969; Cáceres y Fernández, 1976; Chiari y col., 1980; De Isola y col., 1981). Se demostró la relevancia de la hemina al aplicar cantidades crecientes de esta sustancia y observar que simultáneamente se incrementaba la diferenciación del parásito (Sher y col., 1983; Arévalo y col., 1985). La metaciclologénesis es también favorecida por medios de cultivo especiales tales como el medio LMC (Dusanic, 1980) o medio de cultivo de tejidos de insectos Grace

(Sullivan, 1982). Se ha descrito que la adición de 10% de suero de ternera recién nacida, varios azúcares y pH 5,5 (Cáceres y Fernández, 1976), son condiciones requeridas para la diferenciación. También se ha favorecido la metacicloogénesis a través del co-cultivo con células de insectos y la adición de extractos de insectos (Wood y Pipkin, 1969; Wood y Sousa, 1976). Se ha observado que el estómago e intestino de vinchucas alimentadas inducen un alto porcentaje de diferenciación (De Isola y col., 1981). Actualmente, se sabe que un péptido de 20 aminoácidos de la cadena de  $\beta$  globina es el inductor de la diferenciación (Torres y Flavvia, 1993). Estudios recientes tendientes a demostrar el rol del AMP cíclico y activadores de la adenilato ciclasa sobre la metacicloogénesis, han revelado que la adición de estos metabolitos al cultivo, estimula también significativamente la transformación de epimastigotas a tripomastigotas (González-Perdomo y col., 1988; Rangel-Aldao y col., 1988).

Se ha inducido metacicloogénesis *in vitro* (Contreras, 1981), utilizando un medio que simula la composición iónica de la orina de triatomíinos (medio TAU). En este estudio, realizado en algunas cepas no clonadas se obtuvo tasas de diferenciación siempre mayores del 50% y en algunas de ellas superiores al 90% en períodos que oscilan entre 5 a 7 días.

En este mismo modelo de diferenciación *in vitro*, se estudió la capacidad de diferenciación de epimastigotas a tripomastigotas en el clon Dm28c (Contreras y col., 1985b), obteniéndose más del 95% de tripomastigotes metacíclicos al sexto día de incubación.

Faltan aún por realizar, sin embargo, estudios comparativos de la capacidad de diferenciación de cepas pertenecientes a diferentes zimodemas.

## **B. Infectividad en ratón**

Para realizar estos estudios es necesario amplificar la población de parásitos aislada inicialmente, a través de pasajes seriados en el vertebrado, de tal manera que las poblaciones establecidas puedan ser mantenidas en forma estable bajo condiciones experimentales. Con estas poblaciones individuales de tripomastigotas sanguíneos se puede investigar el curso de

la infección en un modelo experimental en ratón. La evaluación de la infección se realiza a través del período pre-patente, curva de parasitemia o virulencia y tasa de mortalidad o patogenicidad.

La virulencia de una cepa es la mayor o menor capacidad de multiplicación del parásito en los tejidos. La patogenicidad en cambio se define como la capacidad de determinar lesiones tisulares que pueden llevar a los animales a la muerte, en diversas fases de la infección dependiendo de los órganos afectados (Andrade, 1974). Andrade propuso un patrón de clasificación biológica para distintas cepas en estudio. El primer grupo comprendía cepas de alta virulencia y patogenicidad representadas por la cepa peruana y la cepa Y. Un segundo grupo de mediana virulencia y patogenicidad, representado por la cepa Sao Felipe y un tercer grupo con muy baja patogenicidad y una lenta pero elevada parasitemia, representada por la cepa Colombiana.

Dentro de una misma cepa es posible evidenciar heterogeneidad en su virulencia y patogenicidad. Por ejemplo, se ha demostrado virulencia y patogenicidad polar en ratones para 2 clones de la cepa Sylvio-X10. La cepa original en cambio, presentó un comportamiento intermedio entre sus 2 clones (Postan y col., 1983).

Otros autores, (Marques de Araujo y Chiari, 1988) realizaron un estudio comparativo de 3 cepas de *T. cruzi* y sus respectivos clones reafirmando, a través de sus resultados la posibilidad que dentro de una cepa coexistan varias subpoblaciones, las cuales pueden o no expresarse dependiendo del tipo de manipulación o factores de selección presentes. Se han observado, también, diferentes grados de heterogeneidad entre las cepas y dentro de ellas. Entre los clones de las cepas Y y CL se encontraron diferencias intragrupos bastante significativas, mientras que los clones de las cepas MR presentaron mayor homogeneidad.

Existen trabajos experimentales que indican que la virulencia de una cepa de *T. cruzi*, es un carácter intrínscico (Schlemper, 1982). No se ha detectado correlación entre el número de parásitos derivados de vectores y el curso de la infección, por lo que ésta estaría aparentemente mas influenciada por la virulencia del parásito que por el tamaño del inóculo. Inóculos en el

rango de  $5,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^7$  parásitos por ratón, indujeron similares infecciones de bajas virulencias. Inóculos pequeños de  $5 \times 10^3$  tripomastigotas metacíclicos por ratón de diferentes cepas, provocaron infecciones de virulencias bajas, intermedias y altas. Un punto importante señalado por Schlemper es que la mayoría de las cepas aisladas de pacientes humanos brasileros son de baja virulencia, por lo que son necesarios más estudios en estas poblaciones de parásitos que a menudo son olvidadas debido a su difícil adaptación a los modelos animales. Desde este punto de vista, es relevante comparar las poblaciones de parásitos Z1 y Z2 provenientes de pacientes y vinchucas, en base a dichos criterios de virulencia y patogenicidad.

### C. Infectividad en células de cultivo de formas tripomastigotas

*Trypanosoma cruzi* pertenece a la clase de parásitos que necesariamente deben penetrar a la célula hospedadora para completar su ciclo biológico. El éxito del parásito en la invasión celular es el resultado de varios eventos secuenciales. Adhesión celular es un proceso mediado por receptores específicos y puede iniciar el proceso de endocitosis por el cual los organismos son interiorizados en las células en una vacuola fagocítica. Luego los parásitos escapan de las enzimas lisosomales del fagosoma, lo que sería realizado por una hemolisina activa a pH bajos (Andrews, 1990).

El fenómeno de interiorización podría ser considerado como una adaptación evolutiva de *Trypanosoma cruzi* para escapar del ataque inmunológico. Diferencias en la capacidad de invadir células por diferentes cepas, podrían influenciar el curso posterior de la infección (Osuna y col., 1984).

En este sentido, algunos autores han demostrado una gran diferencia en la habilidad para penetrar macrófagos de ratón *in vitro* de las formas tripomastigotas de la cepa Y con respecto a la cepa CL, siendo la primera 20 a 30 veces más infectiva (Alcántara y Brener, 1978; Kipnis y col., 1979). Cuando se utilizó macrófagos de pollo en cultivos *in vitro* también demostraron que tripomastigotas de la cepa Y son más infectivos que la cepa CL, obteniéndose

después de 6 horas de contacto que el 80% y el 40% de las células se infectaron con la cepa Y y CL, respectivamente. La diferencia fue también acentuada si se considera el número promedio de parásitos por célula (Meirelles y col., 1980). Otros autores (Bertelli y Brener 1980) infectaron células de cultivo Vero con formas sanguíneas colectadas durante el momento de más alta parasitemia inducida por la cepa Y y la cepa CL, obteniéndose un 11,8% y 0,1% de infección, respectivamente.

#### **D. Susceptibilidad de formas tripomastigotas a sueros inmunes**

El rol protector de los anticuerpos ha sido demostrado por transferencia pasiva de suero inmune total (Kagan y Norman, 1961; Kierszenbaum y Howard, 1976; Krettl y Brener, 1976) o fracciones de IgG purificada (Stefani y col., 1983; Takehara y col., 1990). Se han descrito anticuerpos protectores (llamados líticos), presentes en el suero de ratones crónicamente infectados y que estarían dirigidos en contra de epítomos presentes sólo en tripomastigotas vivos (Krettl y Brener, 1982). Estos anticuerpos son detectados por el ensayo de lisis mediada por complemento y dependiente de anticuerpo (Ansiano y col., 1972; Krettl y col., 1979; Kierszenbaum y Ramírez, 1990). En la enfermedad de Chagas también se inducen anticuerpos llamados convencionales, es decir, aquéllos que están involucrados en el diagnóstico, reconocen epítomos en parásitos fijados, no son detectados por el ensayo de lisis y no participan en la resistencia del hospedador. Anticuerpos líticos y convencionales son detectados durante la infección activa por *T. cruzi*, mientras que sólo anticuerpos convencionales son inducidos por inmunización con antígenos de *T. cruzi* (Krettl, 1982).

Pacientes chagásicos sometidos a quimioterapia específica y tratamiento en infecciones experimentales en ratón han dado evidencias que los anticuerpos líticos desaparecen cuando la parasitemia también desaparece; sin embargo, los anticuerpos convencionales permanecen por algún tiempo (Krettl y col., 1982; Lages-Silva y col., 1987). Esto llevó a los autores a proponer a la desaparición de los anticuerpos líticos como un criterio de cura (Krettl y col.,

1982; Krettl y col., 1984). Sin embargo, aún no está claro el rol de los anticuerpos líticos (Andrade y Pimentel, 1991; Andrade y col., 1991), ya que existen datos en la literatura, que señalan que existen diferencias en la resistencia a la lisis mediada por complemento, dependiendo de la cepa de *T. cruzi* (Krettl y col., 1979; Murfin y Kuhn, 1988). Más aún, se han descrito cepas de *T. cruzi* que serían incapaces de inducir anticuerpos líticos en ratón y conejo (Müller y col., 1987). Sin embargo, no existen hasta el momento estudios comparativos acerca de la capacidad de inducción de anticuerpos líticos y la resistencia de cepas pertenecientes a distintas zimodemas a la acción de los anticuerpos líticos.

Se ha estudiado la naturaleza de los antígenos inductores de anticuerpos líticos y se demostró que, anticuerpos en contra de una proteína específica se correlacionaba con la capacidad lítica del suero, a pesar de que sueros de pacientes con enfermedad de Chagas crónico, reconocen muchos de los antígenos de *T. cruzi*, (Norris y col., 1989). Pacientes tratados, cuyos sueros no poseen actividad lítica, mantenían títulos altos de anticuerpos dirigidos contra otros antígenos, sin embargo, no se encontró reactividad frente al antígeno específico. Esta glicoproteína se encuentra expresada en tripomastigotas metacíclicos y derivados de cultivos celulares y no se detecta en formas epimastigotas y amastigotas.

#### **E. Detección de glicoconjugados mediante lectinas**

El estudio de los residuos de carbohidratos de la membrana celular está ampliamente fundamentado, ya que existe información de que los glicoconjugados participan en los procesos de adherencia y penetración a la célula hospedadora (Alves y Colli, 1974; Henríquez y col., 1981a; Henríquez y col., 1981b; Zingales y col., 1982; Andrews y Colli, 1982; Andrews y col., 1984; Zimmerman y col., 1987), evasión de la respuesta inmune (Nogueira y Cohn, 1976; Nogueira y col., 1980; De Arruda y col., 1989; Jazin y col., 1991) e inducción de anticuerpos líticos (Yoshida, 1986; Norris y col., 1989; Almeida y col., 1991).

Las lectinas constituyen una herramienta adicional para diferenciar grupos de cepas de *T. cruzi*, ya que éstas son capaces de reaccionar específicamente con carbohidratos accesibles en glicoproteínas (Lis y Sharon, 1986).

Mediante aglutinación inducida por lectinas se han estudiado diversos aislados de *T. cruzi* (Chiari y col., 1978). Utilizando este mismo criterio (Schottelius, 1982., Schottelius y Uhlenbruck, 1983), diferentes cepas epimastigotas fueron separadas en 2 grupos: a) cepas aglutinadas por la lectina *Arachis hypogaea* (PNA) y que no reaccionan con la lectina de *Triticum vulgare* (WGA), que correspondían al zimodema Z2. En otros estudios, sin embargo, las cepas de *T. cruzi* reaccionaron en forma diferente con WGA (Pereira y col., 1980; Araujo y col., 1980; Araujo-Jorge y De Souza, 1986; Vivas y Urbina, 1982).

La utilización de otras lectinas para diferenciar poblaciones de *T. cruzi*, no han permitido llegar a resultados concluyentes, ya que en algunos casos una misma cepa de parásito presenta diferentes patrones de reacción frente a una misma lectina. Las cepas Y y CL presentaron reacción con la lectina *Glicine maxima* (SBA) (Marinkelle y col., 1986; Schottelius, 1982). En otro trabajo, las mismas cepas no presentaron reacción con dicha lectina (Araujo y col., 1980).

Otras lectinas muestran un perfil similar de reacción con diferentes poblaciones de parásitos (Marinkelle y col., 1986; Araujo y col., 1980; Schottelius, 1982; Pereira y col., 1980).

En estudios más recientes en los cuales se utilizaron insectos vectores alimentados con parásitos pertenecientes al zimodema Z1, se encontró que todas las formas de parásitos localizadas en distintas porciones del intestino del vector, presentaron reacción con la lectina SBA. En cambio, ninguno de estos parásitos reaccionó con la lectina WGA (Schaub, 1989). Estudios similares realizados con parásitos clasificados como Z2 mostraron que todas las formas reaccionaban con la lectina SBA, pero no todas lo hacían con WGA.

Estos resultados mostraron que los parásitos Z1 mantuvieron el mismo patrón de reacción que había sido descrito previamente por otros autores en parásitos Z1 y Z2 de distinto origen (Schottelius, 1982; Schottelius y Uhlenbruck, 1983).

En general, los análisis anteriores mostraron que parásitos pertenecientes a un mismo zimodema podían ser caracterizados por un patrón común de reacción con lectinas, independiente de la fuente y forma celular de los parásitos, sin embargo, no todas las poblaciones de *T. cruzi* conservaban un mismo perfil de reacción con lectina. Es decir, existen cepas de parásitos en las cuales dependiendo de las formas celulares o fuentes del parásito (cultivo acelular, vector, sangre de mamífero, cultivo celular) los patrones de reacción con lectinas cambian (Pereira y col., 1980; Araujo y col., 1980; Araujo y De Souza, 1986; Vivas y Urbina, 1982).

En conclusión, los informes de la literatura indican que se requiere conocer en mayor profundidad la naturaleza e importancia fisiológica de los glicoconjugados presentes en la superficie del parásito. Es importante señalar que algunas discrepancias en las caracterizaciones de parásitos mediante lectinas, podrían estar dadas por la técnica empleada. Se ha demostrado, por ejemplo que la ausencia de aglutinación mediante una determinada lectina, no necesariamente significa la ausencia del receptor correspondiente (Stevens y col., 1988).

#### **F. Bases moleculares de los procesos de infectividad y evasión de la respuesta inmune**

Diversos estudios de antígenos de superficie de *T. cruzi*, han revelado que proteínas en el rango de peso molecular 80-90.000, estarían asociados a fenómenos de infectividad y evasión de la respuesta inmune.

Los primeros estudios realizados en formas tripomastigotas (Zingales y col., 1982; Andrews y col., 1984), revelaron la existencia de proteínas de peso molecular 85.000, implicadas en adhesión y penetración celular (Lima y Villalta, 1989). Otros autores (Teixeira y Yoshida, 1986), identificaron otras proteínas en el mismo rango de peso molecular involucradas en el proceso de adhesión. Asimismo, se demostró que una proteína de peso molecular 85.000 específica de tripomastigotas compartía propiedades funcionales y estructurales con el receptor de fibronectina (Ouassi y col., 1986). Anticuerpos monoclonales y

policlonales contra proteínas purificadas de tripomastigotas, eran capaces de inhibir la adhesión y penetración a células (Yoshida y col., 1990; Abuin y col., 1989). Estudios posteriores mostraron que antígenos implicados en adhesión y penetración, podían conferir resistencia a la infección aguda por *T. cruzi* en ratones (González y col., 1991).

Los primeros trabajos en los cuales se logró clonar una proteína de la forma infectiva, mostraron que ésta poseía secuencias de 9 aminoácidos repetidas en serie (Peterson y col., 1986). En estudios posteriores (Dragon y col., 1985; Beard y col., 1988; Peterson y col., 1989; Kahn y col., 1990), se demostró que estas proteínas eran codificadas por una familia heterogénea de genes repartidos en todo el genoma, los cuales se expresaban simultáneamente (Takle y col., 1989). De particular importancia son los resultados en los cuales se evidenció que en algunas proteínas clonadas existían secuencias repetidas homólogas a aquellas de neuraminidasa bacteriana (Prioli y col., 1990). Existen múltiples evidencias que involucran a la neuraminidasa en la capacidad de los parásitos de infectar células (Pereira, 1983; Harth y col., 1989; Prioli y col., 1990). En los primeros estudios se demostró que la expresión de la neuraminidasa se encuentra fuertemente aumentada en la forma infectiva (Pereira, 1983). Análisis con anticuerpos monoclonales contra la neuraminidasa revelaron que existía polimorfismo de esta enzima en distintas poblaciones de *T. cruzi* (Prioli y col., 1990).

Los estudios moleculares tendientes a dilucidar el mecanismo de la lisis mediada por complemento se han centrado en identificar a antígenos inductores de anticuerpos líticos (Martins y col., 1985). Al respecto se purificó una proteína de peso molecular 160.000 que sólo se expresaba en tripomastigotas metacíclicos y no en las formas epimastigotas y amastigotas. Anticuerpos policlonales en contra de esta proteína fueron capaces de lisar parásitos en presencia del complemento. Durante el proceso de purificación se observó que la proteína de 160.000 sufría una degradación la cual generaba un polipéptido de peso molecular 60.000. Sueros de pacientes chagásicos crónicos reconocen la proteína de 160.000. Otra proteína de peso molecular 90.000 también ha sido sugerida como inductora de anticuerpos líticos (Yoshida y col., 1990). Otros autores han identificado una glicoproteína de superficie, presente

exclusivamente en la forma infectiva, que acelera el decaimiento de las C3 convertasas del sistema de complemento humano (Joiner y col., 1988; Rimoldi y col., 1988). Al respecto se ha postulado que los factores que inhiben la formación de las C3 convertasas son los mismos antígenos que son reconocidos por los anticuerpos líticos, lo que impediría que éstos factores pudieran bloquear la activación del complemento determinando así un control negativo por parte del antígeno parasitario (Norris y col., 1989). Otros mecanismos que se ha propuesto para la evasión de la respuesta inmune son la redistribución e interiorización de antígenos de superficie mediante fenómenos conocidos como "capping" y "shedding" (Schmunis y col., 1978 y Schmunis y col., 1980) y excreción-secreción de antígenos de superficie (Ouassi y col., 1990; Goncalves y col., 1991).

## HIPOTESIS DE TRABAJO

Si la estructura de poblaciones del parásito *T. cruzi* es clonal, la distribución de la variabilidad fenotípica debería reflejar la existencia de entidades genéticas independientes. Por lo tanto, la hipótesis de trabajo propuesta es que existe correspondencia entre la clasificación isoenzimática y otras características fenotípicas (biológicas, bioquímicas e inmunológicas).

### Propósito de la Tesis

El propósito específico de esta tesis es estudiar si existe correspondencia entre clasificación isoenzimática de cepas de *T. cruzi* con otros parámetros fenotípicos como son:

- a) Capacidad de diferenciación *in vitro* de formas epimastigotas a tripomastigotas.
- b) El curso de la infección experimental en un modelo murino.
- c) Capacidad de infectar células en cultivo.
- d) Susceptibilidad de formas tripomastigotas sanguíneos, metacíclicos y derivados de cultivo celular, a lisis mediada por complemento en presencia de anticuerpos.
- e) Reconocimiento de glicoconjugados mediante lectinas.
- f) Reconocimiento antigénico mediante sueros inmunes en formas tripomastigotas.

Si estas características fenotípicas analizadas se correlacionan, será posible apoyar la estructura clonal de las poblaciones de *T. cruzi*.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Procedencia de los reactivos.

Sigma Chemical Company, Saint Louis, Mo, USA: 2-Mercaptoetanol, N,N' metilen-bis-acrilamida, TEMED, SDS, glucosa, ácido aspártico, ácido glutámico, prolina, NP-40, Tritón X-100, TLCK, PMSF, Leupeptina, bisulfito de sodio, Pepstatina, Lectinas fluoresceinadas: *Arachis hypogaea*, *Canavalia ensiformis*, *Glycine maxima*, *Triticum vulgare*, D-galactosa, D-glucosa, NAc-D-glucosamina, alfa metil manósido. Anti-IgG de ratón conjugada a isotiocianato de fluoresceína anti-IgG de ratón conjugada a fosfatasa alcalina, sustratos para fosfatasa alcalina: BCIP, NBT, yodogen. Suero bovino fetal, NaCl, KCl, Medio RPMI-1640, hemina, glicerol, glicina, azul de bromofenol.

Difco, Detroit, Michigan, USA: Triptosa, Triptona, extracto de levadura.

Bio Rad Richmond, California, USA: Acrilamida, SDS, TEMED, anfolitos, pH 5-7 y pH 3-10, marcadores de peso molecular.

Amersham, Buckinghamshire England: Isótopo  $^{125}\text{I}$ -yodo radioactivo.

Whatman International Ltd. Madstone. England: DEAE-celulosa (DE-52).

Merck, Darmstadt, Alemania: EDTA,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KCl,  $\text{MgCl}_2$ .

### 2. Material biológico

**2.1. Caracterización Isoenzimática (zimodema) de poblaciones y clones de *T. cruzi*.** Las poblaciones y clones de *T. cruzi* utilizadas en este estudio fueron tipificadas por análisis isoenzimáticos realizados por Brenière y col. (1991) y Apt y col. (1987).

**2.2. Formas epimastigotas.** Fueron cultivadas en estufa a 28°C en medio líquido Diamond modificado pH 7,2 (Diamond, 1968) que contenía: Triptosa 6,25 g/l, Triptona 6,25 g/l, extracto de levadura 6,25 g/l, NaCl 6,25 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,06 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,06 g/l. Se suplementaron los medios de cultivo con hemina 19 µM y SBF inactivado 10%, glucosa 1%, penicilina 100 U.I./ml, estreptomicina 100 µg/ml y ampicilina 100 µg/ml.

Los parásitos se cultivaron en botellas de vidrio que contenían un volumen de 100 ml de medio de cultivo durante siete días hasta alcanzar una densidad aproximada de 40 a 60 X10<sup>6</sup> células/ml. Se realizaban subcultivos, traspasando la décima parte del volumen total a un medio de cultivo fresco.

**2.3. Tripomastigotas metacíclicos.** Se obtuvieron mediante inducción *in vitro* de la forma epimastigota a tripomastigota, según el método descrito (Contreras, 1981). Epimastigotas en fase de crecimiento exponencial fueron centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sedimento de células se lavó 2 veces en medio TAU: 190 mM NaCl; 17 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,035% NaHCO<sub>3</sub>; 8 mM Tampón fosfato de sodio pH 6,0; 10 mg/ml Rojo Fenol. Luego se resuspendieron los parásitos en el mismo medio a una densidad de 100x10<sup>6</sup> parásitos/ml y se incubaron durante 2 horas a 28°C. Finalizado este período se suplementó el medio TAU con 10 mM prolina; 2 mM ácido aspártico; 50 mM glutamato de sodio y 10 mM glucosa. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad. Las botellas que contenían la suspensión de parásitos se mantuvieron en estufa a 28°C durante 5 a 7 días. En este período se analizó diariamente la aparición de tripomastigotas metacíclicos, mediante observación morfológica en cámara de Neubauer.

**2.4. Tripomastigotas sanguíneos.** Se obtuvieron por inoculación de 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> formas tripomastigotas metacíclicos en ratones Balb/c irradiados vía intraperitoneal. La aparición de tripomastigotas circulantes se realizó mediante examen directo de una gota de sangre obtenida de la cola del ratón. Se realizaron trasposos sucesivos a ratones irradiados. Los ratones eran

anestesiados con éter y sangrados por vía axilar utilizando heparina como anticoagulante. La sangre se colectaba en tubos de plástico conteniendo bolitas de vidrio, las cuales impedían la formación de coágulo al ser agitadas. Se centrifugó a temperatura ambiente a 2.000 rpm durante 10 minutos con el objeto de sedimentar los glóbulos rojos. El sobrenadante que contenía los tripomastigotas se centrifugó a 8.000 rpm en medio RPMI-1640 suplementado con 10% SBF, se lavó 2 veces y se resuspendieron los parásitos en el mismo medio.

**2.5. Tripomastigotas de cultivos celulares.** Monocapas de células Vero (línea celular de epitelio de riñón) eran cultivadas en medio RPMI-1640 conteniendo 10% SBF. Los cultivos se realizaban en botellas plásticas desechables en incubador con ambiente de 5% CO<sub>2</sub> y humedad y 37°C. Para iniciar las infecciones de las células se utilizaron tripomastigotas sanguíneos. Una vez que las infecciones se establecieron, la producción de tripomastigotas fue mantenida infectando monocapas de células Vero con 75% de confluencia. Se cosecharon los tripomastigotas a partir del cuarto día post-infección. Los sobrenadantes cosechados se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 minutos, el sedimento se resuspendió en medio RPMI-1640 con 10% SBF y fue ajustado a una concentración final dependiendo del ensayo a utilizar.

### **3. Antisueros**

Sueros inmunes en contra de las diferentes poblaciones de *T. cruzi*, se obtuvieron inoculando grupos de 10 ratones Balb/c de 2 meses de edad. Cada ratón se inoculó con  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas por vía intraperitoneal. Los ratones fueron sangrados en el día 60 post infección por vía axilar, habiéndose observado en todos ellos, parasitemias patentes. Los sueros individuales se juntaron y se inactivaron por incubación a 56°C durante 30 minutos, luego se alicuotaron y se mantuvieron congelados a -80°C hasta su uso.

#### 4. Caracterización biológica

Ratones no irradiados Balb/c de 2 meses de edad se distribuyeron en grupos de 10 machos y 10 hembras por cada población de *T. cruzi* a inocular. Cada ratón recibió un inóculo de  $1 \times 10^5$  tripomastigotas sanguíneos vía intraperitoneal.

##### 4.1. Período prepatente.

La determinación del período prepatente de cada población de *T. cruzi* se realizó mediante el micrométodo descrito (Freilly y col., 1983). A partir del tercer día post-inoculación se sacó sangre de la cola de cada ratón con un tubo capilar heparinizado, luego se centrifugó y se obtuvo la fracción de la fase sobre los glóbulos rojos, la cual se colocó en portaobjeto y se analizó bajo microscopio.

##### 4.2. Curvas de parasitemia y mortalidad

Las curvas de parasitemia correspondientes a cada población de *T. cruzi* se realizó por recuento de los tripomastigotas sanguíneos a través del método descrito (Brenner, 1962), analizando 5  $\mu$ l de sangre colectada de la cola de cada ratón. El recuento de parásitos se realizó 3 veces por semana durante el tiempo en que los ratones permanecieron vivos, con un límite máximo de 60 días post-infección.

## 5. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta.

**5.1. Inmunofluorescencia indirecta en formas tripomastigotas vivas.** Tripomastigotas sanguíneos, metacíclicos y provenientes de cultivos celulares fueron lavados y resuspendidos en medio Dulbecco modificado con 10% SBF. Una alícuota de 100  $\mu$ l parásitos ( $5 \times 10^6$ /ml) fue incubada durante 30 minutos a 37°C con los sueros inmunes diluidos 1:10 en el mismo medio. Después de ser lavados y resuspendidos se agregó azida de sodio a concentración final de 0,2%. Luego los parásitos fueron incubados a 4°C durante 3 horas con una dilución 1:80 del conjugado fluoresceinado anti-IgG de ratón. Los parásitos vivos fueron observados bajo microscopio de fluorescencia (Norris y col., 1989).

**5.2. Inmunofluorescencia indirecta convencional.** Con formas epimastigotas fijadas se realizó según el método descrito (Camargo, 1966). Las formas epimastigotas fueron fijadas en placas de vidrio, secadas al aire e incubadas con sueros inmunes en diferentes diluciones. Luego se lavaron con PBS e incubaron con conjugado fluoresceinado anti-IgG de ratón durante 30 minutos. Se observó bajo microscopio de fluorescencia.

## 6. Experimentos de infectividad.

Células Vero fueron tripsinizadas y sembradas ( $1 \times 10^5$ ) en medio RPMI, 10% SBF en placas de plástico de 24 pocillos (3,5 cm. de diámetro) que contenían cubreobjetos estériles redondos. El medio fue removido después de 18 horas y las células fueron infectadas con  $5 \times 10^5$  tripomastigotas/pocillo. Se mantuvieron durante 3 horas en incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Después de este período el sobrenadante se lavó 3 veces con PBS (0,05M, tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 30 mM, NaCl). Las células se fijaron durante 10 minutos con solución de May Grünwald, se lavaron 3 veces con PBS y se tiñeron con colorante Giemsa diluido 1:10. Los cubreobjetos se secaron a temperatura ambiente y se fijaron en portaobjetos utilizando una

gota de Permout. La observación microscópica se realizó con objetivo de inmersión y se analizaron 200 células en cada caso. Se realizó la cuantificación de los parásitos adheridos a la superficie e interiorizados, los cuales eran distinguidos por la coloración del núcleo y kinetoplasto. Las infecciones fueron realizadas en cuadruplicado y los resultados fueron expresados como el número promedio de parásitos adheridos a la superficie e interiorizados por célula (Yoshida y col., 1989).

### 7. Ensayo de lisis mediada por complemento.

Se utilizó la técnica descrita por Krettl y col. (1979). Parásitos provenientes de ratones irradiados y cosechados 15 días post-infección se ajustaron a una concentración de  $4 \times 10^6$ /ml. La suspensión de parásitos se pre-incubó con igual volumen de complemento activo durante 30 minutos. Se lavó 2 veces con medio de cultivo Dulbecco modificado que contenía 10% SBF y se resuspendieron finalmente los parásitos a la misma concentración inicial. Se incubó 50 ul de la suspensión de parásitos con 50 ul de suero inmune a 37°C durante 30 minutos. Esta mezcla se separó en 2 alícuotas de 50 ul. Volúmenes iguales de complemento humano activo e inactivo fueron agregados a las muestras de 50 ul. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 45 minutos. El recuento de tripomastigotas-vivos se realizó en cámara de Neubauer. El porcentaje de lisis fue determinado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ lisis} = 100 - x \frac{\text{No de parásitos en tubo con C' activo}}{\text{No de parásitos en tubo con C' inactivo}}$$

El ensayo fue considerado positivo cuando se obtuvieron porcentajes de lisis fue superiores al 30%.

**7.1 Obtención de complemento.** Suero humano normal fresco de voluntarios de banco de sangre fue usado como fuente de complemento activo y el mismo suero incubado a 56°C durante 30 minutos, fue utilizado como complemento inactivo. El suero se guardó en pequeñas alícuotas a -80°C, hasta su uso.

## **8. Detección de residuos de carbohidratos mediante lectinas fluoresceinadas.**

### **8.1. Formas epimastigotas fijadas.**

Se realizó mediante la técnica descrita por Mutharia y Pearson (1987). En portaobjetos con 16 pocillos, se colocaron 5  $\mu$ l de una suspensión que contenía formas epimastigotas o tripomastigotas (3 a 4 millones de parásitos/ml) y se fijaron por secado a 28°C. Sobre los parásitos se depositaron 3  $\mu$ l de lectina fluoresceinada (dilución 1:10). Las lectinas utilizadas fueron: ConA (*Canavalia ensiformis*), SBA (*Glycine maxima*), PNA (*Arachis hypogaea*), WGA (*Triticum vulgaris*). La incubación se realizó en cámara húmeda y oscura durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaron las placas 3 veces con solución 0.15 M de NaCl y se dejó secar a temperatura ambiente y en oscuridad hasta el momento de la observación. Para la lectura de las placas se utilizó un microscopio Nikon Microphot-FXA.

Los controles de especificidad se realizaron utilizando los siguientes azúcares inhibidores: 0,2 M alfa metil D-manósido para Con A; 0,2 M D-galactosa para SB; 0,2 M D-galactosa para PNA y 0,2 M Nac D-glucosamina para WGA.

### **8.2. Detección de carbohidratos mediante lectinas fluoresceinadas en parásitos vivos.**

Formas tripomastigotas vivas se cosecharon de sobrenadante de células Vero a partir del sexto día post-infección. Los parásitos se lavaron 3 veces con PBS pH 7.3, 1% SBF, 0.01% azida de sodio a 4°C y se resuspendieron a una concentración de 3 a 4x10<sup>6</sup>/ml. 40  $\mu$ l de esta

suspensión se centrifugaron y resuspendieron en 40  $\mu$ l de la lectina fluoresceinada (dilución 1:10). La muestra se mantuvo en hielo hasta el momento de su observación (Mutharia y Pearson, 1987).

#### **9. Marcación de antígenos de superficie con $^{125}\text{I}$ -yodo.**

Se realizó según el método descrito por Markwel y Fox (1978), Zingales (1984) utilizando yodogen (1, 3, 4, 6-tetracloro-3-alfa-difenilglicoluril) como reactivo para la iodación. Las formas tripomastigotas fueron cosechadas y lavadas en medio RPMI-1640 y resuspendidas en 1 ml del mismo medio ( $1 \times 10^8$  parásitos/ml). Se incubó los parásitos en tubos cubiertos con yodogen. Se agregó  $^{125}\text{I}$ -yodo (200-500  $\mu\text{Ci}$ ) y se mantuvo durante 10 minutos en hielo con agitación. La muestra se cambió de tubo para detener la reacción y se diluyó con grandes volúmenes de medio RPMI-1640 frío (25 volúmenes). Se centrifugó a 2.000 x g durante 15 minutos a 4°C y se lavó 2 veces con 50 volúmenes de RPMI-1640. Se observó la motilidad de los parásitos como criterio de variabilidad. Se centrifugó a 2.000 x g y se resuspendieron los parásitos en tampón de lisis que contenía 1% v/v NP-40; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,5 mM TLCK, 1 mM PMSF, 6,3  $\mu\text{g/ml}$  leupeptina; 10 mM  $\text{NaHSO}_3$  y 1  $\mu\text{M}$  pepstatina) en una concentración de  $2-4 \times 10^8$  células/ml. La suspensión se incubaba durante 10 minutos a 37°C y el material insoluble era centrifugado a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue utilizado inmediatamente para inmunoprecipitación o fue guardado congelado a -80°C.

#### **10. Inmunoprecipitación de antígenos de superficie con proteína A de *Staphylococcus aureus*.**

Se mezcló 150  $\mu$ l de parásitos lisados, marcados con  $^{125}\text{I}$ -yodo, en volumen igual de tampón 2xNET (300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0). Se agregó 10 a 50  $\mu$ l de suero inmune y se incubó toda la noche a 4°C o por 2 horas a temperatura ambiente. Se

agregó 50-100  $\mu$ l de suspensión de *Staphylococcus aureus* al 10%. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 1 ml 0,05% v/v NP-40 en tampón NET y se centrifugó a 3.000 g por 15 minutos. Se lavó 1 vez en tampón NET y una vez con solución de lavado (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,6 0,1% SDS, 0,05% NP-40). El sedimento se resuspendió en 70  $\mu$ l de tampón de solubilización de muestra, que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 5% SDS; 10% glicerol; 0,5 mM EDTA; 75 mM beta-Mercaptoetanol y 0,005% azul de bromofenol. Se calentó durante 3 minutos a 100°C y se centrifugó en microcentrífuga Eppendorf durante 5 minutos (Kessler, 1975; Goding, 1978; Goding y Handman, 1984).

## **11. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes**

### **11.1. Preparación de la muestra.**

Formas tripomastigotas provenientes de cultivos celulares fueron lisadas utilizando un tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM  $\beta$ -Mercaptoetanol; 0,1 mM EDTA; 1% v/v NP-40; 1 mM PMSF; 0,5 mM TLCK; 10 mM bisulfito de sodio; 1 mM pepstatina). Se agregó 10  $\mu$ l del tampón por cada  $1 \times 10^6$  parásitos, luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos y se agregó igual volumen de tampón de muestra (0,08 M Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 5%  $\beta$ -mercaptoetanol; 12% glicerol; 0,012% azul de bromofenol). Se hirvió durante 3 minutos y se guardó congelado a -80°C hasta el momento de su uso.

### **11.2. Condiciones de electroforesis.**

Se realizó según el método descrito por Laemmli (1970), en el sistema electroforético "Bio-Rad" MINI PII. Las dimensiones del gel fueron 9 x 7,4 x 0,75 cm. Se utilizaron geles de separación al 7,5% y se colocó 5  $\mu$ l de muestra por carril, que contenían  $5 \times 10^6$  parásitos. Las corridas electroforéticas se desarrollaron a voltaje constante de 100 volts durante 1 hora.

## 12. Inmunoelectrotransferencia

La electrotransferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa se realizó en el sistema horizontal semi húmedo Sartoblot según especificaciones del manual (Sartoblot Electroblotting Manual). La transferencia se realizó a temperatura ambiente a intensidad constante 50 mA, durante 1 hora.

La incubación con los antisueros se realizó en dilución 1:20 (líticos) y 1:80 (no líticos). Como segundo anticuerpo se utilizó inmunoglobulina G anti-ratón conjugada a fosfatasa alcalina en dilución 1:1.000. El revelado se realizó con los reactivos BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) y NBT (nitro azul tetrazolium).

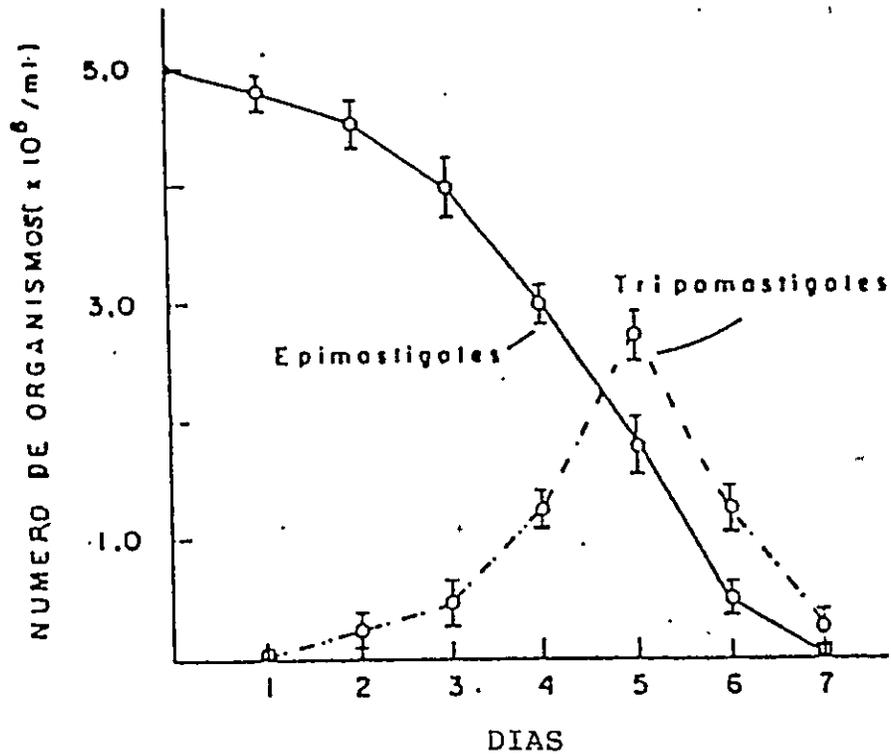
## 13. Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida

Se realizó según la técnica descrita por O'Farrel (1975), de electroforesis en gradiente de pH en condiciones de no-equilibrio (NEPHGE). El gradiente de pH se realizó con anfólitos en el rango de pH 3 a 10. La corrida electroforética se realizó durante 5,5 horas a 400 volts. Para la segunda dimensión se utilizó un gel 11,5% de poliacrilamida-SDS, según el método descrito por Laemmli (1970). Los marcadores de peso molecular fueron los siguientes: fosforilasa B, (97.000); BSA, (60.000); ovoalbúmina, (42.000); anhidrasa carbónica, (31.000); inhibidor de tripsina, (21.500) y lisozima, (14.000). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie, se secaron y sometieron a autoradiografía en película Fuji RX-036270, durante 14 días.

## RESULTADOS

### 1. Diferenciación *in vitro* de formas epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos.

Epimastigotas cosechados en la fase exponencial del cultivo, fueron incubados en medio salino definido, que simula artificialmente la orina de triatominos (TAU), para inducir su diferenciación *in vitro*. En la Fig. 2 se muestra la curva de diferenciación de la forma epimastigota a tripomastigota, de la cepa LQ (Z1) las cuales son morfológicamente distinguibles (Figs. 3 y 4). El tripomastigote posee un kinetoplasto posterior al núcleo, del cual emerge una membrana ondulante que recorre al parásito, el epimastigote en cambio, posee un kinetoplasto localizado por delante del núcleo y posee una corta membrana ondulante. Se observa en la Figura 2 que las formas tripomastigotas cepa LQ aparecen después de un período de latencia de 2 días, con un rendimiento máximo de diferenciación de 60-65%. Este método de diferenciación había sido descrito para el clon Dm28c con inóculos no mayores que  $5 \times 10^6$  parásitos/ml. Para determinar si esta limitación también existe para otras poblaciones de *T. cruzi*, se realizaron experimentos de diferenciación con la cepa LQ con inóculos mayores. Epimastigotas de cultivo en fase exponencial de LQ se diferenciaron a tripomastigotas hasta en concentraciones de  $100 \times 10^6$ /ml. Experimentos realizados con densidades de parásitos sobre  $250 \times 10^6$ /ml, resultaron con bajos porcentajes de diferenciación, menores a 30%.



**Fig. 2. Diferenciación "in vitro" de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos.**

Un cultivo de epimastigotas de la cepa LQ en fase de crecimiento exponencial en medio Diamond, fue cosechado, lavado e incubado en medio TAU de acuerdo a condiciones descritas en Materiales y Métodos (Contreras, 1981). Después de 2 horas de incubación a 28°C, se suplementó con los aminoácidos, prolina, ácido aspártico, ácido glutámico y se comenzó a evaluar el grado de diferenciación durante los días señalados en el gráfico. La diferenciación se cuantificó en cámaras de Neubauer en base a la morfología de las formas epimastigotas y tripomastigotas.



**Fig. 3. Frotis de epimastigotas teñidos con colorante de May Grünwald-Giemsa visualizado al microscopio óptico.**

Epimastigotas de la cepa v115 procedente de medio Diamond fueron fijados por secado e incubados 4 minutos con May Grünwald. Luego se incubó 1 minuto con PBS, se lavó el exceso de colorante y se dejó tiñendo con Giemsa por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras secas se observaron bajo microscopio óptico con aumento de 400 X. El aumento total en la fotografía corresponde a 1.000 X.



**Fig. 4. Frotis de tripomastigotas provenientes de cultivo celular teñidos con colorante de May Grünwald-Giemsa visualizados al microscopio óptico.**

Tripomastigotas de la cepa v115 de cultivo celular fueron fijados por secado e incubados 4 minutos con May Grünwald. Luego se incubó 1 minuto con PBS, se lavó el exceso de colorante y se dejó tiñendo con Giemsa por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras secas se observaron y fotografiaron bajo microscopio óptico con aumento de 1000 X.

## 2. Purificación de tripomastigotas metacíclicos mediante cromatografía en DEAE-celulosa

Para separar las formas tripomastigotas metacíclicas de aquellos epimastigotas no diferenciados, se procedió a purificar los cultivos en columnas de DEAE-celulosa, obteniéndose un rendimiento de un 50% con un porcentaje de pureza de 95-98%, basado en características morfológicas. De acuerdo al criterio de resistencia al complemento, la pureza estimada alcanzó al 100%.

## 3. Diferenciación "in vitro" de formas epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos de poblaciones de *T. cruzi*, pertenecientes a zimodemas Z1 y Z2.

Epimastigotas en fase exponencial de cultivo, provenientes de diversas poblaciones y clones de *T. cruzi*, fueron inducidas a diferenciación "in vitro" en medio TAU. En la Tabla I se muestran las poblaciones de *T. cruzi* utilizadas en este estudio clasificadas según zimodema, su hospedador y origen geográfico.

Como se muestra en la Tabla II, las poblaciones de *T. cruzi* pertenecientes al zimodema Z2 mostraron porcentajes de diferenciación significativamente más bajos ( $p < 0,05$ ) que aquéllas pertenecientes al zimodema Z1. El tiempo necesario para obtener el nivel máximo de diferenciación varió entre 4 y 7 días para las distintas cepas.

TABLA I. Poblaciones de *T. cruzi* pertenecientes a zimodemas Z1 y Z2: hospedador y origen geográfico (Breniere y col., 1991; Atp y col., 1987)

Cepa	Origen	Hospedador	Clasificación isoenzimática	Título suero
v115	II Región Chile	<u>T. infestans</u>	Z1	1:160
v120	II Región Chile	<u>T. infestans</u>	Z1	--
v121	II Región Chile	<u>T. infestans</u>	Z1	--
v124	IV Región Chile	<u>T. infestans</u>	Z1	1:320
sp1	IV Región Chile	<u>T. spinolai</u>	Z1	--
sp104	IV Región Chile	<u>T. spinolai</u>	Z1 (clon 19)	--
sp161	IV Región Chile	<u>T. spinolai</u>	Z1	1:160
v10P	Arequipa Perú	<u>T. infestans</u>	Z1	1:640
S05B	Potosí Bolivia	<u>T. infestans</u>	Z1 (clon 19)	--
Daza	Monterrey Colombia	Humano	Z1	1:160
Dm 28c	Venezuela	<u>D. marsupialis</u>	Z1	1:320
Esm. cl 3	Bahia Brazil	Humano	Z2 (clon 30)	--
Tulahuén	IV Región Chile	<u>T. infestans</u>	Z2 (clon 43)	1:80
RMS	IV Región Chile	Humano	Z2 (clon 39)	1:80
GR	IV Región Chile	Humano	Z2 (clon NP13)	1:40
PNC	IV Región Chile	Humano	Z2 (clon NP13)	1:40
RHGRO	IV Región Chile	Humano	Z2	1:40

TABLA II. Porcentajes de diferenciación "in vitro" de poblaciones de *T. cruzi* pertenecientes a zimodemas Z1 y Z2.

Poblacion <u>T. cruzi</u> Z1	Porcentaje de Diferenciacion	Poblacion <u>T. cruzi</u> Z2	Porcentaje de Diferenciacion
LQ	65	v101 clon 1	10
LGH	78	SC43 clon 1	10
sp161	80	RMS	25
sp104	82	MCC	10
sp31	70	PMC	10
v120	78	GR	10
v124	69	JCh	10
S058	75	JTG	50
v7P	90	MI	66
v8P	90	NC	22
v10P	90	SAX P2B	25
v15P	80	PP-B	30
Dm 28c	60	Esm. clon 3	10
		NI	20

La diferenciación máxima "in vitro" de las formas epimastigotas a tripomastigotas se realizó según el método descrito por Contreras, (1981). Se incubaron formas epimastigotas  $10 \times 10^6$ /ml en medio salino definido (TAU), durante 2 horas. Luego se suplementó con aminoácidos L-prolina 10 mM, L-aspartico 2 mM, L-glutámico 50 mM y glucosa 10 mM, se mantuvieron los cultivos en estufa a 28°C durante 7 días. Se cuantificó diariamente la diferenciación a formas tripomastigotas metacíclicos, mediante recuento en cámara de Neubauer. Los porcentajes de diferenciación corresponden al promedio de 3 experimentos.

#### 4. Caracterización biológica de poblaciones de *T. cruzi* en ratones

##### 4.1. Infectividad de tripomastigotas de cultivo en ratones irradiados

Los resultados del estudio de la infectividad de las poblaciones de *T. cruzi* clasificadas según su zimodema en ratones irradiados se presentan en la Tabla III. La detección de los parásitos en sangre se realizó según los métodos directo de Brener (1962) y micrométodo de Freily y col. (1983). En el caso de las poblaciones Z2, la detección parasitológica debió realizarse siempre a través del micrométodo de Freily que concentra los parásitos por lo menos 25 veces, ya que el método directo de Brener no permite la detección de parasitemias bajas. El diagnóstico de infección se realizó en 4 a 6 ratones irradiados, por población de *T. cruzi* analizada.

##### 4.2. Caracterización de poblaciones de *T. cruzi* en ratones no irradiados.

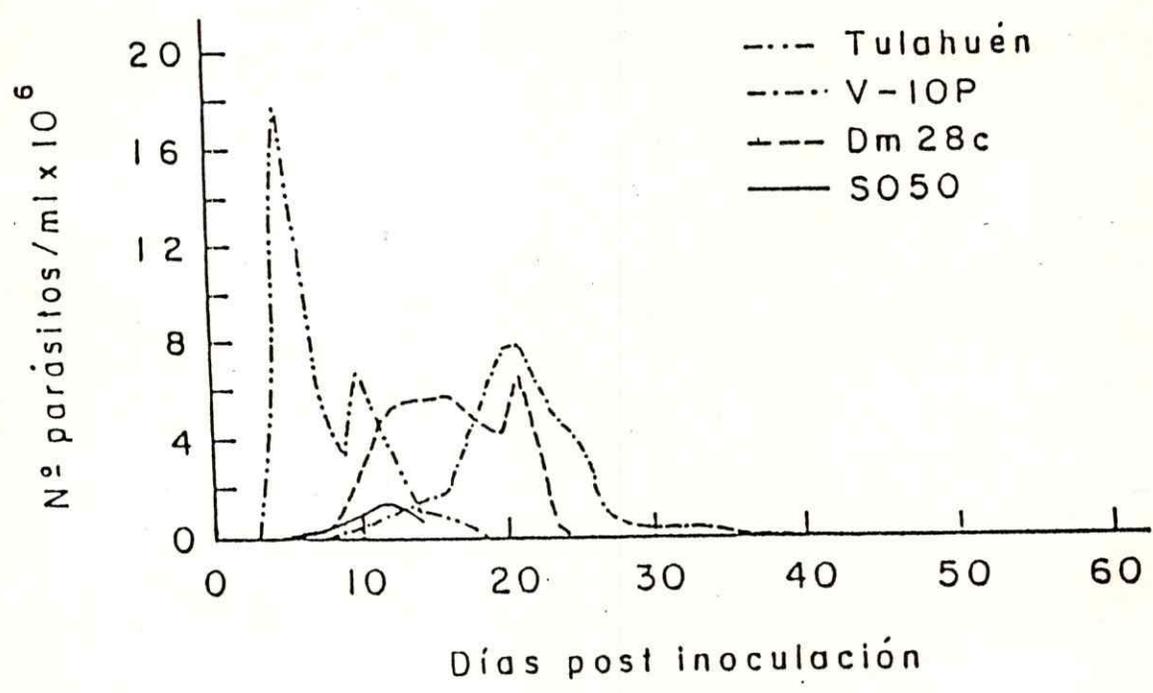
La baja infectividad demostrada por los parásitos pertenecientes al zimodema Z2 en ratones inmunodeprimidos, no permitió su caracterización en ratones no irradiados Balb/c. Tampoco fue posible caracterizar la población LQ, dado que los ratones infectados con ella presentaron una mortalidad precoz con niveles muy bajos de parasitemia. De acuerdo a la producción de parásitos, los mejores representantes del grupo Z1 (Sp161, Sp104, v124, v115, SO50 y v10P), la cepa Tulahuén y el clon Dm28c, fueron seleccionados para la caracterización biológica. En las Figs. 5 y 6 se muestran las curvas de parasitemia de las diferentes poblaciones de *T. cruzi* en ratones Balb/c.

La Tabla IV muestra los períodos prepatentes y porcentajes de letalidad de las poblaciones de *T. cruzi* pertenecientes al zimodema Z1 en ratones no irradiados inoculados con  $1 \times 10^5$  tripomastigotas sanguíneos.

Tabla III Infectividad de poblaciones de *T. cruzi* pertenecientes a zimodemas Z1 y Z2 en ratones irradiados.

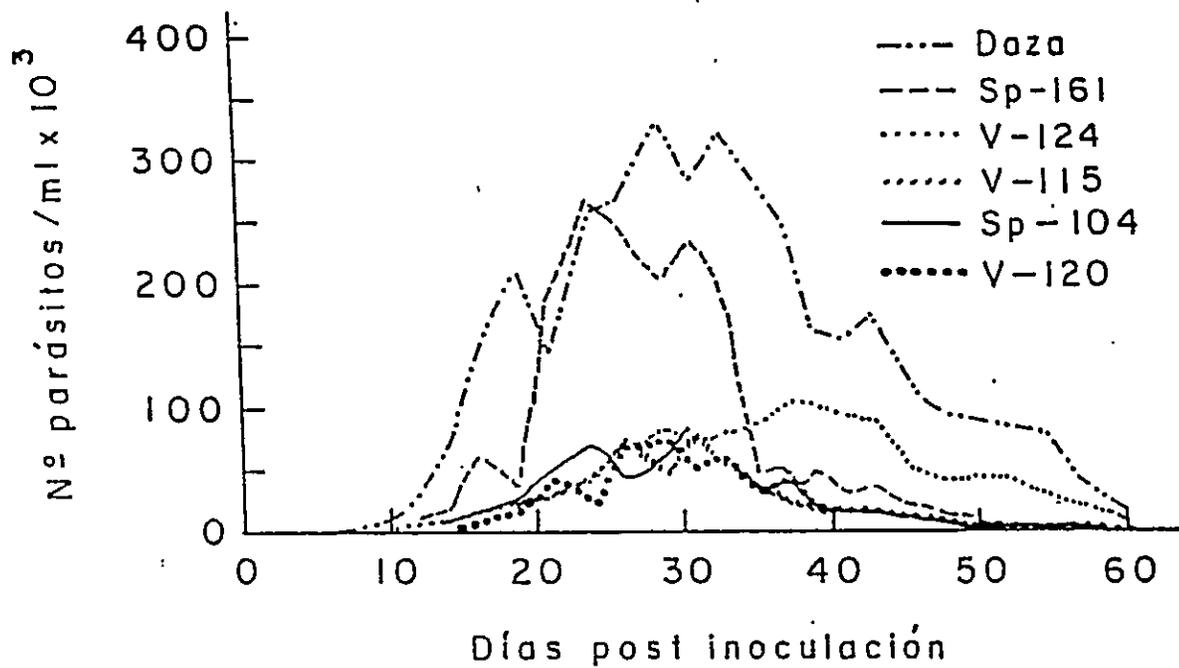
ZIMODEMA 1		ZIMODEMA 2	
Población <i>T. cruzi</i>	Detección del parásito (método directo)	Población <i>T. cruzi</i>	Detección del parásito (micrométodo)
LQ	+	v101 clon 1	+
Dw 28c	+	SC43 clon 1	-
S030	+	CP	+
v10P	+	MCC	-
Daza	+	PMC	+
Sp161	+	GR	+
v120	+	Esm. clon 3	-
v124	+	MF	+
v115	+	RMS	+
Sp104	+	RN-GRO	+
Sp1	+	Tul.	+

Grupos de ratones irradiados (450 rad) fueron inoculados con  $1-3 \times 10^6$  tripomastigotas metacíclicos de cultivo. La detección de los parásitos se realizó mediante el método de Brener (1962), para las poblaciones Z1 y el micrométodo de Freilly y col. (1983), para las poblaciones Z2. Se obtuvo 5  $\mu$ l de sangre de la cola de los ratones y se analizó bajo microscopio. Para el micrométodo, la sangre se colectó en tubos de microhematocrito heparinizado, se centrifugó y se analizó la capa de plasma inmediatamente superior al sedimento de glóbulos rojos.



**Fig. 5. Estudios de Infectividad en ratones no irradiados de distintas poblaciones de *T. cruzi*.**

Grupos de 20 ratones Balb/c no irradiados de 2 meses de edad, fueron inoculados vía intraperitoneal con una dosis de  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas. La curva de parasitemia de cada población de *T. cruzi* se diseñó sobre la base del recuento sanguíneo según el método de Brener (1962). El recuento de parásitos se realizó 3 veces por semana hasta 60 días post-inoculación.



**Fig. 6. Estudios de infectividad en ratones no irradiados de distintas poblaciones de *T. cruzi*.**

Grupos de 20 ratones Balb/c no irradiados de 2 meses de edad, fueron inoculados vía intraperitoneal con una dosis de  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas. La curva de parasitemia de cada población de *T. cruzi* se diseñó sobre la base del recuento sanguíneo según el método de Brener (1962). El recuento de parásitos se realizó 3 veces por semana hasta 60 días post-inoculación.

**TABLA IV.** Período prepatente y porcentajes de letalidad por cepas de *T. cruzi* en ratones no irradiados.

<u>Población de <i>T. cruzi</i></u>	Porcentaje de Letalidad	Período Prepatente en Días
Tulahuén	100	2
Dm 28c	50	4
S050	100	5
v10P	10	5
Daza	5	5
Sp161	0	7
v120	15	11
v124	0	11
v115	0	12
Sp104	5	12

La letalidad fue calculada sobre la base de 20 ratones infectados con cada una de las poblaciones de *T. cruzi* estudiadas.

El período prepatente se determinó mediante el método de Brener, (1962).

### 4.3. Parasitemias

Las poblaciones de *T. cruzi* analizadas, evidenciaron notables diferencias en términos de virulencia; las cepas Tulahuén, SO50, v10P y el clon Dm28c, presentaron las más altas parasitemias. La etapa aguda de la infección en estas cepas, se desarrolló antes de los 30 días con niveles que fluctuaron entre  $1,4-18 \times 10^6$  parásitos/ml de sangre (Fig. 5).

Las cepas chilenas y la cepa colombiana Daza, por el contrario, mostraron parasitemias menores ( $7,4-32 \times 10^4$  parásitos/ml de sangre entre los días 24 y 37 de la infección, Fig. 6).

## 5. Detección de residuos de carbohidratos mediante lectinas fluoresceinadas

### 5.1. Detección de residuos de carbohidratos en formas epimastigotas mediante lectinas fluoresceinadas.

En la Tabla V se muestran las reactividades de las formas epimastigotas Z1 y Z2 con las 4 lectinas que poseen distintas especificidades: ConA: alfa-metil D-manósido y alfa-metil D-glucósido; SBA: NAc-D-galactosamina; PNA: D-galactosa(1,3) NAc-D-galactosamina; WGA: NAc-D- glucosamina, ácido neuramínico. Como se observa, las lectinas ConA y WGA reaccionan fuertemente tanto con cepas Z1 como Z2, demostrando que estos residuos de carbohidratos se encuentran ampliamente distribuidos. SBA, por el contrario reacciona principalmente con cepas pertenecientes a zimodema Z1, obteniéndose reacción negativa para la mayoría de los parásitos Z2. La lectina PNA, muestra una intensidad de reconocimiento menor en cepas Z2 al ser comparadas con aquellas Z1.

TABLA V. Detección de carbohidratos mediante lectinas fluoresceinadas en epimastigotas fijados pertenecientes a zimodemas Z1 y Z2.

CEPAS	ZIMODEMA	<u>Canavalia</u> <u>ensiformis</u>	<u>Glycine</u> <u>maxima</u>	<u>Arachis</u> <u>hypogaea</u>	<u>Triticum</u> <u>vulgaris</u>
		( CON-A ) α-metil-D-man α-metil-D-gluc	( SB ) NAc-D-gal	( PNA ) β-D-gal (1,3) NAc-D-gal	( HGA ) NAc-D-gluc Ac. Neuraminico
Daza	Z1	3	1	3	3
Dm 28c	Z1	3	3	3	3
V195	Z1	3	3	3	2
V124	Z1	3	2	2	2
S058	Z1	3	2	2	3
Sp31	Z1	2	1	1	2
Esm. clon 3	Z2	3	1	-	3
v181 clon 1	Z2	3	-	1	3
RMS	Z2	3	-	1	3
PMC	Z2	3	-	1	3
GR	Z2	3	-	1	3

El ensayo se realizó en 5 ul de una suspensión de epimastigotas que contenían  $2 \times 10^4$  parásitos, se fijaron por secado a  $28^{\circ}\text{C}$  en placas de vidrio y se incubaron en 3 ul de la lectina fluoresceinada, dilución 1:10 durante 30 minutos. Se lavaron las placas 3 veces con una solución 0,15 M, NaCl. La lectura se realizó bajo microscopio de fluorescencia. Los controles de especificidad incluyeron los azúcares inhibidores para cada lectina. alfa-metil-D-manósido 0,2 M; D-galactosa 0,2 M; NAc-D-glucosamina 0,2 M. Los números indican intensidad de fluorescencia y el signo - corresponde a reacción negativa.

## 5.2. Detección de residuos de carbohidratos en formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas y tripomastigotas de cultivo celular mediante lectinas fluoresceinadas.

En la Tabla VI se muestra el patrón de reactividad con las lectinas fluoresceinadas en la forma proliferativa (epimastigota) y las formas infectivas tripomastigotas tanto metacíclicas como provenientes de cultivos celulares del clon Dm28c, cepas Daza y Tulahuén. Como se puede observar en el clon Dm28c y cepa Daza (Z1), la reactividad de la forma tripomastigota proveniente de cultivos celulares fue siempre menor que las otras formas, hecho que se observó al utilizar todas las lectinas. En la cepa Tulahuén, sin embargo, las tres formas reaccionaron indistintamente con las lectinas utilizadas.

## 6. Infectividad de cepas de *T. cruzi* en células de cultivo Vero

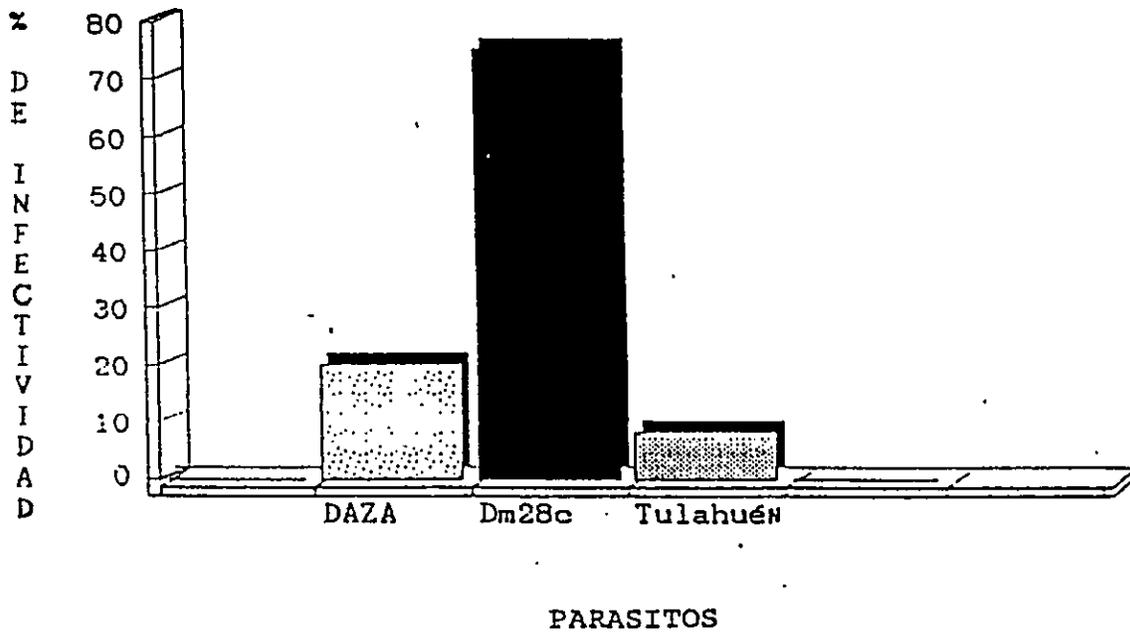
Como se observa en la Fig. 7, las 3 cepas utilizadas muestran diferencias en la capacidad infectiva en células de cultivo Vero. La menor capacidad infectiva se observó con la cepa Tulahuén y Daza (Figs. 7 y 8), la mayor con el clon Dm28c (Figs. 7 y 9). Los parásitos de la cepa Dm28c demostraron una gran capacidad de infectividad múltiple cuando se observó el número de parásitos por célula infectada (Fig. 9).

No se logró infectar células Vero con parásitos provenientes de zimodema Z2.

TABLA VI. Detección de carbohidratos mediante lectinas fluoresceinadas en formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos y tripomastigotas de cultivo celular.

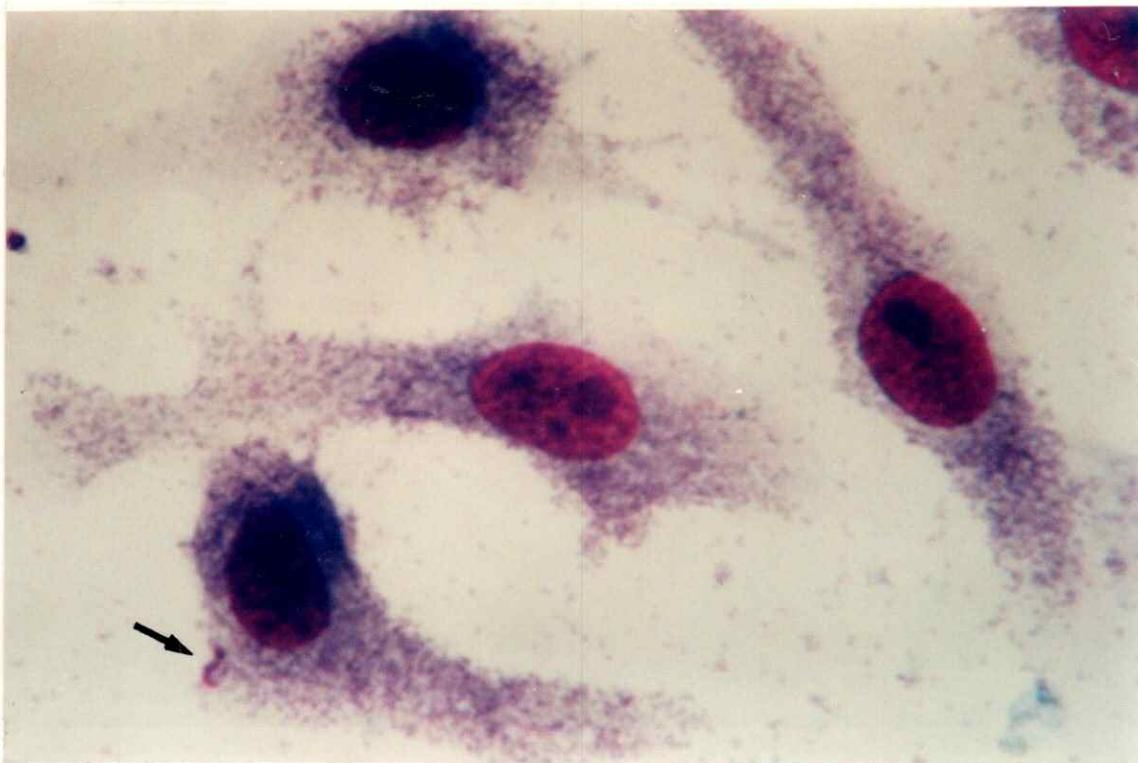
CEPAS	FORMAS	<u>Canavalia</u> <u>ensiformis</u> ( CON-A ) α-metil-D-man α-metil-D-gluc	<u>Glycine</u> <u>maxima</u> ( SB ) NAc-D-gal	<u>Arachis</u> <u>hypogaea</u> ( PNA ) β-D-gal (1,3) NAc-D-gal	<u>Triticum</u> <u>vulgaris</u> ( WGA ) NAc-D-gluc Ac. Neuraminico
		<u>Daza</u>	EPI TRIP MET TRIP VERO	3 3 2	1 2 -
<u>Dm 28c</u>	EPI TRIF MET TRIP VERO	3 3 1	3 2 1	3 3 -	3 3 2
<u>TULAHUEN</u>	EPI TRIP MET TRIP VERO	3 3 3	- - -	- - -	3 3 3

Se utilizaron formas epimastigotas de cultivo, tripomastigotas metacíclicos obtenidos por inducción en medio TAU (Contreras, 1981) y tripomastigotas de cultivo celular. Parásitos fueron fijados por secado a 28°C en pocillos que contenían  $2 \times 10^4$  formas e incubados con 3 µl de la lectina (dilución 1:10) durante 30 minutos. Se lavaron 3 veces las placas con una solución 0,15 M NaCl. Se observaron bajo microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión. Epi (epimastigotas), Trip Met (tripomastigotas metacíclicos), Trip Vero (tripomastigotas provenientes de cultivo en células Vero). Los números indican intensidad de fluorescencia y el signo - corresponde a reacción negativa.



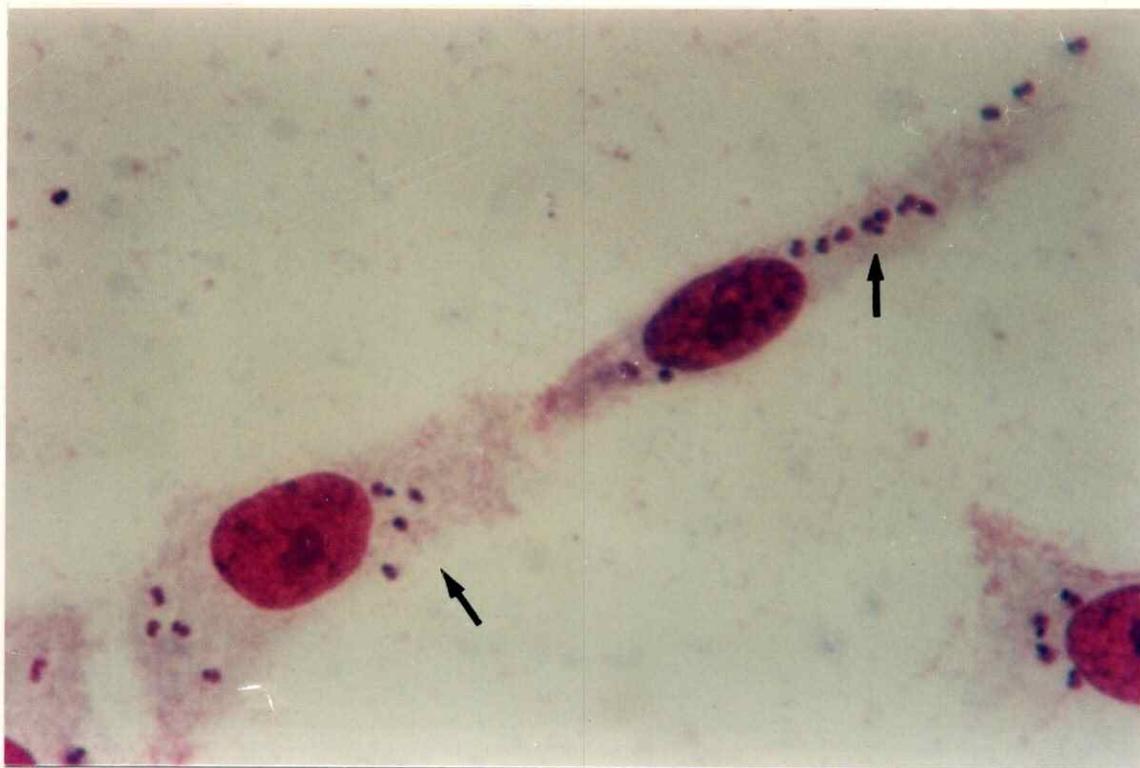
**Fig. 7. Infectividad en células de cultivo Vero de tres poblaciones de *T. cruzi*.**

Células Vero en medio RPMI, 10% SBF ( $4 \times 10^5$  ul/pocillo) fueron sembradas en placas de plástico de 24 pocillos que contenían cubreobjetos estériles redondos. Las monocapas de células fueron infectadas con  $5 \times 10^5$  tripomastigotas/pocillo. Se mantuvieron durante 2 horas en incubador a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Luego se lavaron las células 3 veces con PBS estéril. Las células se fijaron durante 10 minutos con colorante May Grünwald y se tiñeron con Giemsa diluido 1:10. Se secaron los cubreobjetos a temperatura ambiente y se fijaron en portaobjetos utilizando una gota de Permunt. Se analizaron  $10^3$  células por experimento con aumento de 1.000 x y se expresaron los resultados en porcentaje de células infectadas.



**Fig. 8. Células Vero infectadas con parásitos de *T. cruzi* pertenecientes a la cepa Daza.**

Células Vero cultivadas en medios RPMI-1640 con 10% de SBF, fueron sembradas en placas plásticas de 24 pocillos las cuales contenían cubreobjetos estériles redondos. Después de 18 horas, se agregó a cada pocillo una suspensión de tripomastigotas conteniendo  $5 \times 10^5$  parásitos. La relación célula Vero/parásito fue de 1:10. Después de 3 horas de incubación se eliminaron los sobrenadantes, se lavó 3 veces con PBS y las células adheridas a los cubreobjetos fueron teñidas con Giemsa. La flecha indica parásitos en células Vero.



**Fig. 9. Células Vero infectadas con parásitos de *T. cruzi* pertenecientes al clon Dm28c.**

Células Vero cultivadas en medios RPMI-1640 con 10% de SBF, fueron sembradas en placas plásticas de 24 pocillos las cuales contenían cubreobjetos estériles redondos. Después de 18 horas, se agregó a cada pocillo una suspensión de tripomastigotas conteniendo  $5 \times 10^5$  parásitos. La relación célula Vero/parásito fue de 1:10. Después de 3 horas de incubación se eliminaron los sobrenadantes, se lavó 3 veces con PBS y las células adheridas a los cubreobjetos fueron teñidas con colorante Giemsa. Las flechas indican parásitos adheridos e interiorizados en células Vero.

## **7. Lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos.**

La Tabla VII muestra la clasificación según zimodema, mediante determinación isoenzimática analizando 15 loci genéticos (Apt y col., 1987; Brenière y col., 1991), procedencia geográfica y origen de hospedadores de las cepas y clones usados como células blanco en el ensayo de lisis. Se muestran también el título de anticuerpos de los sueros obtenidos mediante serología convencional por inmunofluorescencia indirecta.

### **7.1. Lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos de formas tripomastigotas sanguíneas de diferentes cepas.**

La Tabla VIII muestra la susceptibilidad de las diferentes cepas de *T. cruzi* a las lisis *in vitro* cuando dichos parásitos son opsonizados con antisueros homólogos y heterólogos. Como se observa, sólo parásitos pertenecientes al zimodema Z1 y cepa Tulahúen se utilizaron en este estudio, ya que ratones infectados con tripomastigotas Z2 alcanzan parasitemias bajas, por lo que no fue posible obtener suficientes parásitos para los ensayos de lisis. Las cepas de *T. cruzi* analizadas muestran diferentes reactividades líticas cuando se exponen a una batería de antisueros. Entre estas cepas, Daza sobresale como la única cepa completamente resistente a todos los sueros probados, incluyendo el suero homólogo. La cepa v10P muestra un comportamiento similar. Sin embargo, sueros provenientes de animales infectados con Daza y v10P muestran reactividad lítica con al menos 3 o 4 de las 6 cepas Z1 analizadas. Al comparar el efecto lítico de los antisueros obtenidos en contra de parásitos Z1 y Z2. Los primeros antisueros siempre muestran reactividad con al menos 2 de las 6 cepas Z1 probadas, mientras que los antisueros de los animales infectados con parásitos Z2 (RMS, PMC y RINGRO), fueron incapaces de lisar las cepas analizadas. Una situación bastante similar ocurrió con el suero

TABLA VII. Clasificación de cepas y clones utilizadas en la reacción de lisis mediada por complemento mediante zimodemas, origen geográfico y hospedador

Poblacion <u>T. cruzi</u> Zi	Hospedador Origen Geografico	Poblacion <u>T. cruzi</u> Z2	Hospedador Origen Geografico
X10 clon 1	Humano/Brasil	vi01 clon 1	T. infestans/Chile
LQ	Humano/Chile	SC43 clon 1	T. infestans/Bolivia
LGN	Humano/Chile	RMS	Humano/Chile
sp161	T. spinolai/Chile	NCC	Humano/Chile
sp184	T. spinolai/Chile	PMC	Humano/Chile
sp31	T. spinolai/Chile	GR	Humano/Chile
v120	T. infestans/Chile	JCh	Humano/Chile
v124	T. infestans/Chile	JIG	Humano/Chile
v115	T. infestans/Chile	MH	Humano/Chile
S050	T. infestans/Bolivia	NC	Humano/Chile
v7P	T. infestans/Perú	SAX P20	Humano/Perú
v8P	T. infestans/Perú	PP-B	Humano/Bolivia
v10P	T. infestans/Perú	Esm. clon 3	Humano/Brazil
v15P	T. infestans/Perú	NI	Humano/Chile
Dm 28c	D. marsupialis Venezuela		

El título de los sueros inmunes se determinó mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando formas epimastigotas según el método descrito por Camargo (1964). Epimastigotas fueron fijados por secado en placas de vidrio e incubados con sueros inmunes en diferentes diluciones durante una hora. Las placas se lavaron con tampón PBS y se incubaron con el anticuerpo fluoresceinados anti IgG de ratón durante 10 minutos. Se lavaron en PBS y se observaron bajo microscopio de fluorescencia. La clasificación isoenzimática se realizó mediante el análisis de 15 loci genéticos (Brenière y col., 1991).  
ND: no determinado

TABLA VIII. Porcentajes de la reactividad lítica de sueros inmunes en contra de formas tripomastigotas sanguíneas.

ANTIGENO	SUERO INMUNE														
	v18P	v115	v128	v121	v124	spl	spl94	spl61	Daza	Dm 28	SOSB	Tul.	XMS	PMGBO	PMC
v18P	73	34	29	ND	19	53	6	15	23	12	47	12	6	15	18
v115	94	85	100	99	59	74	36	98	42	27	98	11	8	25	12
v121	98	91	ND	98	ND	31	ND	29	88	89	ND	8	8	ND	16
spl	48	ND	39	58	82	88	63	94	ND	19	14	18	6	18	19
Daza	9	26	2	3	2	8	8	2	32	3	16	6	13	11	ND
Dm 28c	75	73	74	ND	72	26	64	83	51	79	66	8	13	6	7
Tul.	37	64	63	ND	55	69	59	ND	74	85	79	98	38	29	28

La reactividad lítica de los sueros inmunes se determinó mediante el ensayo de lisis mediada por complemento y dependiente de anticuerpos, descrito por Krettli y col. (1982). Los ensayos se realizaron por cuadruplicados. Parásitos provenientes de ratones irradiados se ajustaron a una concentración de  $4 \times 10^6$  parásitos/ml. Se incubaron 50  $\mu$ l de la suspensión de parásitos con 50  $\mu$ l de suero inmune, durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Esta mezcla se separó en 2 alícuotas de 50  $\mu$ l. Volúmenes iguales de complemento humano activo e inactivo fueron agregados a la muestra de parásitos, y se incubó durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . El recuento de tripomastigotes vivos se realizó en cámara de Neubauer.

obtenido en contra de la cepa Tulahuén, ya que reaccionó sólo con el parásito homólogo. Una situación diferente ocurrió con 8 de los 9 sueros antiparásitos Z1 estudiados ya que éstos también reaccionan con la cepa Tulahuén.

## **7.2. Lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos de formas tripomastigotas metacíclicas de cultivo.**

Tripomastigotas metacíclicos fueron incluidos en este estudio para comparar las formas sanguíneas con otras formas infectivas como células blanco para los anticuerpos líticos. Los resultados del ensayo con metacíclicos fueron similares a aquellos obtenidos con formas sanguíneas ya que sueros provenientes de animales infectados con cepas Z2Bol no lisan parásitos de cepas Z1, como se observa en la Tabla IX. Sin embargo, las cepas de parásitos utilizadas como células blanco fueron en algunos casos diferentes de aquellas usadas en los ensayos con parásitos sanguíneos. Esto se debió a que existen restricciones en la capacidad de diferenciación *in vitro* desde epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos en algunas cepas y particularmente con aquellas Z2. Cada suero inmune mostró un patrón de reactividad lítica único. Es interesante hacer notar que en general los tripanosomas metacíclicos poseen una marcada susceptibilidad a lisis frente a varios sueros inmunes en contraste con los resultados obtenidos con las formas sanguíneas. El antisuero Tulahuén exhibió mayor actividad lítica en contra de las cepas heterólogas que con la cepa homóloga, mostrando una notable diferencia de los resultados obtenidos con las formas sanguíneas.

TABLE IX. Porcentajes de reactividad lítica de sueros inmunes en contra de formas tripomastigotas metacíclicas de cultivos acelulares.

ANTIIGENO	SUERO INMUNE											
	v10P	v115	v120	v124	spi04	spi61	Daza	Dm 28	S050	Tul.	RMS	GR
v10P	100	80	80	100	100	95	96	ND	97	37	5	ND
v115	100	100	100	95	100	94	ND	100	100	50	ND	ND
v124	100	100	ND	100	2	100	ND	100	ND	27	ND	ND
Daza	99	80	100	97	81	67	81	81	ND	60	18	5
Dm 28c	74	96	91	56	90	0	65	97	86	12	25	0
EsM c13	33	72	67	55	87	0	45	59	ND	100	24	18
Tul.	ND	40	ND	ND	ND	70	97	99	ND	80	21	ND

La reactividad lítica de los sueros inmunes se determinó mediante el ensayo de lisis mediada por complemento y dependiente de anticuerpos, descrito por Kretli y col. (1982). Los ensayos se realizaron por cuadruplicados. Parásitos provenientes de ratones irradiados se ajustaron a una concentración de  $4 \times 10^6$  parásitos/ml. Se incubaron 50 ul de la suspensión de parásitos con 50 ul de suero inmune, durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Esta mezcla se separó en 2 alícuotas de 50 ul. Volúmenes iguales de complemento humano activo e inactivo fueron agregados a la muestra de parásitos, y se incubó durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . El recuento de tripomastigotas vivos se realizó en cámara de Neubauer.

### **7.3. Lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos de tripomastigotas provenientes de cultivo celular.**

Como se observa en la Tabla X se utilizaron 5 cepas de *T. cruzi* pertenecientes a zimodema Z1. No se logró infectar células Vero con parásitos tipo Z2. Los sueros inmunes reaccionaron de manera similar a lo señalado con parásitos metacíclicos.

### **8. Inmunofluorescencia indirecta de formas tripomastigotas vivos.**

Para investigar si el ensayo de lisis negativo se debe a la incapacidad de los anticuerpos de unirse a los parásitos, se realizó el ensayo de inmunofluorescencia indirecta al utilizar tripomastigotas metacíclicos, sanguíneos y de cultivo celular con diferentes cepas. Al utilizar tripomastigotas metacíclicos Dm28c con diversos sueros inmunes homólogo y heterólogo los resultados de unión de anticuerpos, visualizados por fluorescencia, dieron correlación con los ensayos de lisis. Al utilizar formas sanguíneas y derivadas de cultivo celular de v121 y Tulahuén, sólo se observó correlación con algunos de los sueros utilizados, en otros casos se observó una débil o ausente fluorescencia (no se muestran).

### **9. Análisis antigénico de distintas poblaciones de *T. cruzi* mediante antisueros generados en contra de parásitos Z1 y Z2.**

En la Fig. 10 se muestran los perfiles de reconocimiento antigénico en formas tripomastigotas provenientes de células Vero. En los carriles 1 y 2 se analiza la cepa Tulahuén, en 3 y 4 el clon Dm28c en 5 y 6 la cepa v115 y en 7 y 8 la cepa MF. Los carriles con números impares fueron revelados con antisuero generados en contra de Dm28c (Z1). Los carriles pares se revelaron con antisuero generado contra la cepa GR (Z2).

TABLA X. Porcentajes de reactividad lítica de sueros inmunes en contra de formas tripomastigotas de cultivo celular.

ANTIGENO	SUERO INMUNE								
	v10P	v115	v121	v124	Daza	Dm 28c	Tul.	RMS	GR
v10P	92	57	ND	79	ND	0	12	36	0
v115	54	81	ND	90	16	52	44	12	31
v121	97	88	86	91	72	92	77	0	26
Daza	90	92	ND	93	97	93	92	ND	11
Dm 28c	100	100	ND	95	90	96	93	6	10
Tul.	67	60	100	10	64	74	100	14	0

La reactividad lítica de los sueros inmunes se determinó mediante el ensayo de lisis mediada por complemento y dependiente de anticuerpos, descrito por Krettli y col., (1982). Los ensayos se realizaron por cuadruplicados. Parásitos provenientes de ratones irradiados se ajustaron a una concentración de  $4 \times 10^6$  parásitos/ml. Se incubaron 50  $\mu$ l de la suspensión de parásitos con 50  $\mu$ l de suero inmune, durante 30 minutos a 37°C. Esta mezcla se separó en 2 alícuotas de 50  $\mu$ l. Volúmenes iguales de complemento humano activo e inactivo fueron agregados a la muestra de parásitos, y se incubó durante 30 minutos a 37°C. El recuento de tripomastigotas vivos se realizó en cámara de Neubauer.

ND : no determinado.

Como se observa en la Fig. 10, ambos antisueros reconocen predominantemente proteínas con pesos moleculares sobre 90.000, en las 4 cepas estudiadas.

Al analizar los perfiles de reconocimiento de antígenos en las cepas utilizadas mediante el antisuero contra el clon Dm28c, que posee actividad lítica, se observa que dicho antisuero detecta un mayor número de proteínas que el antisuero no lítico GR. La banda que se reconoció mas fuertemente por el antisuero lítico correspondió a una proteína de peso molecular aproximado de 112.000.

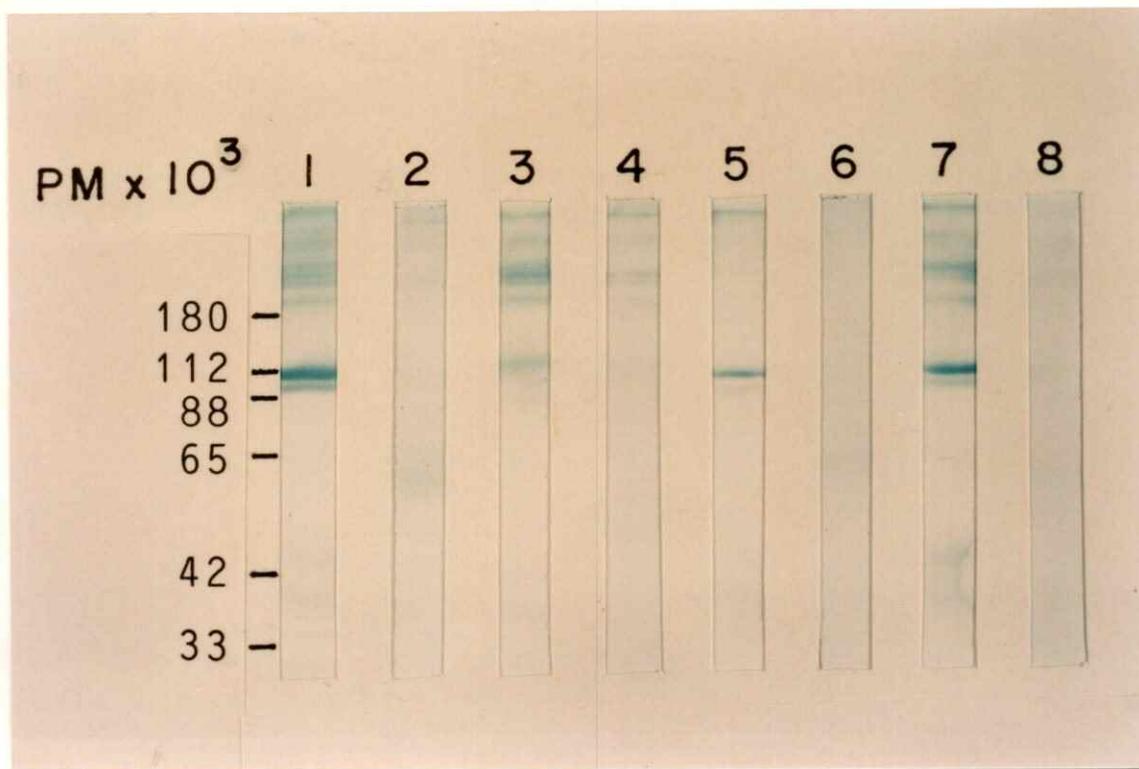
Los perfiles de proteínas reconocidas por el antisuero Dm28c mostraron que existen diferencias antigénicas entre las cuatro cepas analizadas.

Al analizar formas tripomastigotas de la cepa v115 con un antisuero de paciente humano chagásico y ensayo de lisis positivo (Fig. 11, carril 3), se observa un reconocimiento de proteínas en todo el rango de pesos moleculares. Se detectó con mayor intensidad antígenos de pesos moleculares sobre 90.000. Por otro lado, en el carril 4, la misma cepa es analizada con un antisuero que no posee actividad lítica proveniente de paciente chagásico, en dicho carril se observa un menor número de antígenos reconocidos. Como controles, en el carril 1 se analizó tripomastigotas de la cepa v115 revelada con suero humano no chagásico. El carril 2 corresponde a extractos de células Vero, revelado con el mismo antisuero de paciente chagásico utilizado en el carril 3. En ambos carriles no se observa reconocimiento de antígenos.

## **10. Análisis antigénico de cepas de *T. cruzi* mediante antisuero Z1 y Z2 en geles bidimensionales.**

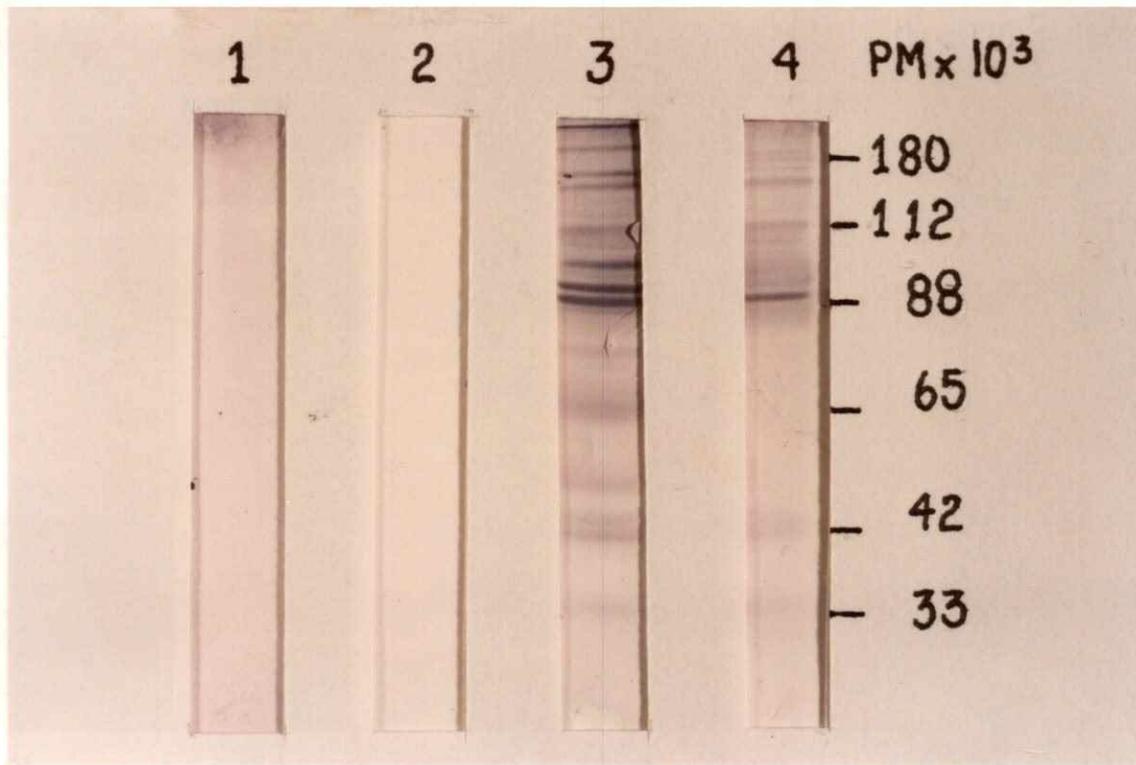
### **10.1. Proteínas inmunoprecipitadas.**

En la Figura 12 se muestran perfiles de geles bidimensionales teñidos con azul de Coomassie. El recuadro A y B corresponde a tripomastigotas de cultivo celular Dm28c y el recuadro C y D corresponde a tripomastigotas de la cepa Tulahuén de cultivo celular. En A y C



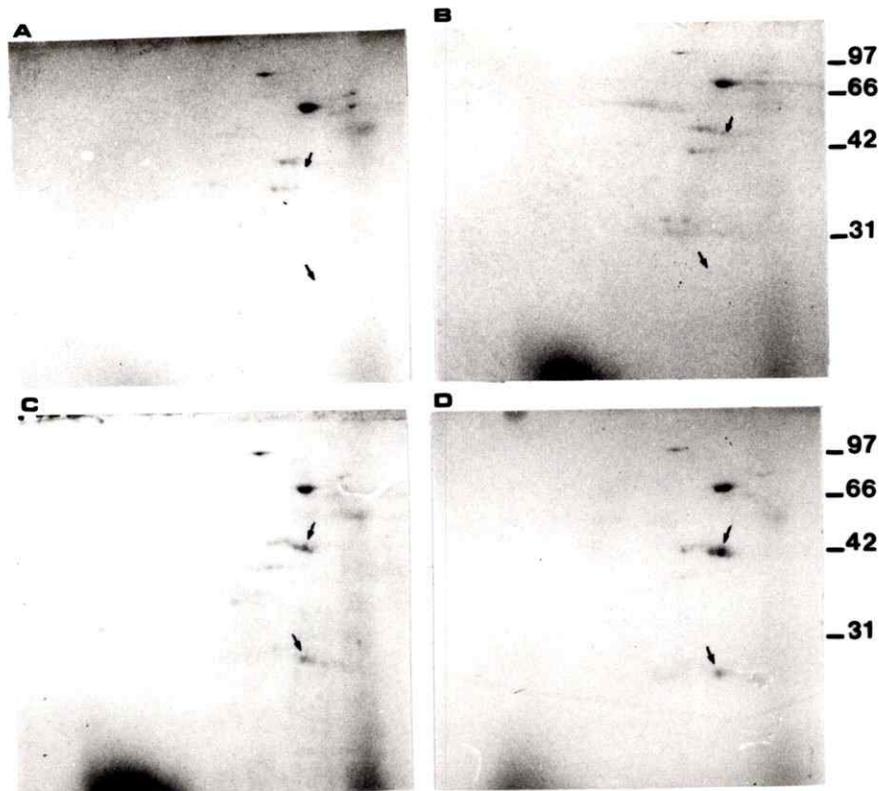
**Fig. 10. Perfiles antigénicos de distintas poblaciones de tripomastigotas analizadas mediante "Western blotting" con sueros de ratón líticos y no líticos.**

Extracto de  $5 \times 10^6$  parásitos fueron sometidos a electroforesis en geles de 7,5% poliacrilamida en presencia de SDS. Las muestras de los geles fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa, incubadas con los antisueros de ratón y reveladas con un segundo anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina. Los carriles 1 y 2; 3 y 4; 5 y 6; 7 y 8, corresponden respectivamente a las muestras de tripomastigotas de las poblaciones Tulahuén, Dm28c, v115 y MF. En los carriles impares se utilizó sueros líticos en contra de tripomastigotas Dm28c y en los carriles pares, sueros no líticos en contra de tripomastigotas GR. Los sueros no líticos se utilizaron en dilución 1:20 y los sueros líticos en dilución 1:80.



**Fig. 11. Perfiles antigénicos de una población de tripomastigotes cepa v115 de cultivo celular analizados mediante "Western blotting" con antisueros líticos y no líticos de pacientes chagásicos.**

Extracto de  $5 \times 10^6$  parásitos fueron sometidos a electroforesis en geles de 7,5% poliacrilamida en presencia de SDS. Las muestras de los geles fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa, incubadas con los sueros humanos y reveladas con un segundo anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina. Los carriles 1, 3 y 4 corresponden a extractos de tripomastigotes v115 revelados respectivamente con suero humano normal, suero lítico de pacientes chagásicos y suero no lítico de pacientes chagásicos. El carril 2 corresponde a extractos de células Vero reveladas con suero de paciente chagásico.



**Fig. 12. Análisis por electroforesis bidimensional de antígenos de tripomastigotes inmunoprecipitados con sueros líticos y no líticos teñidos con azul de Coomassie.**

Extractos correspondientes a  $100 \times 10^6$  tripomastigotes pertenecientes al clon Dm28c (panel A y B) y a la población Tulahuén (panel C y D) fueron inmunoprecipitados con antisueros no líticos (panel A y C) y líticos (panel B y C). Los inmunoprecipitados se sometieron al sistema electroforético bidimensional descrito por O'Farrell (1975). La primera dimensión se realizó en base a un gradiente de pH 3-10 y la segunda dimensión en geles de poliacríamida al 11,5% en presencia de SDS los cuales se tiñeron con azul de Coomassie. Las flechas indican las proteínas detectadas específicamente en la población de parásitos Tulahuén.

los antígenos fueron inmunoprecipitados con antisuero Daza (Z1) el cual posee actividad lítica. En C y D los antígenos fueron inmunoprecipitados con antisuero GR (Z2) que no posee actividad lítica.

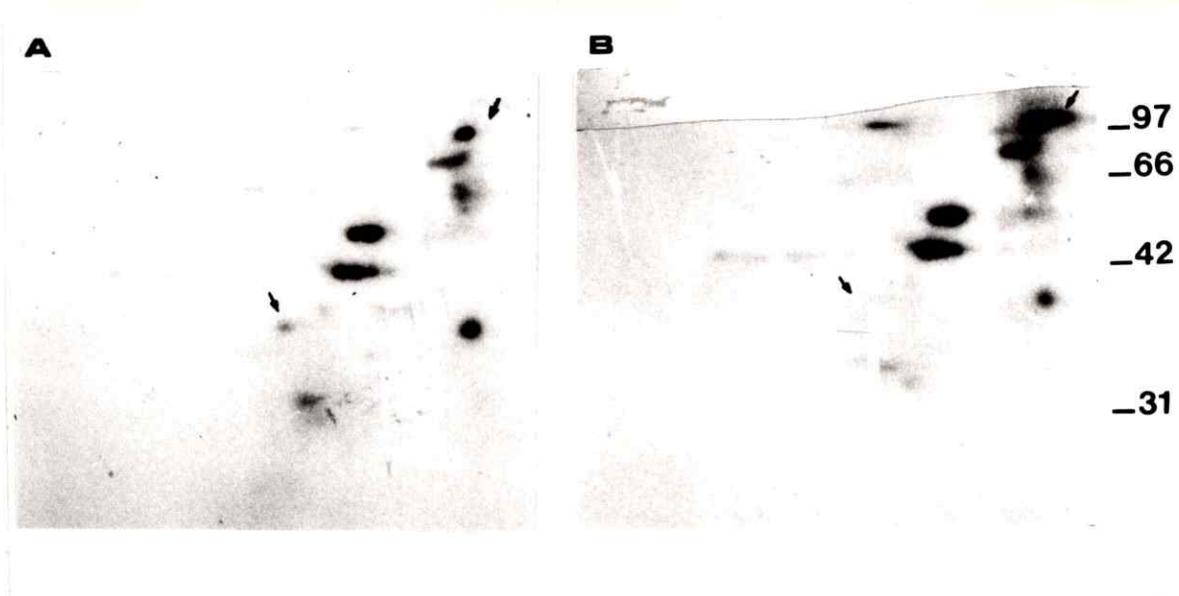
Se observó que proteínas comunes son inmunoprecipitadas por ambos antisueros, tanto en el clon Dm28c como en la cepa Tulahuén. Dos proteínas de peso molecular aproximado 20.000 y 40.000 fueron detectadas por ambos sueros en la cepa Tulahuén, las que están ausentes en el clon Dm28c.

## 10.2. Análisis bidimensional de proteínas de superficie.

En la Fig. 13, recuadro A se muestran las proteínas de superficie de tripomastigotas Dm28c marcadas con  $^{125}$ I-yodo e inmunoprecipitadas con suero no lítico GR. En el recuadro B se muestran las proteínas de superficie Dm28c inmunoprecipitadas con suero lítico Daza.

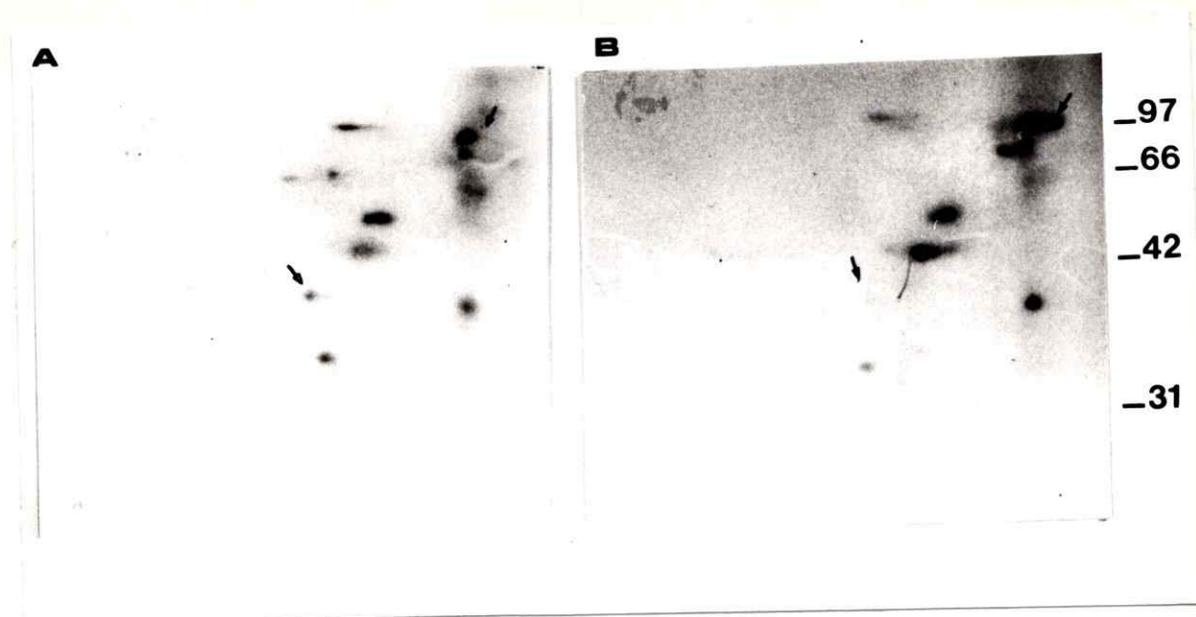
Como se observa en la Fig. 13 la mayoría de las proteínas de superficie son inmunoprecipitadas por ambos antisueros. Sin embargo, el antisuero lítico, es capaz de inmunoprecipitar específicamente una proteína con peso molecular aproximado de 110.000, la cual no es reconocida por el antisuero no lítico. El antisuero no lítico, a su vez reconoce selectivamente una proteína con peso molecular aproximado de 40.000.

Análisis similares realizados con la cepa Tulahuén (Fig. 14), muestran que utilizando el mismo suero lítico Daza, se detecta selectivamente una proteína de peso molecular semejante a aquella detectada en el clon Dm28c. Análogos resultados se obtuvieron con el antisuero no lítico GR, el cual también detecta una proteína con peso molecular de 40.000.



**Fig. 13. Análisis por electroforesis bidimensional de antígenos de superficie de tripomastigotes del clon Dm28c marcados con  $^{125}\text{I}$ -yodo e inmunoprecipitados con antiseros líticos y no líticos de ratón.**

Una muestra de  $100 \times 10^6$  formas tripomastigotas fue marcada con  $^{125}\text{I}$ -yodo, lisada, incubada con antiseros de ratón e inmunoprecipitada con una suspensión de *S. aureus*. Los inmunoprecipitados fueron analizados mediante electroforesis bidimensional de acuerdo al método descrito (O'Farrell, 1975). La primera dimensión se realizó en base a un gradiente de pH 3-10 y la segunda dimensión en geles de poliacríamida al 11,5% en presencia de SDS. Las proteínas fueron reveladas por autoradiografía después de una exposición de 14 días. En el panel A y B se muestra las proteínas inmunoprecipitadas con el suero no lítico y lítico, respectivamente. Las flechas indican proteínas de peso molecular aproximado de 40.000 y 100.000, detectadas específicamente por el suero no lítico y el suero lítico. El suero lítico fue generado contra tripomastigotes de la población Daza y el suero no lítico contra tripomastigotes GR.



**Fig. 14.** Análisis por electroforesis bidimensional de antígenos de superficie de tripomastigotes de la cepa Tulahuén marcados con  $^{125}\text{I}$ -yodo e inmunoprecipitados con antiseros líticos y no líticos de ratón.

Una muestra de  $100 \times 10^6$  formas tripomastigotas fue marcada con  $^{125}\text{I}$  yodo, lisada, incubada con antiseros de ratón e inmunoprecipitada con una suspensión de *S. aureus*. Los inmunoprecipitados fueron analizados mediante electroforesis bidimensional de acuerdo al método descrito (O'Farrell, 1975). La primera dimensión se realizó en base a un gradiente de pH 3-10 y la segunda dimensión en geles de poliacríamida al 11,5% en presencia de SDS. Las proteínas fueron reveladas por autoradiografía después de una exposición de 14 días. En el panel A y B se muestra las proteínas inmunoprecipitadas con el suero no lítico y lítico, respectivamente. Las flechas indican proteínas de peso molecular aproximado de 40.000 y 100.000, detectadas específicamente por el suero no lítico y el suero lítico. El suero lítico fue generado contra tripomastigotes de la población Daza y el suero no lítico contra tripomastigotes GR.

## DISCUSION

Se ha evidenciado la existencia de subpoblaciones en cepas de *T. cruzi* (Dvorak y col., 1980; Dvorak y col., 1982), que poseen cinéticas de crecimiento y características biológicas diferentes. La heterogeneidad en las poblaciones naturales de *T. cruzi* ha sido establecida mediante diversos estudios. Se han aislado clones diferentes en una misma cepa proveniente de un paciente chagásico crónico, los cuales poseían comportamiento biológico diferentes (Engel y col., 1985). Los mismos autores (Dvorak y col., 1982), encontraron diferencias entre cepas y clones mediante la determinación citofluorimétrica del contenido de DNA por organismo. También se ha demostrado heterogeneidad mediante análisis de perfiles de fragmentos de restricción del DNA kinetoplastídico (esquizodemas). (Morel y Simpson, 1980; Morel, 1984).

Esta heterogeneidad en *T. cruzi*, explicaría también que diversas características como infectividad, tasa de diferenciación, cinéticas de crecimiento, patrones isoenzimáticos y esquizodemas, puedan cambiar según las condiciones utilizadas para mantener las cepas en laboratorio. Dichas condiciones de mantención (pasajes en ratón, medios de cultivo, pasajes en triatominos o cultivos celulares), pueden ejercer presiones selectivas en subgrupos dentro de la población, resultando en una modificación del perfil genético original (Deane y col., 1984).

En el presente trabajo, se utilizaron diversos criterios para la caracterización de poblaciones, tales como: capacidad de diferenciación *in vitro* de formas epimastigotas a tripomastigotas, curso de la infección experimental en un modelo murino, capacidad de infectar células en cultivo, susceptibilidad de formas tripomastigotas sanguíneos, metacíclicos y derivados de cultivo celular a lisis mediada por complemento y dependiente de anticuerpo, reconocimiento de glicoconjugados mediante lectinas y reconocimiento antigénico por sueros inmunes en formas tripomastigotas.

## 1. Diferenciación *in vitro* de forma epimastigota a tripomastigota

En este estudio se demostró que la capacidad de diferenciación *in vitro* de formas epimastigotas a tripomastigotas metacíclicas de las cepas pertenecientes al grupo Z1 fue marcadamente superior en comparación con cepas tipo Z2, lo que indica la existencia de asociación entre el análisis isoenzimático y la capacidad para diferenciar. En este estudio la mayoría de las poblaciones de parásitos no fueron clonadas, excepto para el clon X10, Dm28c, V101 cl<sub>1</sub>, SC43 cl<sub>1</sub> y Esm cl<sub>3</sub>. Es posible, por lo tanto, que los aislados estén compuestos por mezclas de distintas poblaciones de parásitos, sin embargo, los porcentajes de diferenciación no variaron sustancialmente y parece ser una característica estable. Los resultados con la cepa LQ muestran una tasa de diferenciación *in vitro* que se mantuvo constante a través de más de 60 generaciones. Esta característica es común con otras poblaciones pertenecientes al zimodema Z1. Además se observó que los parásitos tipo Z1 a diferencia de las Z2, poseen un tiempo de duplicación corto y se diferencian a tripomastigotas aún cuando se utilizan cultivos de parásitos en altas densidades.

Ya que los porcentajes de diferenciación nunca alcanzan el 100%, es necesario purificar las formas tripomastigotas. Para lograr este objetivo se utilizó cromatografía en DEAE-celulosa, lográndose altos porcentajes de rendimiento y pureza (De Souza, 1983).

Los menores porcentajes de metaciclogénesis alcanzados por los parásitos Z2 en relación a los parásitos Z1 podrían estar asociados a diferencias sustanciales en los requerimientos de algunos metabolitos claves en el proceso de diferenciación, ya que este ha sido relacionado por algunos autores con la concentración de determinados compuestos en el cultivo. El primer indicio de ello se tuvo al observar que la metaciclogénesis se producía al final de la fase exponencial e inicio de la etapa estacionaria de crecimiento del cultivo (Camargo, 1964). De acuerdo a este autor, el mecanismo gatillador de la diferenciación aparece con la edad del cultivo, sea por la acumulación de algún metabolito o bien por el agotamiento de uno o más componentes nutricionales en el medio. Con posterioridad, se intentó la identificación de tales

factores (Contreras, 1985; Contreras y col., 1985a; Contreras y col., 1985b). Estudios recientes tendientes a demostrar el rol del adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y de activadores de la adenilato ciclase sobre la metacicloogénesis, han revelado que la adición de estos metabolitos al cultivo, estimula significativamente la transformación de epimastigotas a tripomastigotas. Al parecer un aumento en la concentración de AMPc podría resultar en la activación de proteína kinasas, transcripción de genes específicos y cambios en la estructura del citoesqueleto, lo cual finalmente, conduciría a las alteraciones morfológicas de la célula eucariótica (González-Perdomo y col., 1988; Rangel-Aldao y col., 1988).

Recientemente se ha aislado un péptido de 20 aminoácidos del intestino de *Triatoma* que aumenta la actividad adenilciclase en membranas de epimastigotas y estimula la metacicloogénesis *in vitro*. Los intestinos se obtenían de insectos alimentados dos días antes con sangre de pollo. La secuencia de aminoácidos del péptido es idéntica a la región amino terminal de la alfa-globina de pollo (Torres y Flavvia, 1993).

La información que aquí se aporta acerca de la capacidad de diferenciación *in vitro* constituye un nuevo criterio para la caracterización de cepas de *T. cruzi*.

## 2. Curso de la Infección experimental en ratón.

En este trabajo el empleo de tripomastigotas metacíclicos pertenecientes a ambos grupos de zimodemas en cantidades semejantes inoculadas en ratones inmunodeprimidos, arrojó marcadas diferencias: los parásitos Z2 se caracterizaron por producir bajas parasitemias las cuales sólo fueron detectables mediante micrométodo. Es interesante hacer notar que todos los aislados Z2 estudiados, indujeron una fase crónica sin una infección aguda letal. Pasajes sucesivos de parásitos Z2 a ratones irradiados no exacerbaron la parasitemia. Por el contrario, la mayoría de los parásitos Z1 generaron infecciones agudas con altas parasitemias. Por lo menos 12 cepas de *T. cruzi* pertenecientes a zimodema Z1 produjeron parasitemias suficientemente altas para permitir caracterizaciones biológicas.

De las 18 cepas chilenas de *T. cruzi* que fueron inoculadas en ratón, 14 resultaron infectivas. De éstas, 6 indujeron parasitemias adecuadas para su estudio y 5 de ellas se escogieron para posterior caracterización biológica. Las cepas chilenas se comportaron con baja virulencia en este modelo murino en particular. Un resultado semejante se obtuvo con las poblaciones de *T. cruzi* brasileñas (Schlemper, 1982; Schlemper y col., 1983) aún cuando se utilizó un método diferente de obtención de tripomastigotas. El presente capítulo de estudio constituye, por ende, un esfuerzo para caracterizar aquellas poblaciones naturales que circulan en los hospedadores infectados y que son a menudo omitidos debido a la dificultad de adaptación que poseen estas cepas a los modelos animales.

No obstante que las formas tripomastigotas constituyen la forma del parásito infectiva para la célula del hospedador (Nogueira y Cohn, 1976; De Isola y col., 1981; Dvorak, 1984), en este trabajo se observó que no hubo correlación entre el número de parásitos inoculados y la infectividad, lo cual ha sido previamente comunicado por otros investigadores (Piras y Henríquez, 1983). Los niveles de parasitemia que se obtuvieron en ratones infectados dependió del tipo de cepa utilizada y no del tamaño del inóculo. Esto ya había sido descrito para poblaciones de parásitos no clonadas (Andrade, 1974; Andrade, 1985).

La capacidad infectante de los tripomastigotas ha sido correlacionada a la presencia de antígenos de superficie, capaces de adherirse a la membrana celular del mamífero favoreciendo su penetración (Zingales y col., 1982).

En relación a la infectividad de las cepas de *T. cruzi* en un modelo animal cabe señalar también, la importancia del origen de las muestras del parásito. Todas aquellas poblaciones Z2 provenientes de xenodiagnósticos humanos, se caracterizaron por su baja infectividad en ratones, con excepción de la cepa Tuluahuén. Esta última, ha sido estabilizada en animales de experimentación y mantenidas durante más de 40 años en ellos (Pizzi y Prager, 1952; Pizzi, 1957), lo que pudiera explicar quizás el comportamiento excepcional de estos parásitos dentro del grupo Z2. Contrario a lo anterior, las cepas Z1 procedentes de vinchucas recolectadas en su

medio natural, fueron todas infectivas y virulentas en los ratones. Cabe destacar que la cepa LQ original de un xenodiagnóstico humano, aún estando clasificada como Z1, infectó los ratones de manera subpatente, a diferencia del resto de los parásitos de su grupo zimodémico.

Si bien es cierto, el porcentaje de diferenciación en cultivo pareció fuertemente correlacionado con la infectividad de las cepas de *T. cruzi* en ratones, no siempre se encontró tal asociación. Un ejemplo de ello es la cepa Tulahuén, que con un mínimo porcentaje de diferenciación (10%), presentó los más altos niveles de parasitemia y mortalidad logrados en este estudio. Para algunos autores (Tanuri y col., 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.

Dentro del grupo de parásitos Z1, se manifestaron amplias diferencias de virulencia y patogenicidad. Considerando la magnitud de dichas variables, se distinguieron principalmente 2 grupos de parásitos; uno de los cuales se caracterizó por alcanzar parasitemias altas (entre  $1,8$  y  $18 \times 10^6$ /ml) y altos porcentajes de mortalidad en los ratones infectados (65% promedio). El segundo grupo en cambio, presentó bajas parasitemias (entre  $74$  y  $357 \times 10^3$ /ml) con escasa o nula mortalidad en el huésped (3,3% promedio). Todas las cepas chilenas analizadas están incluidas en el grupo de bajas parasitemias. Estos resultados corroboran los datos epidemiológicos, en los cuales se señala que en nuestro país la enfermedad de Chagas presenta formas benignas, con cuadros predominantemente crónicos (Neghme, 1982; Prata, 1985).

### 3. Infectividad en células de cultivo

Al comparar la infectividad de las formas tripomastigotas de algunos representantes de zimodema Z1 como son las cepas Daza y Tulahuén y el clon Dm 28c en células de cultivo Vero, se observó marcadas diferencias tanto en los porcentajes de células infectadas como en el número de parásitos por célula. En cambio, las poblaciones y clones Z2 mostraron un comportamiento homogéneo, no lográndose infectar células Vero con ninguno de ellos.

#### 4. Lisis mediada por complemento, dependiente de anticuerpo

Con respecto a la susceptibilidad de las formas tripomastigotas a la lisis mediada por complemento y dependiente de anticuerpo, los resultados que aquí se presentan demostraron que todas las poblaciones de tripanosoma Z1 que infectaron ratones, fueron capaces de inducir anticuerpos líticos, a pesar de que la habilidad para lisar los parásitos con estos anticuerpos dependió en gran medida de la forma y cepa utilizada como célula blanco. Es importante destacar que los sueros inmunes de animales infectados con Z2 no reaccionan cruzadamente con parásitos Tulahuén y Z1, no importando si éstas son formas tripomastigotas sanguíneas, metacíclicas de cultivo acelular, o tripomastigotas derivados de cultivos celulares. Hasta el momento, no se ha podido probar la actividad lítica de sueros de animales infectados con parásitos Z2 contra parásitos Z2 ya que no ha sido posible obtener una cantidad apropiada de estos parásitos para realizar los ensayos. Por otra parte, los sueros inmunes de animales infectados con parásitos Z1 reaccionaron principalmente con tripomastigotas de zimodema Z1 homólogos, excepto en los casos en que el suero también fue capaz de producir la lisis mediada por complemento de las formas sanguíneas de la cepa Tulahuén y las formas metacíclicas del clon Esmeraldo. Estos resultados indicarían que las cepas Z1 comparten antígenos de superficie inductores de anticuerpos líticos con la cepa Tulahuén (clon natural 43) y con el clon Esmeraldo (clon natural 30).

Estos resultados indican, por primera vez, que los anticuerpos líticos son inducidos de manera específica y que reaccionan sólo con parásitos que pertenecen al mismo zimodema o a zimodemas genéticamente muy cercanos. Esta observación es importante y sugiere que diferentes antígenos de superficie específicos capaces de inducir anticuerpos líticos existirían en los diversos zimodemas de *T. cruzi*. Con respecto a la incapacidad de algunas cepas de *T. cruzi* para inducir anticuerpos líticos, en este estudio se observó que todos los sueros inmunes en contra de parásitos homólogos fueron capaces de inducir anticuerpos líticos, ya que todos los sueros mostraron actividad lítica en contra de al menos una cepa y

contra diversas formas de tripomastigotas, ya sea sanguíneas, metacíclicas y de cultivo celular utilizadas como células blanco. Una situación inusual ocurrió con la cepa Z1 Daza. Tripomastigotas sanguíneos no fueron capaces de ser lisados por ninguno de los sueros inmunes probados, excepto por el suero homólogo aunque en un porcentaje muy bajo. Sin embargo, formas metacíclicas de cultivo y tripomastigotas derivados de cultivos celulares de la cepa Daza fueron susceptibles a la lisis. Esta característica de la cepa Daza hace resaltar la importancia de utilizar diferentes formas tripomastigotas como células blanco, ya que algunas cepas son refractarias a la lisis por un mecanismo aún no dilucidado. El hecho que los antisueros contra Daza puedan lisar a tripomastigotas pertenecientes a otras poblaciones, aunque sean incapaces de destruir a esta misma cepa, indica que los antígenos que originaron los anticuerpos líticos, en algún momento, debieron estar presentes en la superficie del parásito Daza.

Los ensayos de lisis mediada por-complemento se repitieron al menos 3 veces, en ciertas ocasiones empleando la misma fuente de complemento y suero inmune y diferentes preparaciones de parásitos, se obtuvieron resultados no reproducibles. Este hecho fue más frecuente cuando se utilizó formas tripomastigotas sanguíneas, lo cual podría reflejar la presencia transitoria de antígenos de superficie en esta forma parasitaria, lo que modularía la sensibilidad del parásito a la lisis mediada por complemento en la presencia de anticuerpos específicos, como ha sido postulado por otros autores (Kierszenbaum y Ramírez, 1990). Se ha propuesto que la resistencia relativa de varias cepas de *T. cruzi* podría ser explicada por un mecanismo de escape que contempla la redistribución de aquellos antígenos reconocidos por los anticuerpos líticos (Schmunis y col., 1978) y la posterior liberación de antígenos parasitarios podría ser uno de los mecanismos por el cual el parásito podría evadir la respuesta inmune. Este parece ser un fenómeno frecuente ya descrito en pacientes chagásicos (Schmunis y col., 1980; Jazin y col., 1991). Más aún, la modulación de la expresión de antígenos de superficie pueden asegurar la sobrevivencia de al menos algunos organismos, evadiendo así la respuesta inmune.

Los resultados presentados aquí son relevantes para mejorar la detección de los anticuerpos líticos como parte de la respuesta protectora ya que algunos autores han asociado un ensayo lítico positivo con cura parasitológica (Krettli y col., 1982; Krettli y col., 1984). En este trabajo se concluye que es necesario utilizar varias cepas de parásitos como célula blanco para asegurar la detección de los anticuerpos líticos. Por otra parte, para mejorar la sensibilidad del ensayo, sería necesario incluir tripomastigotas metacíclicos o derivados de cultivo celular ya que se obtuvo porcentajes de lisis mayores con estas formas. Por otra parte, si los anticuerpos líticos reaccionaran *in vivo* sólo contra un número discreto de *T. cruzi*, la acción protectora de estos anticuerpos frente a cepas de *T. cruzi* genéticamente distantes no sería eficaz.

Es interesante recordar que los antisueros generados en ratón en contra de parásitos Z1, en general, fueron capaces de ejercer acción lítica *in vitro* en contra de parásitos Z1. Por el contrario, los sueros Z2 mostraron baja o nula capacidad de ejercer actividad lítica frente a todas las poblaciones Z1 estudiadas. Es así como se estableció una relación entre tipo de parásito y la capacidad, ya sea, de inducir anticuerpos líticos o evadir la respuesta inmune.

##### **5. Reconocimiento antigénico en formas tripomastigotas**

Al analizar los antígenos reconocidos por el antisuero generado en contra del clon Dm28c (Z1), en 4 cepas, se observó que en todas ellas se reconocían específicamente proteínas de peso molecular entre de 90.000 y 112.000. Estos antígenos no fueron reconocidos cuando se utilizó el antisuero GR (Z2). Esto indica que la respuesta inmunológica del hospedador es diferente frente a ambos tipos de parásitos, desde un punto de vista, cualitativo y cuantitativo. Es posible que las diferencias inmunogénicas de ambos tipos de parásitos se deban a diferencias en la constitución de proteínas de superficie de los parásitos. Cuando se analizaron los perfiles de reconocimiento de antígenos en la cepa v115 mediante sueros de pacientes chagásicos, también se observó un débil reconocimiento de antígenos de alto peso molecular por los sueros no líticos, en cambio varios antígenos mayoritarios son

reconocidos por los antisueros que poseen actividad lítica. Otros autores han revelado una gran heterogeneidad antigénica en clones naturales de *T. cruzi*, lo que se correlacionaría con la variabilidad isoenzimática del parásito (Brenière y col., 1991). Una explicación alternativa se refiere a los mecanismos de escape de la respuesta inmune, que pudieran ejercer en forma diferencial los parásitos Z1 y Z2. En tal sentido, existen datos en literatura que demuestran la excreción-secretión de proteínas del parásito (Jazin y col., 1991). Durante la fase aguda de la infección, se excretan o secretan proteínas con peso molecular de 55.000 y durante la fase crónica, proteínas de 160.000. Otros autores (Ouassi y col., 1990), identifican una proteína de peso molecular 80.000 como el antígeno excretado-secretado.

Los anticuerpos líticos han sido señalados como aquellos capaces de unirse a parásitos vivos, los cuales son generados como resultado de una infección activa y no mediante inmunización con parásitos fijados. Se ha purificado una glicoproteína con peso molecular 160.000 presente en tripomastigotas metacíclicos. Dicho antígeno ha sido señalado como el inductor del anticuerpo lítico (Norris y col., 1989). Otra proteína de peso molecular 90.000 también ha sido sugerida para cumplir dicha función (Yoshida y col., 1990). Un anticuerpo monoclonal en contra de esta proteína fue capaz de lisar 5 de las 11 cepas analizadas, a pesar de que la proteína estaba presente en 9 de ellas. Cuando se utilizó la proteína para inmunizar ratones se obtuvo parasitemias subpatentes. Además la proteína fue capaz de inhibir la invasión de los tripomastigotas metacíclicos a células Vero (González y col., 1991). Otras proteínas han sido propuestas para jugar roles en la invasión celular, ya sea en adhesión o interiorización. Una glicoproteína de peso molecular de 85.000 específica de tripomastigotas fue asociada al proceso de interiorización (Zingales y col., 1982). La expresión y constitución molecular de este antígeno de superficie es heterogénea, ya que un anticuerpo monoclonal en contra de esta proteína inhibe la penetración preferentemente de tripomastigotas metacíclicos y no de tripomastigotas de cultivo. Una parte de la población de tripomastigotas de cultivo no unieron el

anticuerpo. También se observó diferencias en los pesos moleculares y puntos isoeléctricos de las glicoproteínas reconocidas por el anticuerpo monoclonal cuando se analizó 2 cepas de *T. cruzi* (Abuin y col., 1989).

Recientemente, una familia de proteínas con peso molecular 85.000 homólogas a las neuraminidasas de bacteria ha sido descrita (Pereira, 1983; Harth y col., 1989; Prioli y col., 1990).

Una proteína secretada de peso molecular 60-75.000 estaría implicada en el escape de parásitos desde vacuolas ácidas hacia el citosol después de la invasión celular. El mecanismo de escape se realizaría a través de una proteína relacionada estructuralmente con el componente C<sub>9</sub> del complemento, la cual sería capaz de formar poros en la membrana, en condiciones de pH bajos (Andrews, 1990).

Una proteína de peso molecular 100.000 ha sido descrita como componente principal de la cepa G, la cual induce bajas parasitemias y es altamente susceptible a lisis mediada por complemento. Esta molécula no se encontró en las cepas Y y CL, las cuales inducen altas parasitemias y son muy resistentes a la lisis (Yoshida, 1986).

## **6. Implicaciones de la clonalidad en el parásito protozoario *T. cruzi***

Una consecuencia fundamental del modelo panmítico es que existirían escasas posibilidades de identificar y estudiar genotipos particulares dentro de una especie puesto que las constituciones genéticas se mezclan en cada generación. Si se considera el modelo clonal, existen distintas constituciones genéticas que persisten como tales a través de generaciones, excepto por la incorporación de mutaciones (Miles y Harth, 1986). Según este concepto de clonalidad, los clones naturales se comportan en gran medida como entidades genéticas independientes, por lo tanto, es posible esperar que la variabilidad isoenzimática del parásito, esté correlacionada con características biológicas del parásito.

Las características biológicas, bioquímicas e inmunológicas de poblaciones de *T. cruzi* analizadas en el presente estudio, son caracteres complejos poligenéticos, por lo que constituyen un reflejo de un gran número de genes involucrados en procesos tales como diferenciación celular, adhesión, penetración y evasión a la respuesta inmune.

Tales genes difieren notoriamente de los 16 loci genéticos, que son analizados en los estudios isoenzimáticos y que incluyen enzimas que participan en la vía glicolítica y ciclo de Krebs.

En base a los estudios isoenzimáticos, se han estimado que los clones principales que se encuentran en Chile, que pertenecen a los zimodemas Z1 y Z2, estarían separados por grandes distancias genéticas. Es notable que estas grandes distancias genéticas estén claramente reflejadas en los diferentes parámetros analizados en este estudio. Los parásitos pertenecientes al zimodema Z1 mostraron alta capacidad de diferenciación *in vitro*, parasitemias subpatentes en ratón y baja capacidad infectiva en células de cultivo.

Sueros inmunes generados contra poblaciones Z1 fueron capaces de provocar lisis mediada por complemento de parásitos Z1, aunque la reactividad lítica dependió de la cepa utilizada como célula blanco. Antiseros contra parásitos Z2 fueron incapaces de lisar parásitos Z1. Mediante el análisis antigénico se detectaron selectivamente proteínas reconocidas por antiseros en contra de parásitos Z1 y Z2.

En algunos de los parámetros analizados fue posible, además, observar diferencias entre poblaciones pertenecientes al mismo zimodema, pero que pertenecen a diferentes clones definidos por isoenzimas (Tibayrenc y col., 1990). Estos parámetros fueron: niveles de parasitemias y letalidad de ratones, infectividad en células de cultivo y susceptibilidad a lisis mediada por complemento. Por ejemplo, la población SP 104 pertenece al clon 19 y la cepa LQ al clon 7. Ambos pertenecen al zimodema Z1 y son diferenciables por niveles de parasitemia en ratón. Es interesante señalar que algunas poblaciones pertenecientes a un mismo clon, pudieron diferenciarse por algunos criterios biológicos, es el caso de las poblaciones MN y GR,

que pertenecen al zimodema Z2, clon 39, los cuales poseen porcentajes de diferenciación marcadamente distintos. Ya que la clasificación de los 43 clones fue realizada en el análisis de 16 loci genéticos, es posible que ésta varíe si se incrementa dicho número.

El hecho que MN y GR sean poblaciones naturales no clonadas, hace también posible que éstas estén compuestas por mezclas de clones, los cuales podrían ser seleccionados dependiendo de las condiciones de mantención de los parásitos (Deane y col., 1984).

En conjunto estos resultados muestran que las diferencias biológicas, bioquímicas e inmunológicas analizadas, se correlacionan con las diferencias genéticas determinadas por estudios isoenzimáticos entre las poblaciones de *T. cruzi*, lo que permite apoyar la estructura clonal de las poblaciones naturales de este parásito.

El modelo clonal en *T. cruzi* tiene implicaciones significativas concernientes a materias tales como desarrollo de vacunas, métodos de diagnóstico y tratamiento de pacientes.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las estrategias a utilizar para abordar tales relevantes materias podrían ser marcadamente diferentes para poblaciones pertenecientes a los dos zimodemas principales analizados.

## PROYECCIONES

El análisis genético del parásito protozoario *T. cruzi* ha sido realizado, hasta el momento, solo por métodos indirectos. Los métodos tradicionales mendelianos no se han aplicado por la imposibilidad de efectuar cruzamientos genéticos. Esto es debido a que la reproducción sexual podría estar ausente o severamente restringida en las poblaciones naturales del parásito.

En base a extensos estudios de los perfiles electroforéticos de isoenzimas se propuso una estructura clonal de poblaciones (Tibayrenc y col., 1990). Una consecuencia de la propagación clonal es la asociación que es posible encontrar entre características fenotípicas no relacionadas. Los estudios isoenzimáticos han sido corroborados por los análisis del polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción del KDNA (Carreño y col., 1987) y recientemente por análisis del polimorfismo genético del DNA amplificado al azar (RAPD) (Tibayrenc y col., 1993).

En el presente estudio se aportan evidencias que apoyan la estructura clonal de las poblaciones de *T. cruzi*, puesto que se demuestra asociación entre clasificación isoenzimática y características biológicas, bioquímicas e inmunológicas de poblaciones y clones del parásito. La estructura clonal de las poblaciones de *T. cruzi* permite estudiar genotipos particulares que proporcionan modelos adecuados para analizar las bases moleculares y celulares que determinan las diferencias entre las poblaciones.

Con respecto a las características analizadas, sería de especial interés determinar, en el futuro, moléculas involucradas en los procesos de adhesión e interiorización celular, evasión del sistema inmune y diferenciación desde la forma no infectiva a infectiva del parásito. Para tales estudios, es de gran utilidad contar con el modelo biológico aquí caracterizado, el cual permite disponer de poblaciones y clones de *T. cruzi* con comportamientos polares en dichos parámetros. El aislamiento de los genes que codifican para las moléculas implicadas en procesos tan importantes como la invasión celular, evasión y diferenciación, abrirá nuevas perspectivas en el estudio de la relación hospedador-parásito.

En este trabajo se confirma la heterogeneidad en el comportamiento biológico, bioquímico e inmunológico de las poblaciones y clones de *T. cruzi*. Esta importante característica debe ser considerada en las estrategias tendientes a desarrollar vacunas, sistemas de diagnóstico y tratamientos quimioterapéuticos eficaces.

Si se considera que existe variabilidad del comportamiento *in vitro* de las distintas poblaciones de *T. cruzi*, frente a la acción lítica dependiente de anticuerpos, se puede postular que las poblaciones podrían poseer diferente capacidad para inducir anticuerpos líticos. Otra alternativa es que todos los parásitos son capaces de inducir anticuerpos líticos, pero las diferentes poblaciones se diferencian en la capacidad para evadir su acción. Ambos mecanismos involucran la participación de moléculas, cuya naturaleza podría depender del tipo de poblaciones de parásitos. Una batería de diferentes antígenos podrían ser necesarios para el desarrollo de una vacuna.

Con respecto al diagnóstico, dada la heterogeneidad de poblaciones de *T. cruzi*, es probable que ciertos grupos de parásitos estén asociados a determinadas patologías, sería por lo tanto de gran relevancia disponer de sistemas de diagnóstico que permitan discriminar específicamente entre dichos grupos.

Por otra parte, es posible que grupos de parásitos posean diferentes estrategias de sobrevivencia en el hospedador. Por ejemplo, algunos grupos de parásitos podrían tener una mayor capacidad para invadir células o poseer ciclos intracelulares más prolongados. Esquemas quimioterapéuticos basados en estas diferencias podrían llegar a ser altamente eficaces.

## BIBLIOGRAFIA

- Abuin, G., Colli, W., De Souza, W., Alves, M.J.M. (1989). A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35, 229-238.
- Acosta, L., Cosensa, H., Krettli, A.V., Romanha, A.J. (1988). Isoenzymatic characterization of *T. cruzi* strains isolated from different hosts, in Honduras, Central Am. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 83, 109.
- Alcántara, A., Brener, Z. (1978). The *"in vitro"* interaction of *Trypanosoma cruzi*: bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. *Acta Tropica.* 35, 209-219.
- Almeida, I.C., Milani, S.R., Gorin, P.A.J., Travassos, L.R. (1991). Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alfa-galactosyl antibodies. *J. Immunol.* 146, 2394-2400.
- Alves, M.J.M., Colli, W. (1974). Agglutination of *Trypanosoma cruzi* by Concanavalin A. *J. Protozool.* 21, 575-578.
- Andrade, S.G. (1974). Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Bahiano. *Rev. Pat. Trop.* 3, 65-121.
- Andrade, V., Brodskyn, C., Andrade, S. (1983). Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 796-799.
- Andrade, S.G. (1985). Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18, 39-46.
- Andrade, S.G., Mazalhaes, J.B., Pontes, A.L. (1985). Evaluation of chemotherapy with Benznidazole and Nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *WHO Bull.* 63, 721-726.
- Andrade, S.G., Pimentel, A. (1991). The complement mediated lysis test does not correlate with parasitological cure in *T. cruzi* infection in mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Suppl I Vol.* 86, pag. 228.
- Andrade, S.G., Freitas, L.A.R., Peyrol, S., Pimentel, A.R., Sadigursky, M. (1991). Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. *WHO Bull.* 69 (2), 191-197.
- Andrews, N.W., Colli, W. (1982). Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J. Protozool.* 29, 264-269.
- Andrews, N.W., Katzin, A.M., Colli, W. (1984). Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity. *Eur. J. Biochem.* 140, 599-604.
- Andrews, N.W., Hong, K., Robbins, E.S., Nussenzweig, V. (1987). Stage-Specific Surface Antigens Expressed during the Morphogenesis of Vertebrate Forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 64, 474-484.

- Andrews, N.W. (1990). The Acid-Active Hemolysin of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 71, 241-244.
- Ansiano, D.F., Dalmaso, A.P., Lehchuck, R., Vásquez, C. (1972). Role of complement in immune lysis of *T. cruzi*. *Infect. Immun.* 6, 860-869.
- Apt, W., Reyes, H. (1986). Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Chile: I Distribución geográfica, índices de infección en vectores y en humanos. *Parasitol. al Día.* 10, 94-101.
- Apt, W., Aguilera, X., Arribada, A., Gómez, L., Miles, M.A., Widner, G. (1987). Epidemiology of Chagas' Disease in Northern Chile: Isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* from domestic and sylvatic transmission cycles and their association with cardiopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 302-307.
- Arévalo, J., Panebra, A., Santa Cruz, C. (1985). Relevance of hemin for "in vitro". Differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* 32, 553-555.
- Araujo, F.G., Handman, E., Remington, J.S. (1980). Binding of lectins to the cell surface of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* 27, 397-400.
- Araujo-Jorge, T.C., De Souza, W. (1986). Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages: effect of previous incubation of the parasites or the host cells with lectins. *Z. Parasitenkd.* 72, 153-171.
- Atías, A., Apt., W. (1991). Enfermedad de Chagas. En: Atías, A., Neghme, A. *Parasitología Clínica*. 2. Ed. Edit. Mediterráneo. 238-251.
- Aymerich, S., Goldenberg, S. (1989). The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm28c: Comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids. *Exp. Parasitol.* 69, 107-115.
- Barnabé, C. Tibayrenc, M., Dujardin, M. (1983). *Trypanosoma cruzi*: A pharmacological comparison of some Bolivian isoenzymic strains. *Ann. Soc. Belge. Méd. Trop.* 63, 319-324.
- Beard, C.A., Wrightman, R.A., Manning, J.E. (1988). Stage and strain specific expression of the tandemly repeated 90 KDa surface antigen gene family in *T. cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 28, 227-234.
- Bertelli, M.S.M., Brener, Z. (1980). Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 66, 992-997.
- Brener, Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 4, 389-396.
- Brener, Z. (1972). A new aspect of *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate host. *J. Protozool.* 19, 23-27.
- Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.* 27, 347-382.
- Brener, Z., Alvarenga, N.T. (1976). Life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the vector. Symposium of new approaches in American Trypanosomiasis research. Ed. Pan. Am. Health Organization. 83-86.

- Brener, Z. (1985). General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18 (suppl), 1-8.
- Brenière, S.F., Braquemond, P., Solari, A., Agnese, J.P., Tibayrenc, M. (1991). An isoenzyme study of naturally occurring clones of *T. cruzi* isolates from both side of the West Andes highlands. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 85, 62-66.
- Cáceres, O., Fernández, J.F. (1976). Glucose metabolism, growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Bras. Biol. 36, 397-410.
- Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 6, 93-100.
- Camargo, M.E. (1966). Fluorescent antibody test for serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a solid test. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 8, 227-231.
- Carreño, H., Rojas, C., Aguilera, X., Apt, W., Miles, M.A., Solari, A. (1987). Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from Chile. Exp. Parasitol. 64, 252-260.
- Castellani, D., Ribeiro, L.V., Fernández, J.F. (1967). Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. J. Protozool. 14, 447-451.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíase humana. Estudos sôbre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi, n. gen., n. sp., agente etiológico da nova entidade mórbida no homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1, 1062-1909.
- Chapman, M.D., Snary, D., Miles, M.A. (1984). Quantitative differences in the expression of a 72,000 molecular weight cell surface of glycoprotein (GP 72) in *Trypanosoma cruzi* zymodemes. J. Immunol. 132, 3149-3153.
- Chiari, E., De Souza, W., Romanha, A.J., Chiari, C.A., Brener, Z. (1978). Concanavalin A receptor on the cell membrane of *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica. 35, 113-121.
- Chiari, E., Araujo, S.M., Carneiro, M. (1980). Meios empobrecidos em nutrientes na diferenciação epimastigota-tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*. Pesquisa B sica em Doença de Chagas. VII Reunião Anual, Caxambú, MG. Resumo BI-41.
- Contreras, V.T. (1981). Estudio de algunos factores involucrados en la metacicloogénesis "in vitro" de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Profesor Agregado. Area de Parasitología. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.
- Contreras, V.T. (1985). Regulação da expressao genetica durante a metacicloogénesis "in vitro" de *Trypanosoma cruzi* (schizotrypanum) (Chagas 1909). Tesis de doctorado. Inst. Biol. Univ. Fed. do Rio de Janeiro.
- Contreras, V.T., Morel, C.M., Goldenberg, S. (1985a). Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacycloogénesis. Mol. Biochem. Parasitol. 14, 83-96.
- Contreras, V.T., Salles, J.M., Thomas, N., Morel, C.M., Goldenberg, S. (1985b). "In vitro" differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol. Biochem. Parasitol. 16, 315-327.

- Contreras, V.T., Araujo-Jorge, T., Bonaldo, M., Thomaz, N., Barbosa, H., Meirelles, M., Goldenberg, S. (1988). Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 83, 123-133.
- Crane, M., Dvorak, J. (1982). *Trypanosoma cruzi*: Spontaneous transformation by a Y strain variant in liquid medium. Exp. Parasitol. 54, 87-92.
- Deane, M.P., De Souza, M.A., Pereira, N.M., Gonçalves, A. M., Momen, H., Morel, C.M. (1984). *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analysis. J. Protozool. 31, 276-280.
- De Arruda, M.V., Colli, W., Zingales, B. (1989). Terminal  $\beta$ -D-galactofuranosyl epitopes recognized by antibodies that inhibit *Trypanosoma cruzi* internalization into mammalian cells. Eur. J. Biochem. 182, 413-421.
- De Isola, E.L.D., Lammel, E.M., Katzin, V.J., González Cappa, S. M. (1981). Influence of organ extracts of *Triatominae infestans* on differentiation of *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol. 67, 53-58.
- De Isola, E.L.D., Lammel, E.M., González Cappa, S.M. (1986). *Trypanosoma cruzi*: Differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. Exp. Parasitol. 62, 329-335.
- De Souza, M.A. (1983). A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE cellulose columns. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 78, 317-333.
- Diamond, L.S. (1968). Improved method for the monoaxenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudin (1903) and *E. histolytica*-like amoebae with trypanosomatids. J. Parasitol. 54, 715-719.
- Dragon, I.A., Brothers, V.M., Wrightsman, R.A., Manning, J. (1985). A Mw 90,000 surface Polypeptide of *T. cruzi* as a candidate for a Chagas' Disease diagnostic antigen. Mol. Biochem. Parasitol. 16, 213-229.
- Dusanic, D.G. (1980). "In vitro" production of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol. 66, 1046-1049.
- Dvorak, J.A. (1984). The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: Biological and Medical implications. J. Cell. Biochem. 24, 357-371.
- Dvorak, J.A., Hyde, T.P. (1973). *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells "in vitro". I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. Exp. Parasitol. 34, 268-283.
- Dvorak, J.A., Hartman, D.L., Miles, M.A. (1980). *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. J. Protozool. 27, 472-474.
- Dvorak, J.A., Hall, T., Crane, M., Engel, J., Mc Daniel, J., Uriegas, R. (1982). *Trypanosoma cruzi*: Flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. J. Protozool. 29, 430-437.

- Engels, W.R. (1981). Estimating genetic divergence and genetic variability with restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 6329-6333.
- Engel, J.C., Doyle, P.S., Dvorak, J.A. (1985) *T. cruzi*: biological characterization of clones derived from chronic chagasic patients II. Quantitative analysis of the intracellular cycle. *J. Protozool.* 32, 80-83.
- Fernández, J.F., Castellani, D., Kimura, E. (1969). Physiological events in the course of the growth and differentiation of *T. cruzi*. *Genetics.* 61, 213-226.
- Flint, J.E., Schechter, M., Chapman, M.D., Miles, M.A. (1984). Zymodeme and species specificities of monoclonal antibodies raised against *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 193-202.
- Freily, H., Müller, L.A., González Cappa, S.M. (1983). Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' Disease. *J. Chem. Microbiol.* 18, 327-330.
- García, E.S., Dvorak, J.A. (1982). Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 259-262.
- Gibson, W.C., Miles, M.A. (1986). The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.* 5, 1299-1305.
- Goding, J., Handman, E. (1984). Electrophoretic analysis of protein antigens. In: *Genes and antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, Ed. C. M. Morel UNDP/World Bank/WHO. 383-415.
- Gonçalves, A., Nehme, N., Morel, C. (1984). Trypanosomatid characterization by schizodeme analysis. In: Morel, C.M., Ed. *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, 2nd edition, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Geneva. 95-109.
- Gonçalves, A.M., Nehme, N.S., Morel, C.M. (1985). Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18, 67-73.
- Gonçalves, M.F., Umezawa, E.S., Katzin, A.M., De Souza, W., Alves, M.J.M., Zingales, B., Colli, W. (1991). *T. cruzi*: Shedding of Surface Antigens as Membrane Vesicles. *Exp. Parasitol.* 72, 43-53.
- González, J., Araguth, M.F., Yoshida, N. (1991). Resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection resulting from immunization of mice with a 90-kilodalton antigen from metacyclic trypomastigotes. *Infect. Immun.* 59, 000-000.
- González-Perdomo, M., Romero, P., Goldenberg, S. (1988). Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Exp. Parasitol.* 66, 205-212.
- Harth, G., Haidaris, C.G., So, M. (1989). Purification and characterization of stage-specific glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 143-150.
- Henríquez, D., Piras, R., Piras, M. (1981a). Surface membrane interactions of *Trypanosoma cruzi* and Vero cells. Dissociation of the adhesion and penetration steps. *J. Cell Biol.* 91, 108-111.

- Henríquez, D., Piras, R., Piras, M.M. (1981b). The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2, 359-366.
- Jazin, E.E., Luquetti, A.O., Rassi, A., Frasch, A.C.C. (1991). Shift of excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* during human Chagas' Disease. *Infect. Immun.* 59, 2189-2191.
- Jenni, L., Marti, S., Schweizer, J., Betschart., Le Page, R., Wells, J., Tait, P., Painsavoine, P., Pays, E., Steinert, M. (1986). Hybrid formation between African trypanosome during cyclical transmission. *Nature* 322, 173-175.
- Joiner, K., Dias da Silva, W., Rimoldi, M., Hammer, C., Sher, A., Kipnis, T. (1988). Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertases. *J. Biol. Chem.* 263, 11327-11335.
- Kagan, I.G., Norman, L. (1961). Immunologic studies on *T. cruzi*. Duration of acquired immunology in mice initially infected with a North American strain of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.* 108, 213-217.
- Kahn, S., Van Voorhis, W.C., Eisen, H. (1990). The major 85-kD surface antigen of the mammalian form of *Trypanosoma cruzi* is encoded by a large heterogeneous family of simultaneously expressed genes. *J. Exp. Med.* 172, 589-597.
- Katzin, V.J., Añasco, N., Isola, E.L.D., González Cappa, 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.
- Kessler, S.W. (1975). Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.* 115, 1617-1624.
- Kierszenbaum, F., Howard, J.G. (1976). Mechanism of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection. The importance of antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J. Immunol.* 116, 1208-1211.
- Kierszenbaum, F., Ramírez, M.A. (1990). Modulation of sensitivity of blood forms of *Trypanosoma cruzi* to antibody-mediated, complement-dependent lysis. *Infect. Immun.* 58, 119-123.
- Kipnis, T.L., Calich, V.L., Dias Da Silva, W. (1979). Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. *Parasitology* 78, 89-98.
- Kirshoff, L.V., Engel, J.C., Dvorak, J.A., 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.
- Krettl, A.U., Brener, Z. (1976). Protective effect of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 116, 755-760.
- Krettl, A., Weisz-Carrington, P., Nussenzweig, S. (1979). Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clin. Exp. Immunol.* 37, 416-423.

- Krettli, A.U. (1982). Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in Experimental and Human Infections. Afr. J. Clin. Exp. Immunol. 3, 327-345.
- Krettli, A.U., Brener, Z. (1982). Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. J. Immunol. 128, 2009-2012.
- Krettli, A.U., Cançado, J.R., Brener, Z. (1982). Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas' Disease. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 76, 334-340.
- Krettli, A.U., Cançado, J.R., Brener, Z. (1984). Criterion of cure of human Chagas' Disease after specific chemotherapy: Recent advances. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Suppl. I, Vol 79, 157-164.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.
- Lages-Silva, E.L., Ramirez, L.E., Krettli, A.U., Brener, Z. (1987). Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis rate of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. Parasit. Immunol. 9, 21-30.
- Lambrecht, F.L. (1965). Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' Disease. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 7, 346-352.
- Lima, M.F., Villalta, F. (1989). *Trypanosoma cruzi* trypomastigote clones differentially express a parasite cell adhesion molecule. Mol. Biochem. Parasitol. 33, 159-170.
- Lis, A., Sharon, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. Ann. Rev. Biochem. 55, 35-67.
- Luquetti, A.O., Miles, M.A., Rassi, A., De Rezende, J.M., Pova, M.M., Rodríguez, I. (1986). *Trypanosoma cruzi* zymodemes associated with acute and chronic Chagas' Disease in central Brazil. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 80, 462-470.
- Macina, R.A., Arauzo, S, Reyes, M.B., Sánchez, D.O., Basombrio, M.A., Montamat, E.E., Solari, A., Frasch, A.C.C. (1987). *Trypanosoma cruzi* isolates from Argentina and Chile grouped with the aid of DNA probes. Mol. Biochem. Parasitol. 25, 45-53.
- Marinkelle, C.J., Vallejo, G.A., Schottelius, J., Guhl, F., de Sánchez, N. (1986). The affinity of the lectins *Ricinus communis* and *Glycine maxima* to carbohydrates on the cell surface of various forms of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*, and the application of these lectins for the identification of *T. cruzi* in the feces of *Rhodnius prolixus*. Acta Tropica. 43, 215-223.
- Markwell, M.A.K., Fox, C.F. (1978). Surface-specific iodination of membrane proteins of viruses and eucaryotic cells using 1,3,4, 6-tetrachloro-3-alfa, 6-alfa-diphenylglycoluril. Biochemistry. 17, 4807-4817.
- Marques de Araujo, J., Chiari, E. (1988). Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR. de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C3H isogênicos. Med. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 83 (2), 175-181.
- Martins, M., Hudson, L., Krettli, A., Cançado, R., Brener, Z. (1985). Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. Clin. Exp. Immunol. 61, 343-350.

- Meirelles, M.N., Araujo-Jorge, T.C., De Souza, W. (1980). Interaction of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with chicken macrophages *in vitro*. *Parasitology* 81: 373-381.
- Miles, M.A., Pova, M., Prata, A., Cedillos, R.A., De Souza, A.A., Macedo, A. (1981a). Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' Disease?. *Lancet*. 1, 1338-1340.
- Miles, M.A., Pova, M., De Souza, A.A., Lainson, R., Shaw, J.J., Ketteridge, D.S. (1981b). Chagas' Disease in the Amazon Basin. II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Para State, north Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 667-674.
- Miles, M., Apt, W., Widner, G., Pova, M., Schofield, C. (1984). Isozyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 526-535.
- Miles, M.A. (1985). Isozyme Characterization. *Rev. Soc. Bra. Med. Trop.* 18 (Suplemento), 53-59.
- Miranda-Santos, I.K.F., Pereira, M.E.A. (1984). Lectins discriminate between pathogenic and nonpathogenic South American trypanosomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 839-844.
- Moncayo-Medina, A. (1987). "Chagas' Disease" In: Tropical Disease Research UNDP/World Bank/WHO Eighth programme. 89-98.
- Morel, C., Chiari, E., Camargo, E.P., Mattei, D., Romanha, A., Simpson, L. (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 6810-6814.
- Morel, C., Simpson, L. (1980). Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29 Suppl., 1070-1074.
- Morel, C. (1984). Schizodeme characterization of natural and artificial populations of *T. cruzi* as a tool in the study of Chagas' disease In: Newton, B., Michael, F. eds. New approaches to the identification of parasites and their vectors. Schwabe and Co. A, Basel 1253.
- Mortara, R.A., Araguth, M.F., Yoshida, N. (1988). Reactivity of stage-specific monoclonal antibody 1G7 with metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* strains: lytic property and 90.000 mol. wt surface antigen polymorphism. *Parasite Immunol.* 10, 369-378.
- Murfin, D., Kuhn, R. (1988). Relative resistance of Brazil strain trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* to "in vitro" antibody-dependent complement-mediated lysis. *J. Parasitol.* 74, 1046-1050.
- Müller, L., Añasco, N., González Cappa, S. (1987). *Trypanosoma cruzi*: Isolate dependence in the induction of lytic antibodies in the mouse and rabbit. *Exp. Parasitol.* 61, 284-293.
- Mutharia, L.M., Pearson, T.W. (1987). Surface carbohydrates of procyclic forms of African trypanosomes studied using fluorescence activated cell sorter analysis and agglutination with lectins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23, 165-172.

- Neghme, A. (1982). Hipótesis acerca de la evolución de la Tripanosomiasis americana. *Parasitol. al Día*. 6, 23-25.
- Nogueira, N., Cohn, A. (1976). *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.* 143, 1402-1420.
- Nogueira, N., Chaplan, S., Cohn, Z. (1980). *Trypanosoma cruzi* factors modifying ingestion and fate of blood from trypomastigotes. *J. Exp. Med.* 152, 447-451.
- Norris, K., Harth, G., So, M. (1989). Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infect. Immun.* 57, 2372-2377.
- O'Daly, J.A. (1976). Effects of fetal calf serum factors and proteins on division and transformation of *Trypanosoma cruzi* "in vitro". *J. Protozool.* 23, 557-583.
- Orozco, O., Afchain, D., Dissous, C., Rodríguez, C., Ovlaque, G., Lemestre, J.C., Logues, M., Capron, A. (1984). Different monoclonal antibodies against the component 5 specific for *T. cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 560-568.
- Osuna, A., Ortega, G., Gamarro, F., Castanys, S., Mascaró, M.C. (1984). Some factors affecting the "in vitro" invasion of HeLa cells by *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 14, 253-257.
- Ouassi, M. A., Cornette, J., Capron, A. (1986). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19, 201-113.
- Ouassi, M.A., Taibi, A., Cornette, J., Velge, P., Marty, B., Loyens, M., Esteva, M., Rizvi, F.S., Capron, A. (1990). Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitology*. 100, 115-124.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- Pereira, M.E.A., Loures, M.A., Villalta, F., Andrade, A.F.B. (1980). Lectin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi* developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cells. *J. Exp. Med.* 152, 1375-1392.
- Pereira, M.E.A., (1983). A developmental regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Science*. 229, 1444-1446.
- Peterson, D.S., Wrightsman, R.A., Manning, J.E. (1986). Cloning of a major surface-antigen gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat. *Nature*. 322, 566-568.
- Peterson, D.S., Fouts, D.L., Manning, J.E. (1989). The 85-kD surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi* is telomeric and a member of a multigene family. *EMBO J.* 8, 3911-3916.
- Piras, M.M., Piras, R., Henríquez, D. (1983). *Trypanosoma cruzi*-fibroblastic cell interactions necessary for cellular invasion. p. 31-51. In: Ciba Fdn Symp. N<sup>o</sup>99 Cytopathology of Parasitic Disease. Pitman Brooks, London.

- Pizzi, T.P., 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.P. (1957). *Inmunología de la Enfermedad de Chagas*. Ed. Universidad de Chile, Santiago. pp, 183.
- Postam, M., Dvorak, J., Mc Daniel, J. (1983). Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 497-506.
- Prata, A. (1985). Significance of *Trypanosoma cruzi* differentiation and selection relationship with clinical and epidemiological varieties. *Rev. Soc. Bra. Med. Trop.* 18, 9-16.
- Prioli, R.P., Rosenberg, I., Pereira, M.E.A. (1990). High and low density lipoproteins enhance infection of *Trypanosoma cruzi* "in vitro". *Mol. Biochem. Parasitol.* 38, 191-198.
- Rangel-Aldao, R., Triana, F., Comach, G., Abate, T., Fernández, V., Mc Mahon-Pratt, D. (1988). Intracellular signaling transduction in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*: Role of AMPc. *Arch. Biol. Med. Exp.* 21, 403-408.
- Ready, P.D., Miles, M. A. (1980). Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 238-242.
- Rimoldi, M.T., Sher, A., Heiny, S., Lituchy, A., Hammer, C.H., Joiner, K. (1988). Developmentally regulated expression by *Trypanosoma cruzi* of molecules that accelerate the decay of complement C3 convertases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 193-197.
- Romanha, A.J., Bronfen, E., Fernandes, C.M.M., Chiari, E. (1988). Current parasitological isolation procedures chagasic as evaluated by isoenzyme patterns. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 83 (1), 52.
- Romanha, A.J., Brener, Z. (1988). *Trypanosoma cruzi* isoenzyme pattern as an epidemiological tool. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 83 (1), 383-386.
- Schaub, G.G.A. (1989). *Trypanosoma cruzi*: Quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.* 68, 260-273.
- Schenone, H., Contreras, M., Borgoño, J., Rojas, A., Villarroel, F., Valdés, J. (1985). *Enfermedad de Chagas en Chile. Sectores rurales y periurbanos del área de endomozootia. Relaciones entre condiciones de la vivienda, infestación triatomídea domiciliaria e infección por T. cruzi del vector, del humano y de mamíferos domésticos. 1982-1985.* *Biol. Chil. Parasitol.* 40, 58-67.
- Schlemper, B.R., Jr. (1982). *Caracterização de cepas do Trypanosoma cruzi isoladas de pacientes con diferentes formas clínicas da doença de Chagas.* Tese de Doutorado, Univ. Fed. do Rio de Janeiro.
- Schlemper, B.R., Jr., Avila, C.M., Coura, J.R., Brener, Z. (1983). Course of infection and histopathological lesions in mice infected with seventeen *T. cruzi* strains isolated from chronic patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 16, 23-30.
- Schottelius, J. (1982). The identification by lectins of two strain groups of *Trypanosoma cruzi*. *Z. Parasitenkd.* 68, 147-154.

- Schottelius, J., Uhlenbruck, G. (1983). Comparative studies of *Trypanosoma cruzi* and *T. cruzi*-like stocks from different South American countries using lectins. *Z. Parasitenkd.* 69, 727-736.
- Schmunis, G.A., Szarfman, A., Langembach, T., De Souza, W. (1978). Induction of capping in blood-stage trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* by human anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies. *Infect. Immun.* 20, 567-569.
- Schmunis, G.A., Szarfman, A., De Souza, W., Langembach, T. (1980). *Trypanosoma cruzi*: antibody-induced mobility of surface antigens. *Exp. Parasitol.* 50, 90-102.
- Sher, A., Crane, M.S.T., Kirshhoff, L. (1983). Cultivation in mice provides a signal for the differentiation of *T. cruzi* epimastigotes to trypomastigotes. *J. Protozool.* 30, 278-283.
- Stefani, M.M.A., Takehara, H.A., Mota, I. (1983). Isotype of antibodies responsible for immune lysis in *T. cruzi* infected mice. *Immun. Letters.* 7, 91-97.
- Stevens, A.F., Miles, M.A., Allen, A.K. (1988). *Trypanosoma cruzi*: Studies on the interactions of lectins with glycoconjugates of different zymodemes. *Exp. Parasitol.* 67, 324-333.
- Sullivan, J.J. (1982). Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* "in vitro": A simplified procedure. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76, 300-303.
- Takle, G.B., Young, A., Snary, D., Hudson, L., Nicholls, S.C. (1989). Cloning and expression of a trypanomastigote specific 85-kilodalton surface antigen gene from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37, 57-64.
- Takehara, H.A., Da Silva, A.M.M., Brodskyn, C.I., Mota, I. (1990). A comparative study of anti-*Trypanosoma cruzi* serum obtained in acute and chronic phase of infection in mice. *Immunology Letters.* 23, 81-86.
- Tanuri, A., De Andrade, P.P., Almeida, D.F. (1985). *Trypanosoma cruzi*: Isolation of cloned strains and characterization of their infectivity. *J. Parasitol.* 71, 397-402.
- Teixeira, M.M.G., Yoshida, N. (1986). Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18, 271-283.
- Tibayrenc, M. (1980). Application of the calculations of genetic distances for flagellate systematics. *Cah. ORSTOM. sér. Ent. Med. Parasitol.* 18, 301-302.
- Tibayrenc, M., Cariou, M.L., Solignac, M. (1981). Interprétation génétique des zymogrammes de flagellés des genres *Trypanosoma* et *Leishmania*. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 292, 623-625.
- Tibayrenc, M., Echalar, L., Brenière, F., Lemesre, J.L., Barnabé, C., Desjeux, P. (1983). Sur le statut taxonomique et médical des souches isoenzymatiques de *Trypanosoma cruzi*. Considérations sur la valeur taxonomique et immunogénique des différentes isoenzymes. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 296, 721-726.
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., Ayala, F.J. (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' Disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 115-119.

- Tibayrenc, M., Ayala, F. (1988). Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi* the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution*. 42, 277-292.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Ayala, F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 2414-2418.
- Tibayrenc, M., Ayala, F.J. (1991). Towards a population genetics of micro-organisms: The clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol. Today*. 7, 228-232.
- Tibayrenc, M., K. Neubauer, Ch. Barnabé, F. Guerrini, D. Skarecky and F.J. Ayala. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90, 1335-1339.
- Torres, H., Flavio, M. (1993). Signal Transduction Mechanism in *Trypanosoma cruzi*. *Santiago Southern Summer Symposia*. 1, 40-41.
- Toyé, P.J. (1974). Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med Hyg.* 68, 147.
- Trischmann, T., Tanowitz, H., Wittner, M., Bloom, B. (1978). Role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* 45, 160-168.
- Trischmann, T. (1986). *Trypanosoma cruzi*: Early parasite proliferation and host resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* 62, 194-201.
- Vivas, J., Urbina, J.A. (1982). Energy-dependent lectin-induced agglutination in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Acta Cient. Venez. (Caracas)*. 33, 396-401.
- Villalta, F., Kierszenbaum, F. (1987). Insect-borne and culture-derived metacyclic *Trypanosoma cruzi*: differences in infectivity and virulence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 529-532.
- Wagner, W., So, M. (1990). Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: Involvement of multicopy genes. *Infect. Immun.* 58, 3217-3224.
- Wood, D.E., Pipkin, A.S. (1969). Multiplication and differentiation of *Trypanosoma cruzi* in an insect cell culture system. *Exp. Parasitol.* 24, 176-183.
- Wood, D.E., Sousa, O.E. (1976). *Trypanosoma cruzi*: Effects of *Rhodnius prolixus* extracts on "in vitro" development. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 18, 93-96.
- Yoshida, N. (1986). *Trypanosoma cruzi*: Recognition of trypomastigote surface antigens by lytic antisera from mice resistant to acute infection. *Exp. Parasitol.* 61, 184-191.
- Yoshida, N., Mortara, R.A., Araguth, M.F., González, J.C., Russo, M. (1989). Metacyclic, neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 57, 1663-1667.
- Yoshida, N., Blanco, S.A., Araguth, M.F., Russo, M., González, J. (1990). The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39, 39-46.

- Zhang, Q., Tibayrenc, M., Ayala, F.J. (1988). Linkage disequilibrium in natural populations of *Trypanosoma cruzi* (Flagellate), the agent of Chagas' disease. *J. Protozool.* 35 (1), 81-85.
- Zimmermann, D., Peters, W., Schaub, G.A. (1987). Differences in binding of lectin-gold conjugates by *Trypanosoma cruzi* and *Blastocrithidea triatomae* (Trypanosomatidae) in the intestine of *Triatoma infestans* (Reduviidae). *Parasitol. Res.* 74, 5-10.
- Zingales, B., Andrews, N.W., Kuwajima, V.Y., Colli, W. (1982). Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 111-124.
- Zingales, B. (1984). Labeling of trypanosomatids surface antigens by lactoperoxidase and Iodo-Gen. In: *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual.* Ed. Morel C.M. 2nd. ed Rio de Janeiro FIOCRUZ. 333-338.
- Zingales, B., Colli, W. (1984). Identification of trypanosomatid surface antigens with a protein A-bearing *Staphylococcus aureus* as immunoadsorbent. In: *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual.* Ed. Morel C.M. 2nd. ed Rio de Janeiro FIOCRUZ. 347-355.

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD EN POBLACIONES Y CLONES  
DE *TRYPANOSOMA CRUZI* POR  
CRITERIOS BIOLÓGICOS, INMUNOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

por

**GITTITH ARIELA SANCHEZ PADILLA**

1993

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Aldo Solari Illescas